



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA – INCT MEDICINA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOXINA TX3-3 ISOLADA DO
VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM MODELOS
ANIMAIS DE DOR

TESE DE DOUTORADO

GERUSA DUARTE DALMOLIN

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOXINA TX3-3 ISOLADA DO
VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM MODELOS
ANIMAIS DE DOR**

por

GERUSA DUARTE DALMOLIN

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências: Farmacologia Bioquímica e Molecular**

Orientador: Dr. Juliano Ferreira

Co-orientador: Dr. Marcus Vinicius Gomez

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA – INCT MEDICINA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

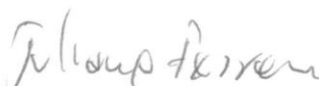
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOXINA TX3-3 ISOLADA DO
VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM MODELOS
ANIMAIS DE DOR

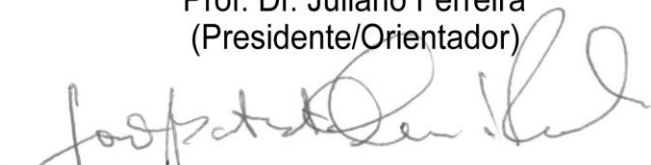
elaborada por

GERUSA DUARTE DALMOLIN

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências: Farmacologia Bioquímica e Molecular



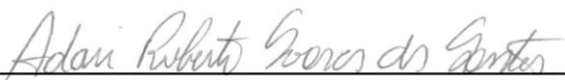
Prof. Dr. Juliano Ferreira
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (UFSM)



Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (UFSM)



Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC)



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (UEPG)

Santa Maria, 10 de dezembro de 2010.

A Helvio e Maria Tereza

AGRADECIMENTOS

Ao professor Juliano Ferreira, pela orientação ao longo do Mestrado e Doutorado. Pelo exemplo, pelo incentivo e por compartilhar de sua visão científica, que motivou um novo olhar sobre a ciência.

Ao professor Marcus Vinicius Gomez, pela oportunidade de participar de um projeto tão grandioso do qual este trabalho faz parte. Obrigada pela confiança e pelos momentos de conversa amigável e ensinamentos científicos.

Aos professores Maribel Antonello Rubin e Carlos Fernando de Mello, pela acolhida no LabNeuro desde a época da minha iniciação científica e pelos ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmico-científica.

Aos colegas do LabNeuro, os tantos que tive a oportunidade de conhecer e conviver ao longo desses anos de jornada científica, pela ajuda na execução dos experimentos, pelas discussões científicas e pelos tantos momentos que compartilhamos na bancada, na 'mesa de estudos' ou mesmo no 'bosque', que certamente tornaram o fazer ciência muito mais agradável. Em especial ao Guilherme, pela ajuda inestimável na finalização desta tese.

Aos 'colegas de Minas', pela acolhida afetuosa, pelos poucos mas fascinantes experimentos na 'sala do confocal' e pelas conversas e discussões científicas sempre enriquecedoras que estão impressas, de alguma maneira, neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, à Universidade Federal de Minas Gerais e à Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilização de recursos para a realização deste trabalho.

Ao Instituto do Milênio, CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRONEX pelo auxílio financeiro.

*“ O prazer é o primeiro dos bens.
É a ausência de dor no corpo
e de inquietação na alma.”*

Epicuro

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
ABSTRACT.....	xI
I. INTRODUÇÃO	12
II. Objetivos	16
II.1. OBJETIVO GERAL	17
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
III. Revisão Bibliográfica.....	18
III.1. UMA BREVE HISTÓRIA SOBRE A DOR	19
III.1.2. PANORAMA ATUAL: A IDÉIA DE DOR HOJE	24
III.2. O CAMINHO DA DOR – VIAS DE TRANSMISSÃO DA DOR	26
III.3. DOR CRÔNICA: SINALIZAÇÃO CELULAR E NEUROPLASTICIDADE	32
III.4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO: ANALGÉSICOS E ALVOS POTENCIAIS NO TRATAMENTO DA DOR CRÔNICA	37
III.4.1 O Sistema Opióide.....	38
III.4.2 Ziconotida - Do <i>Conus Magus</i> para a clínica.....	42
III.4.3 Canais de Cálcio Dependentes de voltagem.....	44
III.5 Veneno de Aranhas: Fonte de toxinas peptídicas biologicamente ativas.....	47
III.5.1 <i>Phoneutria nigriventer</i> , a aranha "armadeira" e suas phonetoxinas.....	50
IV. Material e Métodos	54
IV.1. ANIMAIS	55
IV.2. DROGAS	55
IV.3. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS.....	56
IV.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	57
IV.4.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DE DOR.....	57
IV.4.1.1. TESTE DA RETIRADA DA CAUDA	57
IV.4.1.2. TESTE DO VON FREY	58
IV.4.2. AVALIAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS	59
IV.4.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA	59
IV.4.2.1.1. TESTE DE LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (ROTAROD)	59
IV.4.2.1.2. TESTE DO REFLEXO DE ENDIREITAMENTO (RIGHTING REFLEX TEST)	60
IV.4.2.2. AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS MOTORES ANORMAIS	60
IV.5. MODELOS ANIMAIS DE DOR CRÔNICA	61
IV.5.1. MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)	61
IV.5.2. MODELOS DE DOR NEUROPÁTICA.....	61
IV.5.2.1. MODELO DE NEUROPATIA CAUSADA POR TRAUMA.....	61
IV.5.2. 2. MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA.....	62
IV.6. MODELO DE TOLERÂNCIA A OPIÓIDE	62
IV.7 .ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
V. Resultados.....	65
V.1. EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E COLATERAIS PRODUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 E ω -CONOTOXINA MVIIC EM CAMUNDONGOS	66

V.2. EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E COLATERAIS PRODUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECEREBROVENTRICULAR DE Tx3-3 E ω -CONOTOXINA MVIIC EM CAMUNDONGOS	69
V.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 EM MODELO ANIMAL DE DOR INFLAMATÓRIA	72
V.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA.....	74
V.5. EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE Tx3-3 NA ANTINOCICEPÇÃO CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE UMA DOSE SUB-EFETIVA DE MORFINA	77
VI. DISCUSSÃO	84
VII. CONCLUSÕES.....	105
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
IX. APÊNDICES	136
APÊNDICE A - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 NO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EVOCADO POR FORMALINA.....	137
APÊNDICE B - EFEITO DA INIBIÇÃO DA CAMKII ESPINHAL NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA	139
APÊNDICE C- MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA PAIN.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMP _c	Adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico
CaMKII	Proteína cinase dependente de cálcio calmodulina II
CCDV	Canais de cálcio dependentes de voltagem
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DE ₅₀	Dose efetiva 50
DRG	Gânglios da raiz dorsal
E _{máx}	Efeito máximo
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GIRK	Canais de potássio retificadores de influxo de corrente
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICK	Inhibitory cystine knot
MPE	Máximo efeito possível
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PBS	Salina tamponada com fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
RVM	Porção rostral da medula oblonga ventromedial
SNC	Sistema Nervoso Central
SNK	Student-Newman-Keuls
STZ	Estreptozotocina
TG	Glânglio da raiz trigeminal
WDR	Neurônios polimodais

RESUMO

O veneno de animais peçonhentos representa uma fonte valiosa para a busca de novos tratamentos para a dor. O presente estudo se propôs a avaliar os efeitos antinociceptivo e motores adversos causados pela Tx3-3, uma toxina peptídica isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, que inibe canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), com maior afinidade para os CCDV do tipo P/Q e R. Inicialmente, foi avaliado o efeito da Tx3-3 em teste de nocicepção aguda, evocada por estímulo térmico (o teste da retirada de cauda) e em modelos animais de dor crônica inflamatória (induzida pelo adjuvante completo de Freund – CFA) e neuropática (pela ligação parcial do nervo ciático ou através da indução de neuropatia diabética por STZ). A seguir, foi avaliado o efeito da injeção intratecal de Tx3-3 na eficácia antinociceptiva da morfina em animais neuropáticos ou tolerantes a opióides. A injeção intratecal (i.t.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) de Tx3-3 em camundongos causou efeito antinociceptivo fugaz (15 min de duração), sem promover alterações detectáveis em funções motoras. Em comparação, a ω -conotoxina MVIIC, uma toxina peptídica isolada do veneno do molusco marinho *Conus magus*, que inibe CCDV do tipo P/Q e N, causou prejuízo na atividade motora em doses muito próximas àquelas capazes de causar antinocicepção no teste da retirada da cauda. Quando testada nos modelos de dor neuropática, a Tx3-3 apresentou efeito antinociceptivo mais duradouro (até 2 h de duração). A administração i.t. de Tx3-3 (30 pmol/sítio) reduziu a alodínia mecânica produzida por ligação parcial do nervo ciático de camundongos assim como a alodínia mecânica causada pela neuropatia diabética em camundongos e ratos. Por outro lado, a toxina Tx3-3 não apresentou efeito antinociceptivo no modelo de dor inflamatória. A Tx3-3 não foi apenas eficaz no alívio da dor neuropática como também restabeleceu a eficácia antinociceptiva da morfina em camundongos neuropáticos e tolerantes a opióides. Os resultados aqui descritos apontam a Tx3-3 como uma toxina promissora para o tratamento da dor crônica refratária a opióides

Palavras chave: dor neuropática; tolerância a opióides; canal de cálcio do tipo P/Q; canal de cálcio do tipo R; bloqueador iônico; toxina peptídica; antinocicepção.

ABSTRACT

Venom peptides have produced exceptional lead compounds for drug development to treat pain. In the present study, we examined the antinociceptive and motor effects of Tx3-3, a peptide toxin isolated from *Phoneutria nigriventer* venom, which inhibit high voltage-dependent calcium channels (VDCC), preferentially P/Q and R-type VDCC. First, we tested the effects of Tx3-3 on nociceptive (tail-flick test), neuropathic (partial sciatic nerve ligation and STZ-induced diabetic neuropathy) and inflammatory (intraplantar Complete Freund's Adjuvant - CFA) animal models of pain. Additionally, we also tested the effect of Tx3-3 on morphine antinociception in opioid-tolerant and neuropathic mice. In the tail-flick test, both intrathecal (i.t.) and intracerebroventricular (i.c.v.) injection of Tx3-3 caused a short-lasting antinociceptive effect in mice, without impair motor functions, at least in doses that were 10-30 times higher than the effective dose. By comparison, ω -conotoxin MVIIIC, a P/Q and N-type VDCC blocker derived from *Conus magus* venom, caused significant motor impairment at doses close to the efficacious dose in tail-flick test. Tx3-3 caused a long-lasting antinociceptive effect in neuropathic pain models. Intrathecal injection of Tx3-3 (30 pmol/site) decreased both mechanical allodynia produced by sciatic nerve injury in mice and STZ-induced allodynia in mice and rats. On the other hand, i.t. injection of Tx3-3 did not alter inflammatory pain. Furthermore, the i.t. injection of Tx3-3 before morphine challenge reestablished the morphine effectiveness in opioid-tolerant mice and allowed morphine antinociception in neuropathic mice. Taken together, our data show that Tx3-3 presents good antinociceptive activity in neuropathic pain models and enables morphine-induced antinociception in opioid-tolerant and neuropathic hyperalgesic states. These findings suggest that Tx3-3 may be of interest in the management of pain states refractory to opioids.

Keywords: neuropathic pain; opioid tolerance; P/Q- type calcium channel; R-type calcium channel; calcium channel blocker; peptide toxin; antinociception

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

A maioria dos analgésicos utilizados na clínica hoje foram descobertos de forma empírica, ou tiveram seu uso baseado na medicina popular. É o caso das substâncias derivadas do ópio (morfina) e da casca do salgueiro (aspirina). Atualmente, com a identificação dos mecanismos neurobiológicos responsáveis por determinados tipos de dor, a descoberta de novos fármacos analgésicos envolve a busca por substâncias capazes de atuar especificamente em alvos moleculares envolvidos na transmissão e modulação da dor crônica.

A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas em vários níveis do sistema nervoso. Os neurônios localizados na medula espinhal, de suma importância na transmissão dos estímulos nociceptivos, são freqüentemente alvo de tais alterações. A estimulação facilitada das fibras aferentes nociceptivas, que ocorre sob circunstâncias patológicas, como em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa, acaba por induzir o aumento na liberação de neurotransmissores como o glutamato, que ao se ligarem nos seus alvos pós-sinápticos na medula espinhal iniciam uma série de sinalizações celulares (como a ativação de segundos mensageiros, de proteínas cinases e fosfatases) que alteram de maneira transitória ou permanente a detecção do estímulo nocivo, produzindo hipersensibilidade dolorosa, a hiperalgesia. Esses eventos não são uniformes e dependem do tipo e da etiologia da dor.

A dor crônica tem etiologia diversa. As dores crônicas mais comuns incluem as neuropáticas (como as causadas por trauma ou diabetes) e as inflamatórias (como a artrite reumatóide). Quando não tratada de forma

adequada, a dor crônica pode ter conseqüências nefastas, sendo frequentemente associadas a quadros de depressão, isolamento social e afastamento do trabalho. A dor neuropática é especialmente problemática, pois geralmente apresenta resistência aos fármacos analgésicos tradicionais, sendo refratária até mesmo à analgesia da morfina.

Recentemente, a ziconotida - versão sintética da ω -conotoxina MVIIA, uma toxina descoberta no veneno do caracol marinho *Conus magus* - foi aprovada para o tratamento de dores intensas, refratárias à morfina, em pacientes que requerem analgesia intratecal. No entanto, a sua reduzida janela terapêutica limita o tratamento de muitos pacientes. A ação analgésica da ziconotida está relacionada ao bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), especificamente os CCDV do tipo N.

Os CCDV são classificados de acordo com suas propriedades biofísicas e farmacológicas em canais tipo L, N, P, Q, R (ativados por alta voltagem) e T (ativados por baixa voltagem). Os CCDV do tipo N, P/Q e, em menor grau, do tipo R estão localizados em terminais pré-sinápticos, onde interagem com proteínas envolvidas na exocitose de vesículas sinápticas. A ativação desses canais promove a liberação de neurotransmissores em várias áreas do sistema nervoso central, inclusive naquelas envolvidas na transmissão e modulação nociceptiva. Ademais, esses canais estão envolvidos no fenômeno de sensibilização central que acompanha a dor crônica e a tolerância a opióides.

Desde a descoberta do potencial analgésico da ω -conotoxina MVIIA, há um crescente interesse por toxinas peptídicas presentes no veneno de animais peçonhentos como possíveis tratamentos para a dor. O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, conhecida popularmente como aranha armadeira,

apresenta uma vasta gama de toxinas peptídicas com ações sobre canais iônicos. Dentre as frações isoladas do veneno, a fração PnTx3 apresenta toxinas capazes de bloquear os CCDV, o que a torna uma fonte interessante na busca de toxinas com potencial analgésico. De fato, uma das toxinas que compõem essa fração, a Ph α 1 β , capaz de inibir correntes de cálcio do tipo N, mostrou eficácia similar mas índice terapêutico superior à ω -conotoxina MVIIA em testes pré-clínicos. É também da fração PnTx3 a toxina alvo desse estudo.

A toxina Tx3-3, assim como a ω -conotoxina MVIIA, apresenta uma seqüência de aminoácidos que prediz uma estrutura tridimensional peculiar, comum a toxinas capazes de interagir com canais iônicos. De fato, a Tx3-3 já mostrou ser capaz de inibir correntes de cálcio e a liberação de glutamato de vesículas sinápticas, através do bloqueio preferencial de CCDV do tipo P/Q e R. Essas características fazem da Tx3-3 uma toxina promissora na busca de novas moléculas analgésicas.

Assim, o presente estudo se propôs a avaliar os efeitos antinociceptivo e adversos produzidos pela administração da toxina Tx3-3 em camundongos e ratos submetidos a modelos experimentais de dor.

Parte dos dados que compõem esta tese foram submetidos à publicação na revista *Pain* sob o título “Antinociceptive effect of the armed spider toxin Tx3-3 in acute and chronic animal models of pain” (Apêndice C) e os demais resultados irão compor o manuscrito intitulado “The armed spider toxin Tx3-3 restores the analgesic effect of morphine in neuropathic and opioid-tolerant mice” que se encontra em fase de elaboração.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos antinociceptivo e adversos da toxina Tx3-3 isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* em modelos experimentais de dor em camundongos e ratos.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da administração intratecal e intracerebroventricular da toxina Tx3-3 em teste de nocicepção aguda em camundongos;
2. Avaliar o desenvolvimento de efeitos motores adversos pela administração intratecal ou intracerebroventricular de Tx3-3 em camundongos;
3. Comparar os efeitos antinociceptivo e motores adversos causados pela administração de Tx3-3 com aqueles produzidos pela administração intratecal e intracerebroventricular da ω -conotoxina MVIIC em camundongos;
4. Avaliar o efeito da administração intratecal da Tx3-3 em modelo animal de dor inflamatória;
5. Avaliar o efeito da administração intratecal da Tx3-3 em modelo animal de dor neuropática induzida por trauma ou diabetes;
6. Avaliar o efeito da administração intratecal da Tx3-3 na eficácia antinociceptiva da morfina em modelos animais de dor resistente a opióides.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. UMA BREVE HISTÓRIA SOBRE A DOR

Nenhuma outra experiência está tão embutida de significados quanto a dor. As próximas linhas, no entanto, limitar-se-ão ao aspecto físico da dor, que restringe o significado de dor a uma experiência consciente, associada a uma lesão tecidual.

Virginia Woolf ao escrever: "*The merest schoolgirl, when she falls in love, has Shakespeare or Keats to speak her mind for her, but let a sufferer try to describe pain in his head to a doctor and language at once runs dry*"¹, exemplifica a dificuldade de descrever a dor enquanto experiência física. O entendimento da dor, como experiência física, dotada de vias anatômicas e mecanismos neurais e moleculares específicos, teve grande avanço a partir do século XIX, quando técnicas neuroanatômicas proveram subsídios para o entendimento do funcionamento do sistema nervoso central (SNC).

No início do século XIX, o trabalho pioneiro de Bell and Magendie propôs diferentes funções para os neurônios localizados nas raízes ventral e dorsal da medula espinhal, sendo aqueles responsáveis por funções motoras e estes por funções sensoriais. O anatomista escocês Bell defendia a ideia de que os nervos sensoriais possuíam funções especializadas para detectar e prover informações somáticas, incluindo a dor (CRANEFIELD, 1974; BELL, 1811; revisado por PERL, 2007). De acordo, o fisiologista alemão Müller, em 1840, postulou a "doutrina das energias nervosas específicas", que defendia o

1. Virginia Woolf, sobre a inefabilidade da dor em seu ensaio, "On Being Ill", publicado na revista inglesa sobre literatura **The Criterion**, Ed. Thomas Stearns Eliot, em 1926.

conceito de especificidade sensorial, em que cada modalidade sensorial (visão, olfato, audição e sensações somáticas) seria provida por um conjunto distinto de estruturas presentes nos nervos periféricos e no cérebro (MÜLLER, 1840). A teoria de Müller foi reforçada por estudos eletrofisiológicos de DuBois-Reymond, que demonstraram que os impulsos nervosos produzidos pela estimulação de diferentes fibras aferentes eram similares, o que implicava na necessidade das fibras aferentes serem constituídas de estruturas especializadas para informar a respeito na natureza de diferentes estímulos (DUBOIS-REYMOND, 1848). Em meados do século XIX, Schiff, aluno de Magendie, demonstrou que lesões específicas na medula espinhal resultavam em perda de sensações táteis e dolorosas de maneira independente (SCHIFF, 1858). Esses achados levaram Schiff a propor que a dor é uma sensação independente das demais, corroborando a tese de Avicenna, filósofo e médico persa, que um milênio antes postulou que a dor podia ser dissociada das sensações táteis e térmicas, sendo, portanto, uma sensação independente (revisado por PERL, 2007). Entre 1880 e 1890, o anatomista Edinger identificou uma longa via ascendente com origem em neurônios espinhas, que viria a ser chamada de via espinotalâmica (EDINGER, 1890). Estudos pré-clínicos e clínicos (BROWN-SÉQUARD, 1860; 1868; GOEWERS, 1878) já demonstravam que o quadrante antero-lateral da medula espinhal constituía a via anatômica que levaria a informação dolorosa da periferia até o cérebro. Anos mais tarde, a observação de portadores de síndromes que alteravam a percepção dolorosa ou de pacientes afetados por lesões cerebrais levou Dejerine e Roussy, em 1906, e Head e Holmes, em 1911, a considerar o tálamo uma estrutura encefálica fundamental para a produção de dor

(DEJERINE, E ROUSSY, 1906; HEAD E HOLMES, 1911). Assim, no final do século XIX diversas evidências sustentavam a tese de que a dor é uma sensação independente, com via anatômica específica para sua detecção.

No entanto, desde 1874, outra corrente teórica sobre a origem da dor contradizia o conceito de especificidade da dor. O neurologista alemão Erb, notando que estímulos intensos são, em geral, desagradáveis, postulou que a dor é o resultado da ativação vigorosa de vias nervosas comuns a outras modalidades sensoriais (ERB, 1874). Essa observação originou, então, uma nova teoria sobre a dor, oposta àquela cuja dor seria uma sensação específica e independente (a Teoria da Especificidade – *'The Specificity Theory'*), que propunha que a intensidade do estímulo gerador é que determinaria ou não a resposta de dor, a Teoria da Intensidade (*'The Intensity Theory'*). Anos mais tarde, a interpretação de registros eletrofisiológicos de fibras nervosas isoladas (ADRIAN E ZOTTERMAN, 1926), levou Nafe, um psicólogo americano, a intensificar o debate. Nafe postulou que não apenas a intensidade do estímulo, mas o padrão de atividade neuronal gerado por ele é que determinaria a resposta de dor, teoria chamada, por esse motivo, de Teoria Padrão (*'The Pattern Theory'*) (NAFE, 1929). Logo, no final do século XIX e início do século XX, pelo menos três correntes teóricas sobre a natureza da dor dividiam médicos e fisiologistas.

As observações feitas por von Frey em 1896/1897 de que as diferentes experiências sensoriais determinadas pela estimulação de distintas áreas da pele estavam diretamente relacionadas à estrutura dos terminais nervosos de tais áreas reforçou a idéia de especificidade da dor. No entanto, uma objeção sobre a dor como sensação específica se devia ao fato de estímulos não-

específicos (podendo ser esses mecânicos, térmicos ou químicos) serem capazes de gerar dor. Essa questão foi solucionada por Charles Sherrington que, percebendo que a dor era gerada por estímulos lesivos, resolveu chamar todo e qualquer estímulo capaz de gerar dor “nocivo”, independente da sua característica física. Sherrington cunhou, ainda, o termo “nociceptor” para o aparato responsável por detectar o estímulo nocivo (SHERRINGTON, 1906). No entanto, tal “aparato” não havia ainda sido precisamente identificado.

No início do século XX, registros de sinais nervosos obtidos em osciloscópio levaram Bishop, Gasser e seus colaboradores a sugerir as fibras delgadas ou finamente mielinizadas (A δ) e as fibras não mielinizadas (C) como aquelas responsivas aos estímulos nocivos (HEINBECKER E BISHOP, 1933; ZOTTERMAN, 1933; CLARK, HUGHES, E GASSER, 1935; LANDAU E BISHOP, 1953; COLLINS, NULSEN E RANDT, 1960). Em meados do século XX, Iggo e outros investigadores identificaram, em gatos, fibras aferentes de condução lenta, que requeriam estímulo intenso para serem ativadas, capazes de responder seletivamente a estímulos térmicos e mecânicos nocivos (IGGO, 1959; 1960; HUNT E MCINTYRE, 1960). Embora esses estudos apoiassem a Teoria da Especificidade, a ambivalência de dados histológicos e registros de sensibilidade cutânea relatada em diferentes estudos, somada à ausência de provas da existência de receptores específicos para a dor, levaram os membros do Departamento de Anatomia da Universidade de Oxford, entre os anos de 1940 e meados de 1950, a expressarem forte repúdio à Teoria da Especificidade. Nesse período, Patrick Wall era estudante de medicina na Universidade de Oxford. Anos mais tarde, em 1965, Patrick Wall e o psicólogo Ronald Melzack postularam a Teoria do Portão (*The Gate Theory*), em

oposição ao conceito de especificidade da dor. De acordo com essa teoria, o balanço entre a ativação de fibras aferentes de pequeno (C) e grande (A) diâmetro localizadas na substância gelatinosa da medula espinhal é que determinaria a condução, ou não, do estímulo nocivo: quando a ativação das fibras C sobressai àquela das fibras A o “portão” abre, e o estímulo é então conduzido. Caso a ativação das fibras A predomine, o portão fecha, e o estímulo nocivo não é levado a centros supra-espinhais (MELZACK E WALL, 1965). A Teoria do Portão foi a expressão mais articulada da Teoria Padrão e, embora equivocada quanto aos aspectos neurobiológicos, a teoria de Wall e Melzack foi precursora no conceito de modulação da dor, sugerindo, desde então, que estruturas supra-espinhais estariam envolvidas na modulação da transmissão da dor na medula espinhal, o que veio a ser confirmado anos mais tarde (BASBAUM E FIELDS, 1984).

Com o refinamento das técnicas eletrofisiológicas, as estruturas envolvidas na condução da dor foram pouco a pouco sendo identificadas e caracterizadas. A partir de estudos realizados em 1967 por Bessou, Burgess e Perl, um grande número de evidências apoiou a existência de fibras aferentes capazes de discriminar entre estímulos inócuos e nocivos (PERL, 1968; BESSOU E PERL, 1969; BESSOU, BURGESS E PERL, 1971). A identificação dos nociceptores facilitou a identificação de regiões responsivas a estímulos nocivos no sistema nervoso central: em 1970 Christensen and Perl demonstraram que neurônios presentes na lâmina I do corno dorsal da medula espinhal eram seletivamente ativados por estímulos nocivos e térmicos (Christensen e Perl, 1970); em 1975 Price e Mayer identificaram neurônios presentes em lâminas espinhais mais profundas (V-VI) capazes de responder

tanto a estímulos mecânicos inócuos quanto a estímulos térmicos e mecânicos nocivos, denominados neurônios polimodais (*wide dynamic range neurons* - WDR), achado que remete às premissas da Teoria Padrão. Hoje se sabe que a medula espinhal apresenta uma arquitetura organizada em lâminas, compostas por neurônios nociceptivos e polimodais, estando as lâminas mais superficiais (lâmina I e II) particularmente envolvidas na condução de estímulos nocivos (CRAIG, 2003). Portanto, a dor possui estruturas especializadas para a sua detecção e condução. No entanto, como demonstrado por Clifford Woolf em 1983, a arquitetura da medula espinhal está sujeita a alterações plásticas quando submetida à estimulação continuada, o que leva à manifestação de respostas de dor alteradas, ou seja, Wall e Melzack não estavam completamente errados ao inferir que a resposta de dor é modulada na medula espinhal. Os mecanismos envolvidos na condução e modulação da dor continuam a ser desvendados. A ideia que emerge é que a dor, enquanto experiência física deve ser entendida, não através de uma teoria única, mas como um processo fisiológico, com características anatômicas e moleculares estabelecidas que, por ser dinâmico, está sujeito a alterações e modulações.

III.1.2. PANORAMA ATUAL: A IDEIA DE DOR HOJE

O termo “nocicepção”, desde sua introdução por Sherrington há um século, vem sendo usado para descrever os processos neurais de decodificação de estímulos nocivos, ou seja, estímulos capazes de produzir dano tecidual. É, portanto, um termo utilizado para descrever um processo fisiológico. O termo dor, como definido pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), descreve não somente uma sensação, mas também

uma emoção desagradável associada a um estímulo lesivo ou potencialmente lesivo. A definição de dor proposta pela IASP desde 1979, aponta para a natureza subjetiva da dor e, assim, ajudou a estabelecer o direito e a necessidade do paciente receber tratamento para qualquer tipo de dor, seja a queixa acompanhada ou não de dano tecidual. De fato a dor é uma experiência subjetiva complexa, cuja percepção é resultado dos processos fisiológicos sensoriais somados a características pessoais – que compõem o aspecto emocional da dor. Um estímulo será percebido como doloroso independente da sua natureza, de acordo com o contexto em que a pessoa está inserida - é o caso analgesia que precede situações de fuga ou luta, mesmo na presença de uma lesão tecidual – e das emoções e memórias que a acompanham.

“Nocicepção” e “dor” não devem ser confundidas. Uma pode ocorrer na ausência da outra. É o que acontece por exemplo no caso da anestesia do nervo mandibular, utilizada em procedimentos odontológicos, em que a nocicepção periférica é mantida, sem que o paciente sinta dor. Ou nos casos de assimbolia à dor, condição geralmente associada a lesões de áreas cerebrais relacionadas ao processamento do componente emocional da dor, como o córtex cingulado anterior ou o córtex pré-frontal, em que o paciente é capaz de localizar e discriminar um estímulo nocivo sem que o mesmo provoque qualquer tipo de desconforto ou emoção desagradável associada (PRICE, 2002). Casos de assimbolia à dor ou condições de insensibilidade dolorosa, que ocorre nos indivíduos portadores da insensibilidade congênita à dor (MOGIL et al., 2000), são em geral dramáticos, uma vez que a habilidade de detecção, proteção e defesa de estímulos nocivos é essencial para a manutenção da integridade física e sobrevivência.

A transmissão da dor envolve a integração de mecanismos de detecção do estímulo nocivo periférico e sua condução até regiões do SNC que irão determinar a resposta de defesa. Esse caminho seguido pelo estímulo nocivo, habilmente caracterizado através de técnicas de biologia molecular, de eletrofisiologia e de imagem, permite a detecção da dor aguda. Alterações nesse intrincado caminho podem, todavia, alterar a percepção dolorosa. É o que acontece, por exemplo, em situações de dor crônica.

III.2. O CAMINHO DA DOR – VIAS DE TRANSMISSÃO DA DOR

Estímulos tais como compressão, frio ou calor e algumas substâncias químicas são interpretados como nociceptivos quando promovem a estimulação de fibras aferentes primárias que apresentam propriedades biofísicas e moleculares próprias para a detecção de estímulos potencialmente lesivos, os nociceptores. Existem duas principais classes de nociceptores, uma composta por neurônios não mielinizados, as fibras C, e outra formada por neurônios finamente mielinizados, as fibras A δ (MEYER et al, 2008). As fibras A δ diferem consideravelmente das fibras mielinizadas de grande diâmetro, A β , que respondem a estímulos mecânicos inócuos, como um leve toque, por exemplo. Os corpos celulares dos neurônios dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (*dorsal root ganglion* - DRG) e trigeminal (*trigeminal ganglion* - TG), que enviam eferências ao corno dorsal da medula espinhal e ao núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (BESSON, 1999). As fibras C, na sua maioria, são nociceptores polimodais que respondem a várias formas de estímulos nocivos (térmicos, mecânicos e químicos). Essas fibras são classificadas em dois

grupos, de acordo com o seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinhal (HUNT e ROSSI, 1985). As fibras C que expressam o receptor purinérgico P2X₃, o receptor para o fator neurotrófico derivado da glia Ret e sítios de ligação para a isolecitina B4, cujos terminais sinápticos localizam-se mais internamente na substância gelatinosa da medula espinhal (lâmina II), são classificadas como fibras C não-peptidérgicas. O outro grupo de fibras C sintetiza peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* - CGRP) e expressa receptores TrkA para o fator de crescimento do nervo (*nerve growth factor* – NGF). Essas fibras, denominadas fibras C peptidérgicas, fazem conexões com neurônios da lâmina mais externa do corno dorsal da medula (especialmente na lâmina I) (CUELLO et al., 1993; AVERIL et al., 1995). As fibras A δ também compõem um grupo heterogêneo, cujos terminais sinápticos projetam-se até a porção mais externa da lâmina II além de porções mais profundas do corno dorsal da medula espinhal (lâmina V). Tais fibras podem ser divididas em Tipo I e Tipo II, de acordo com o limiar de estimulação necessário para promover a despolarização e ativação das mesmas. As fibras do Tipo I respondem tanto a estímulos mecânicos quanto a estímulos químicos nocivos, mas apresentam alto limiar de estimulação para o calor (>50°C). Essas fibras são, no entanto, susceptíveis à sensibilização, caso o estímulo térmico se mantenha, passando a apresentar menor limiar de estimulação e a responder a menores temperaturas. As fibras do Tipo II apresentam um limiar de ativação para calor muito menor do que as do Tipo I, mas possuem um alto limiar para estímulos mecânicos (revisado por BASBAUM et al, 2009). A organização da medula espinhal em lâminas

compostas por fibras distintas quanto às características moleculares e eletrofisiológicas reflete o papel das diferentes porções da medula na condução de diferentes estímulos, por exemplo, análises eletrofisiológicas mostram que os neurônios presentes na lâmina I são geralmente responsivos a estímulos nocivos (via fibras C e A δ), enquanto que os neurônios das lâminas III e IV são primariamente responsivos a estimulação inócua (via fibras A β). Já a porção mais profunda do corno dorsal da medula espinhal, a lâmina V, recebe projeções convergentes de neurônios que respondem a estímulos nocivos (via fibras A δ) e daqueles que reconhecem estímulos inócuos (via fibras A β) (BASBAUM et al, 2009). Cabe salientar que a porção mais ventral (ou externa) da lamina II, que recebe predominantemente projeções de fibras C não peptidérgicas, é caracterizada pela presença de interneurônios que expressam a isoforma *gamma* da proteína cinase C (*gamma isoform of protein kinase C - PKC γ*), implicada na dor neuropática causada por lesão nervosa periférica (MALMBERG et al., 1997b), além da proteína cinase dependente de cálcio calmodulina II (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase - CaMKII*), co-localizada com os receptores opióides MOR (também referidos como μ), sabidamente envolvidos em processos nociceptivos (BRÜGGEMANN et al., 2000). Os nociceptores apresentam, ainda, a peculiaridade de serem formados por neurônios pseudo-unipolares, cujos terminais periféricos e centrais emanam de um mesmo axônio. Essa característica permite que as proteínas sintetizadas no DRG sejam expressas tanto na periferia como nos terminais sinápticos centrais e facilita a comunicação entre ambos os terminais (revisado por HUNT E MANTYH, 2001).

Os terminais sinápticos centrais dos nociceptores fazem conexão com neurônios de segunda ordem (neurônios de projeção), localizados especialmente nas lâminas I-II e V da medula espinhal, pela liberação de neurotransmissores, como o glutamato e a substância P (revisado por BASBAUM et al., 2009). Essa conexão está, no entanto, sujeita ao governo de interneurônios inibitórios e excitatórios (localizados na lâmina II, ou substância gelatinosa) que podem inibir ou fortalecer tal sinapse, causando, respectivamente, a inibição ou a exacerbação do impulso nociceptivo (GU et al., 1996; MILLAN, 1999; YASAKA et al., 2010). Uma vez estimulados, os neurônios de segunda ordem irão ativar, conforme a sua localização no corno dorsal da medula espinhal, vias paralelas que irão distribuir informações para circuitos supraespinhais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetivo-motivacionais (descontentamento) da dor (HUNT e MANTYH, 2001; PRICE, 2002).

A via espino-talâmica clássica origina-se na lâmina II da medula espinhal e se estende até o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem enviam terminações ao córtex somatosensorial, onde ocorre a discriminação do estímulo. A via espino-talâmica clássica está anatomicamente interconectada com estruturas límbicas através da via somatosensorial córtico-límbica. Essa via forma conexão das áreas somatosensoriais do córtex (S_1 e S_2) com áreas corticais parietais posteriores e com o córtex insular. O córtex insular envia eferências para estruturas como amígdala, córtex perirrinal e hipocampo, que conferem o caráter emocional à dor (FRIEDMAN et al., 1986). A via espino-talâmica córtico-límbica converge para as mesmas estruturas límbicas e subcorticais que são diretamente acessadas por outra via ascendente da dor, a

via espino-parabraquial-amigdalóide (BERNARD et al., 1989; BERNARD e BESSON, 1990). A via espino-parabraquial-amigdalóide origina-se na lâmina I da medula espinhal e conecta-se com a área parabraquial. Os neurônios da área parabraquial, que são ativados especificamente por estímulos nociceptivos, enviam projeções para a amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula oblonga ventrolateral (GAURIAU e BERNARD, 2002). O núcleo central da amígdala, bem como o hipotálamo, envia eferências para a PAG, que através de conexões com neurônios da porção rostral da medula oblonga ventromedial (RVM), modula a via descendente da dor (FIELDS, HEINRICHER E MASON, 1991).

Desde a descoberta, por Wall (1967), de que os neurônios presentes nas lâminas I, II e IV-VI da medula espinhal estão sujeitos à modulação por estruturas supra-espinhais, o entendimento do circuito modulatório descendente da dor tem progredido drasticamente. Esse circuito é formado por conexões de áreas encefálicas como o córtex cingulado anterior, regiões do córtex pré-frontal, o hipotálamo e o núcleo central da amígdala com a PAG, no mesencéfalo. A PAG, por sua vez, controla indiretamente a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula através de conexões com neurônios da RVM (revisado por FIELDS, 2004)

Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (LIEBESKIND et al, 1973; URBAN et al., 1999a; 1999b; PORRECA et al, 2002). Por exemplo, estimulação elétrica de diversas estruturas que compõem esse circuito produz redução da dor (MAYER et al., 1971; LIEBESKIND et al., 1973). Além disso, o circuito modulatório descendente

parece estar envolvido no efeito analgésico da morfina (MANNING et al., 1994; McGARAUGHTY et al., 2004). Por outro lado, a estimulação de alguns neurônios na RVM é capaz de exacerbar as respostas a estímulos nociceptivos (URBAN et al., 1999a; NEUBERT et al., 2004). Além disso, estimulações nocivas persistentes presentes, por exemplo, na inflamação ou na lesão de nervos, produz um quadro de hiperalgesia que é revertido por lesões ou pela inativação da RVM (MORGAN et al., 1994; URBAN et al., 1999b; PORRECA et al., 2002). Portanto, a estimulação de neurônios da RVM pode tanto facilitar como inibir a transmissão nociceptiva. Essa ação dual pode ser explicada pela presença de duas subpopulações neuronais presentes na PAG e na RVM que modulam de maneira oposta os estímulos nociceptivos periféricos. Através de análises eletrofisiológicas de neurônios da RVM, constatou-se que a estimulação térmica da cauda de ratos causava mudanças no disparo de duas subpopulações de neurônios, enquanto um grupo parava, o outro grupo aumentava o disparo imediatamente antes da resposta de retirada da cauda do animal. A partir dessas observações, os diferentes grupos de neurônios foram chamados células *off* e células *on*, respectivamente. Enquanto a ativação das células *on* facilita a transmissão nociceptiva, a ativação das células *off* inibe tal ação (FIELDS et al., 1983; FIELDS e HEINRICHER, 1985). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nocivo periférico.

A transmissão dolorosa se dá, portanto, sob o comando de fibras especializadas em detectar e conduzir a informação nociceptiva da periferia até o sistema nervoso central, onde vias anatômicas serão imediatamente ativadas para levar a informação até áreas encefálicas que irão integrar a informação

nociceptiva com informações contextuais e com a memória e, dessa forma, determinar a resposta individual de dor. Essa percepção supra-espinhal da dor produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa (CRAIG, 2003), que são cruciais para a manutenção da vida.

No entanto, em situações de nocicepção persistente, devido a não resolução de uma lesão ou quando ocorre neuroplasticidade após uma lesão, alterações fenotípicas e adaptações funcionais nas estruturas envolvidas na transmissão e modulação da dor podem resultar na detecção inadequada do estímulo nociceptivo, produzindo uma resposta de dor exagerada e persistente, a dor crônica. A dor crônica, diferente da dor aguda com propósito protetor, é uma doença debilitante com consequências nefastas. Seus portadores relatam sensações que guardam pouca relação com a função primordial de defesa da dor.

III.3. DOR CRÔNICA: SINALIZAÇÃO CELULAR E NEUROPLASTICIDADE

A lesão de tecidos ou nervos não apenas ativa as fibras nociceptivas produzindo dor aguda como também inicia uma série de mudanças nas propriedades dos nociceptores e dos neurônios da medula espinhal (revisado por JI E WOOLF, 2001). Essas alterações, dependendo do grau e da duração, podem gerar um estado de dor persistente, em que há uma resposta exacerbada de dor a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) ou inócuos (alodínia), ou ainda podem produzir sensação de dor na ausência de qualquer estímulo externo (dor espontânea) (BESSION, 1999). Esse estado álgico

alterado e persistente é chamado de dor crônica (ASHBURN E STAATS, 1999).

É considerada dor crônica toda a dor que persiste por mais de 12 semanas ou aquela que persiste além do tempo normal de cura (MERSKEY E BOGDUK, 2002). A dor crônica é um problema de saúde grave, que afeta centenas de milhões de pessoas por todo o mundo, altera funções físicas, induz ansiedade e depressão, diminuindo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho, o que acarreta prejuízos substanciais para a sociedade (RUSSO E BROSE, 1998; ASHBURN E STAATS, 1999; TANG E CRANE, 2006).

As dores crônicas mais comuns incluem a dor neuropática – decorrente de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial (como a neuropatia diabética, a neuropatia causada por trauma e as neuropatias associadas a doenças como o câncer e a AIDS, por exemplo) - e a dor inflamatória - causada por doenças inflamatórias (como, por exemplo, a artrite reumatóide, a gota e outras doenças reumáticas). Nessas situações o processamento sensorial está alterado. Mudanças nas propriedades eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios dos nociceptores e da medula espinhal produzem hipersensibilidade dolorosa, a hiperalgesia. (BESSON, 1999; WOOLF e SALTER, 2000). A hiperalgesia é caracterizada por um desvio para a esquerda na função que relaciona a magnitude do estímulo com a intensidade da resposta de dor ao estímulo, ou seja, um estímulo (doloroso ou não) passa a evocar uma resposta de dor mais intensa (LOESER E TREEDE, 2008). A hiperalgesia é resultado da sensibilização neuronal. A sensibilização dos neurônios dos nociceptores periféricos é chamada de hiperalgesia primária, e está relacionada a uma

diminuição no limiar de estimulação e a uma resposta aumentada dos nociceptores a estímulos aplicados na área da lesão. A sensibilização de neurônios da medula espinhal é chamada de hiperalgesia secundária, caracterizada por atividade ectópica ou espontânea aumentada de neurônios nociceptivos e de neurônios não nociceptivos, como aqueles associados a sensações táteis, que adquirem a capacidade de evocar dor (fenômeno chamado de alodínia). A hiperalgesia primária é importante para a proteção e recuperação do tecido lesionado. A hiperalgesia secundária está associada à cronicidade da dor.

A dor crônica está intimamente relacionada ao fenômeno de sensibilização central (WOOLF, 1983). A sensibilização central envolve uma série de eventos que acabam por alterar a neurobiologia da dor. Sob circunstâncias patológicas em que a estimulação dos nociceptores encontra-se aumentada, a transmissão nociceptiva é alterada: mudanças no potencial de membrana celular levam à ativação de canais iônicos, como canais de sódio e canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), ocorrendo, então, um aumento na liberação de neurotransmissores, como o glutamato, e a facilitação da transmissão excitatória que, através da ativação de canais iônicos dependentes de voltagem ou operados por ligantes e da liberação de estoques intracelulares, produz elevação nos níveis de cálcio. O aumento da concentração de cálcio intracelular inicia inúmeros processos de sinalização celular. Dentre eles está a ativação direta ou indireta de uma série de proteínas cinases que podem, em primeira instância, produzir alterações pós-transcricionais, como a fosforilação de receptores e canais iônicos, e, em última instância, induzir à síntese de novas proteínas envolvidas na transmissão

nociceptiva (WOOLF E THOMPSON, 1991; WOOLF E COSTIGAN, 1999; revisado por JI E WOOLF, 2000). Tais eventos ocorrem em intervalos de tempo precisos durante o desenvolvimento da hiperalgesia e estão diretamente relacionados a alterações drásticas no fenótipo celular (expressão de neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores) e a mudanças estruturais, como a perda de interneurônios espinhais, rearranjos inapropriados de neurônios na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas nos gânglios sensoriais (WOOLF, SHORTLAND E COGGESHALL, 1992; MCLACHLAN et al., 1993; MOORE, BABA e WOOLF, 2000; MOORE et al., 2002). Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo e da etiologia da dor (DRAY URBAN E DICKENSON, 1994).

Embora compartilhem de mecanismos em comum, a dor de origem inflamatória e neuropática apresenta algumas características únicas. Por exemplo, a sensibilização decorrente da ação de mediadores inflamatórios como a bradicinina, a prostaglandina E₂ (PGE₂), a serotonina e a histamina nos nociceptores, embora presente na fase inicial da dor neuropática, é uma característica que predomina na dor inflamatória (TAIWO E LEVINE, 1989; 1992; RUEFF E DRAY, 1993; MIZUMURA, 1997). Por outro lado, a lesão de nervos periféricos produz atividade ectópica e espontânea de fibras sensoriais (WALL E GUTNICK, 1974; WALL E DEVOR, 1983, revisado por WOOLF E MANNION, 1999) e as torna sensíveis à estimulação pela noradrenalina (McLACHLAN et al., 1993). Ademais, parece haver diferenças quanto à participação de segundos mensageiros e de cascatas de sinalização celular na geração da dor inflamatória e da dor neuropática (HUCHO E LEVINE, 2007). É amplamente estudada a sinalização via adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

(AMPC) e ativação de proteína cinase A (*protein kinase A* - PKA) na geração de dor inflamatória (TAIWO et al., 1989; ALEY E LEVINE, 1999). Enquanto que a dor neuropática parece estar mais atrelada à ativação de determinadas isoformas da proteína cinase C (*protein kinase C* - PKC) (MAO et al., 1995; MALMBERG et al., 1997b; OHSAWA et al., 2000; 2001; YAJIMA et al., 2003). Por exemplo, em camundongos, a ablação do gene que codifica a isoforma neuronal da PKA que contém a subunidade regulatória RI β causa diminuição na nocicepção evocada por inflamação mas não altera a dor neuropática desses animais (MALMBERG et al., 1997a). Ainda, embora determinadas isoformas de PKC, como a isoforma epsilon (PKC ϵ), estejam envolvidas em processos de dor inflamatória (CESARE et al., 1996; 1999; ALEY et al., 2000), evidências apontam para uma ação quase que exclusiva da isoforma gama (PKC γ) nos mecanismos de dor neuropática (MAO et al., 1995; MALMBERG et al., 1997b; OHSAWA et al., 2001).

Tais diferenças justificam o uso de diferentes abordagens terapêuticas no tratamento da dor crônica inflamatória e neuropática. Por exemplo, a inibição da síntese de PGE₂ pelos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) é efetiva no tratamento da dor inflamatória mas não da neuropática. Ademais quadros de dor inflamatória respondem bem à morfina, que apresenta até mesmo eficácia analgésica superior nessas situações (STANFA E DICKENSON, 1995; PRZEWŁOCKI E PRZEWŁOCKA, 2001; OBARA et al., 2009). Já em situações de dor neuropática a morfina tem sua eficácia drasticamente reduzida (PRZEWŁOCKI E PRZEWŁOCKA, 2001; OBARA et al., 2009).

III.4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO: ANALGÉSICOS E ALVOS POTENCIAIS NO TRATAMENTO DA DOR CRÔNICA

A maioria dos analgésicos utilizados na clínica hoje foram descobertos de forma empírica ou tiveram seu uso baseado na medicina popular. É o caso das substâncias derivadas do ópio (morfina) e da casca do salgueiro (aspirina). Atualmente, com a identificação dos mecanismos neurobiológicos responsáveis por determinados tipos de dor, a descoberta de novos fármacos envolve a busca por moléculas capazes de atuar especificamente em alvos envolvidos na transmissão e modulação da dor crônica.

A identificação de proteínas cuja expressão ou função encontram-se alteradas em situações de sensibilização central tem revelado novos alvos para o tratamento da dor. Os receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) representariam alvos óbvios para o tratamento da dor crônica não fosse sua expressão disseminada no SNC, que determina o aparecimento de efeitos colaterais indesejados. (FELSBY et al., 1996; SCHOLZ E WOOLF, 2002). Assim, uma alternativa conveniente para conter a sensibilização central é a redução da transmissão glutamatérgica através da redução na liberação de glutamato pela inibição de CCDV. De fato, drogas capazes de bloquear CCDV tem demonstrado boa eficácia antinociceptiva em testes pré-clínicos e clínicos (MATTHEWS E DICKENSON, 2001; SNUTCH, 2005; YAKSH, 2006, MATTHEWS et al., 2007; MCGIVERN, 2007; MENG et al., 2008). Ademais, a expressão da subunidade regulatória $\alpha 2\delta$, que modula a atividade desses canais, está aumentada em neuropatias (GEE et al., 1996; LUO et al., 2001; 2002; NEWTON et al., 2001), achado que contribuiu consideravelmente para o uso do fármaco gabapentina e de seus congêneres (como a pregabalina),

originalmente desenvolvido para tratar convulsões, no tratamento da dor neuropática (LUO et al., 2002; DOOLEY et al., 2007). Ainda, a inibição de alterações pós-transcricionais pela inibição de proteínas cinases, como a PKA, PKC, CaMKII parece ser uma estratégia terapêutica interessante (TANG, SHUKLA E WANG, 2006b; CHEN et al., 2009). Por outro lado, a modulação de sistemas envolvidos no controle da transmissão nociceptiva, como o sistema opióide, continua sendo uma alternativa interessante para o tratamento da dor crônica (BALLANTYNE E MAO, 2003; ROSENBLUM et al., 2008).

III.4.1. O SISTEMA OPIOIDE

O sistema opióide consiste de três receptores MOR, DOR E KOR (também referidos como mu - μ , delta - δ e kappa - κ) e seus ligantes endógenos. O estudo do sistema opióide deriva do milenar uso do ópio, extraído das sementes da papoula – *Papaver somniferum* – cujo principal ingrediente ativo é a morfina (SNYDER E PASTERNAK, 2003).

O sítio de ligação para opióides foi identificado em 1973, por meio de ensaios de ligação específica, em preparação de membrana de cérebro de ratos, utilizando como radioligante a naloxona tritiada (PERT E SNYDER, 1973 - 14). Dois anos mais tarde, Hughes e Kosterlitz isolaram e sequenciaram os primeiros ligantes endógenos, dois pentapeptídeos, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met e Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (HUGHES E KOSTERLITZ, 1975), que foram batizados, pelos seus descobridores, ‘encefalinas’ – do grego, ‘na cabeça’. Ironicamente mais tarde se soube que a maior concentração de encefalina do corpo está situada na glândula adrenal (SNYDER E PASTERNAK, 2003). Muitos outros ligantes

endógenos foram identificados na sequência. Enkefalinas, dinorfinas, β -endorfinas e outros peptídeos, todos contendo em comum a seqüência N-terminal, Tyr-Gly-Gly-Phe –[Met/Leu], responsável pela interação com os receptores opióides (AKIL et al., 1998).

Os receptores opióides integram a família dos receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (SHACHAM et al., 2001). A ativação desses receptores, acoplados à proteína G inibitória (Go/Gi) - cuja ativação causa a inibição de CCDV e a ativação de canais de potássio retificadores de influxo de corrente (*inwardly rectifying potassium channel* - GIRK), resultando na redução da excitabilidade neuronal - é responsável pela ação antinociceptiva dos seus agonistas, como a morfina (LAW, WONG E LOH, 2000).

Os receptores opióides são amplamente expressos no sistema nervoso central e periférico, e regulam diversas funções fisiológicas, como a respiração, o trânsito gastro-intestinal e respostas imunológicas e endócrinas (LE MERRER et al., 2009). Sobretudo, esses receptores desempenham um papel central na dor. Técnicas autoradiográficas, de imunohistoquímica e de imagem permitiram o mapeamento dos receptores opióides em diversas áreas envolvidas na transmissão e modulação da dor (PERT, KUHAR E SNYDER, 1976; SHFROST et al., 1985; BESSE et al., 1990a; 1990b). Na medula espinhal, os receptores MOR, DOR e KOR são expressos, em grande parte, nas lâminas mais superficiais (I e II), sendo que os receptores MOR correspondem a maioria (70%). Os receptores MOR são predominantemente expressos, em torno de 70%, nos terminais pré-sinápticos de fibras C e A δ , enquanto que os 30% restantes são expressos em interneurônios e neurônios

de projeção (BESSE et al., 1990a; 1990b). Em áreas supraespinhais, como a PAG e a RVM, a expressão de receptores opióides está relacionada com a modulação da dor através da regulação do sistema descendente (FIELDS, 2004). Além disso, estruturas límbicas como a amígdala, de suma importância na modulação das emoções, exibem uma grande densidade de receptores opióides (PERT, KUHAR E SNIDER, 1976; HILLER et al., 1973). Da mesma maneira, a porção medial do tálamo, que manda informações a respeito do componente emocional da dor para áreas corticais, contém uma alta concentração desses receptores, apresentando aproximadamente 4 vezes mais receptores opióides do que a porção lateral do tálamo, envolvida no processamento de sensações táteis não dolorosas (HILLER, PEARSON E SIMON, 1973). A importância do sistema opióide no controle da dor é também evidenciada em estudos com animais *knockout* em que foi confirmada a participação dos receptores MOR, DOR e KOR e de seus ligantes endógenos na transmissão nociceptiva e salientado o papel essencial dos receptores MOR nos mecanismos de analgesia e tolerância à morfina (revisado por KIEFFER E GAVÉRIAUX-RUFF, 2002).

Logo, não é por acaso que poucos analgésicos são tão potentes e eficazes quanto a morfina. O uso de opióides como analgésicos é, no entanto, anterior à descoberta e caracterização dos seus receptores, data mais de 2000 anos, e até hoje a morfina continua sendo o tratamento de escolha para dores moderadas e intensas, como a dor relacionada ao câncer (FOLEY, 1985; BRUERA et al., 2004; ROSENBLUM et al., 2008). Uma das razões para tal escolha é que, além de reduzir a transmissão nociceptiva, a morfina também produz bem-estar e euforia, promovendo o completo alívio da dor. Apesar

disso, o uso crônico desse e de outros opióides para o tratamento de dores crônicas é limitado pelo desenvolvimento de tolerância analgésica (CORBETT et al., 2006; PUD et al., 2006; BALLANTYNE E SHIN, 2008).

Além do mais, o uso prolongado de opióides pode, paradoxalmente, produzir hiperalgisia (ARNER E MEYERSON, 1988; MAO, PRICE E MAYER, 1994; MAO, 2002; PUD et al., 2006; CHEN et al., 2009). A hiperalgisia induzida por opióides parece ser resultado da plasticidade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (MAYER et al., 1999; MAO E MAYER, 2001). Um conceito que tem ganho força recentemente é que o estado hiperalgésico decorrente da administração prolongada de opióides seria responsável pela diminuição do efeito da morfina com o seu uso crônico (OSSIPOV, 2003). Da mesma forma, o estado hiperalgésico decorrente da neuropatia seria responsável pela diminuição da eficácia da morfina na dor neuropática (MAO, PRICE E MAYER, 1995; MAO E MAYER, 2001). A tolerância a opióides seria, portanto, conseqüência da sensibilização central.

Diversos estudos têm mostrado que a hiperalgisia induzida por opióides compartilha de muitos mecanismos de neuroplasticidade comuns à neuropatia (MAO et al., 1995b; MAO, 1999; MAO, PRICE E MAYER, 1995; MAYER et al., 1999) e guarda semelhanças com a dor neuropática, apresentando-se como dor em choque e queimação, hiperestesia e hiperalgisia, que comumente se manifesta em áreas do corpo não relacionadas primariamente à queixa de dor que resultou na prescrição de opióides (revisado por BANNISTER E DICKENSON, 2010). De fato, a dor neuropática apresenta, por si só, tolerância a opióides (CHANG, CHEN E MAO, 2007). O tratamento de escolha para a maioria dos casos de dor neuropática é constituído de associações de

medicamentos como anticonvulsivantes, antidepressivos, anestésicos locais e alguns opióides (MENDEL E SAHENK, 2003; O'CONNOR E DWORKIN, 2009). No entanto, na maioria das vezes, esse tratamento não é satisfatório pois não proporciona o alívio completo da dor (GALLUZZI, 2007).

No final da década de 70, estudos com ω -conotoxinas obtidas do veneno de caramujos marinhos do gênero *Conus* (OLIVERA et al., 1985) impulsionaram a pesquisa básica e clínica de novos tratamentos para a dor crônica. Após mais de duas décadas de pesquisa, a versão sintética da ω -conotoxina MVIIA extraída do veneno do *Conus magus*, a ziconotida, foi aprovada para o uso em pacientes com dor crônica refratária a outros tratamentos. A ziconotida representa a primeira toxina peptídica extraída de veneno animal em uso na clínica para o tratamento da dor.

III.4.2. ZICONOTIDA - DO *CONUS MAGUS* PARA A CLÍNICA

A ω -conotoxina MVIIA foi originalmente descoberta pelo grupo de Baldomero Olivera, da Universidade de Utah, nos Estados Unidos, em 1979. Através da administração intracerebroventricular de toxinas provenientes de moluscos marinhos do gênero *Conus*, foram identificadas toxinas com ação neurotóxica em camundongos. A ação neurotóxica era manifestada como tremores, que iniciavam poucos minutos após a administração intracerebroventricular e cuja duração variava de acordo com a dose administrada (doses > 2 nmol/camundongo produziam tremores que duravam até 5 dias!). Essas toxinas, chamadas então de “*shaker peptides*” foram posteriormente caracterizadas como bloqueadores de CCDV (OLIVERA et al., 1985; OLIVERA et al., 1987).

A ω -conotoxina MVIIA é formada por uma cadeia de 25 aminoácidos interligados através de 3 pontes dissulfeto formadas por resíduos de cisteína (Cys; C), que estabilizam e definem a estrutura tridimensional do peptídeo (CHUNG et al., 1995; PRICE-CARTER et al., 1998). Tal estrutura apresenta uma porção na forma de uma dobradura compacta, formada pela ponte cistina (Cys-Cys) entre os resíduos Cys 8 e Cys15, contendo um resíduo de tirosina (Tyr ou Y) na posição 13, que é fundamental para a sua ligação em CCDV (OLIVERA et al., 1987).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a administração intratecal da ω -conotoxina MVIIA causa antinocicepção em modelos animais de dor crônica, inclusive, em alguns casos, com potência superior à morfina (BROSE et al., 1997). A atividade antinociceptiva observada em estudos com animais permitiu que a ziconotida fosse testada em ensaios clínicos nos Estados Unidos e na Europa para o tratamento de dores crônicas (SNUTCH, 2005). A natureza peptídica e o aparecimento de efeitos adversos (relacionados a sua ação no sistema simpático) limitam a administração sistêmica da ziconotida (MOLINSKI et al., 2009), que deve ser administrada por via intratecal, em regime de infusão lenta e contínua, com auxílio de bomba de infusão (STAATS, YEARWOOD E CHARAPATA, 2004; RAUCK et al, 2006; WALLACE, 2008). Em 22 de dezembro de 2004, a ziconotida (Prialt®) foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) e dois meses depois pela European Medicines Agency (EMA) para o tratamento de dores intensas, refratárias à morfina, em pacientes que requerem analgesia intratecal. A ação analgésica da ziconotida está relacionada ao bloqueio de CCDV do tipo N.

III.4.3. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os CCDV são classificados de acordo com suas propriedades biofísicas e farmacológicas em canais tipo L, N, P, Q, R (ativados por alta voltagem: ~ -30 mV) e T (ativados por baixa voltagem: ~ -60 mV). Os CCDV são ainda agrupados em três famílias, de acordo com o gene que codifica sua subunidade α_1 , que forma o poro do canal. Os genes da família Cav1 codificam canais do tipo L (Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4); os da família Cav3 codificam os canais do tipo T (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3) e os da família Cav2 codificam os canais do tipo N (Cav2.2), R (Cav2.3) e P/Q, sendo que os canais do tipo P e Q são variantes de *splicing* do gene Cav2.1 (BOURINET et al., 1999; CATTERALL 2000; EVANS E ZAMPONI, 2006). A subunidade formadora do poro permeável a íons cálcio, α_1 , compreende 4 domínios homólogos (I-IV), com 6 segmentos transmembrana (1-6) cada um. O segmento transmembrana 4, rico em resíduos de arginina, é o sensor de voltagem do canal, cujo poro é formado pela união dos segmentos transmembrana 5 e 6 dos 4 domínios. Tanto a porção N- quanto a C-terminal são citoplasmáticas. A subunidade α_1 dos membros da família Cav1 e Cav2 está associada às subunidades auxiliares β (codificada por 4 genes diferentes: β_1 - β_4), $\alpha_2\delta$ (codificada por 4 genes diferentes: $\alpha_2\delta$ -1 - $\alpha_2\delta$ -4) e, possivelmente, à subunidade γ (codificados por 8 genes diferentes: γ_1 - γ_8) (EVANS E ZAMPONI, 2006), que regulam a expressão e as propriedades biofísicas desses canais (ARIKKATH E CAMPBELL, 2003; KLUGBAUER et al., 2003). Além disso, as correntes de cálcio, especialmente as do tipo N e P/Q, podem sofrer modulação pela proteína G (DEWAARD et al., 1997; ZAMPONI et al., 1997; TEDFORD E

ZAMPONI, 2006), pela calmodulina (LEE et al, 1999; HALLING et al., 2006) e por proteínas cinases (SWARTZ, 1993; STEA et al., 1995; JIANG et al., 2008). Os CCDV se distribuem no sistema nervoso de acordo com as suas propriedades biofísicas. Os membros da família Cav2 são exclusivamente neuronais. Os CCDV do tipo N, P/Q e, em menor grau, do tipo R estão localizados em terminais pré-sinápticos, onde interagem com proteínas envolvidas na exocitose de vesículas sinápticas (JARVIS E ZAMPONI, 2001; MOCHIDA et al., 2003; revisado por ZAMPONI, 2003,). A ativação desses canais promove a liberação de neurotransmissores em várias áreas do sistema nervoso central, inclusive naquelas envolvidas na transmissão e modulação nociceptiva (WESTENBROEK et al., 1998; KNIGHT et al., 2002; HEINKE et al., 2004; MURAKAMI et al., 2004). Além disso, esses CCDV, estão envolvidos na neuroplasticidade que ocorre no sistema nervoso durante a dor crônica (ALTIER E ZAMPONI, 2004). De particular relevância, os CCDV localizados em terminais pré-sinápticos são alvo da porção $\beta\gamma$ do complexo trimérico ($\alpha\beta\gamma$) da proteína G acoplada aos receptores MOR. O bloqueio das correntes de cálcio pela porção $\beta\gamma$, juntamente com a ativação de canais de potássio, promove a diminuição da hiperexcitabilidade celular e a conseqüente ação analgésica da morfina (SWARTZ, 1993; DEWAARD et al., 1997; ZAMPONI et al., 1997; SOLDI E MOISES, 1998). Ademais, os CCDV também parecem estar envolvidos no desenvolvimento de tolerância a opióides (WELCH E OLSON, 1991; MICHALUK et al., 1998; DOGRUL et al., 2005; MENG et al., 2008).

O envolvimento dos CCDV do tipo N, P/Q e R na transmissão e modulação nociceptiva é evidenciado através do uso *in vivo* de toxinas peptídicas bloqueadoras desses canais. A participação dos CCDV do tipo N em

modelos animais de dor tem sido copiosamente estudada através da administração intratecal de ω -conotoxinas extraídas do veneno de moluscos marinhos do gênero *Conus* (GVIA, GVID, MVIIA) (revisado por LEWIS, 2009). Ainda que em menor número, estudos com bloqueadores de canais do tipo P/Q e do tipo R também demonstram a importância desses canais na transmissão nociceptiva em algumas situações, como por exemplo na dor neuropática (BAYER et al., 2004; SAEGUSA et al., 2000; LUVISETTO et al., 2006; MATTHEWS E DICKENSON, 2001; MATTHEWS et al., 2007).

A geração de animais nocaute para os CCDV do tipo N (SAEGUSA et al., 2001; SAEGUSA, MATSUDA E TANABE, 2002), P/Q (JUN et al., 1999; LUVISETTO et al. 2006) e R (SAEGUSA et al., 2000; SAEGUSA, MATSUDA E TANABE, 2002) também contribuíram para a análise dos diferentes canais na transmissão dolorosa. De particular importância, a ablação de qualquer um dos genes da família Cav2 - Cav2.1, Cav2.2 ou Cav2.3 - que codificam a subunidade α 1 dos canais do tipo P/Q, N ou R, respectivamente, reduz a hiperalgesia presente em modelo animal de neuropatia.

Em humanos, o bloqueio de canais do tipo N, pela administração intratecal de ziconotida, mostrou ser eficaz no tratamento de dores crônicas neuropáticas (WALLACE et al., 2006; RAUCK et al., 2006) e relacionadas ao câncer, de difícil tratamento, inclusive em casos de dor refratária à analgesia da morfina (STAATS, YEARWOOD E CHARAPATA, 2004). No entanto, a administração intratecal de ziconotida produz efeitos adversos tanto em animais como em humanos. Em animais são observadas disfunções motoras, como tremores e movimento serpenteado de cauda (OLIVERA et al., 1985; MALMBERG E YAKSH, 1994; 1995). Em humanos, a administração intratecal

de ziconotida produz, muitas vezes, efeitos relacionados à sua ação no sistema nervoso central, como vertigens, confusão mental, alucinações, alterações de humor, ataxia, alterações na marcha, náusea e vômitos (PENN E PAICE, 2000; WALLACE et al., 2006; 2008). De maneira interessante, o bloqueio de CCDV pela ziconotida não produz os sintomas relacionados ao bloqueio desses canais por drogas opióides, como depressão respiratória, constipação, euforia ou sedação (WALLACE et al., 2006). Ainda, a administração prolongada de ziconotida não causa tolerância analgésica (STAATS, YEARWOOD E CHARAPATA, 2004).

A ziconotida foi a primeira droga bloqueadora de CCDV aprovada para o uso clínico no tratamento de dores crônicas e representa uma forma inovadora de intervir nos mecanismos relacionados a dores crônicas resistentes à analgesia da morfina. No entanto, a sua reduzida janela terapêutica limita o tratamento de muitos pacientes. Logo, estratégias terapêuticas que minimizem o desenvolvimento de efeitos adversos decorrentes do uso da ziconotida ou, ainda, a descoberta de novos bloqueadores de CCDV com maior índice terapêutico são alternativas interessantes para o aprimoramento do tratamento da dor crônica. Venenos de animais peçonhentos são considerados fontes valiosas para a busca dessas moléculas.

III.5. VENENO DE ARANHAS: FONTE DE TOXINAS PEPTÍDICAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS

O veneno de aranhas é constituído por uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas. Eles contem moléculas orgânicas de baixo peso molecular (<1000 Da), como acilpoliaminas, uma variada gama de

polipeptídeos com peso molecular entre 3000 e 10000 Da e proteínas de alto peso molecular (>10000 Da). Os polipeptídeos, juntamente com as acilpoliaminas, representam o principal arsenal tóxico das aranhas, utilizados para paralisar e capturar as suas presas (ESCOUBAS et al., 2000). Essas moléculas, embora originalmente destinadas a atingir alvos moleculares em insetos, também reconhecem muitos receptores e canais iônicos de mamíferos, representando, por esse motivo, um arsenal farmacológico bastante interessante.

Os peptídeos provenientes do veneno de aranhas apresentam comumente uma estrutura tridimensional classificada como *inhibitory cystine knot* (ICK), formada por folhas β antiparalelas estabilizadas por um “nó” de cistina. Para tanto, a sequência de aminoácidos deve conter resíduos de Cys localizados em pontos estratégicos para estabelecer duas pontes dissulfeto como o ponto de sustentação central da molécula tridimensional, e uma terceira ponte cistina unindo a extremidade N-terminal com a superfície da alça (ou ‘loop’) resultante da dobradura da sequência primária (NORTON E PALLAGHY, 1998; ESTRADA et al., 2007), de acordo com o esquema mostrado na Figura 1. A sequência de aminoácidos exposta na alça externa da molécula é responsável pela ligação em diferentes canais iônicos (como canais de K^+ , Na^+ e Ca^{++} , por exemplo). Essa sequência é também capaz de reconhecer regiões além do poro do canal iônico e, dessa maneira, causar alterações nas propriedades cinéticas voltagem-dependentes do canal (ESTRADA et al., 2007). Coincidentemente, a estrutura da ω -conotoxina MVIIA apresenta estrutura tridimensional similar a de toxinas peptídicas presentes no

veneno de aranhas, contendo o mesmo padrão de pontes dissulfeto (CHUNG et al., 1995; MCGIVERN JG, 2007).

Além disso, algumas toxinas peptídicas isoladas de venenos de aranhas também bloqueiam os CCDV (ESCOUBAS et al., 2000). A aranha *Agelenopsis aperta* foi a primeira fonte de toxinas bloqueadoras de canais de cálcio identificada em veneno de aranha (ADAMS et al., 1993; ADAMS E OLIVERA, 1994). Conhecidas como ω -agatoxinas, a toxinas da *Agelenopsis aperta* são capazes de bloquear canais de cálcio do tipo L, P, Q e N, com alta afinidade e seletividade variável (OLIVERA et al., 1994). Em seguida, uma grande variedade de toxinas peptídicas bloqueadoras de CCDV foi descrita, como as ω -phonotoxinas isoladas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (REZENDE et al., 1991; CORDEIRO et al., 1993; GOMEZ et al., 1995; PRADO et al., 1996; GUATIMOSIN et al., 1997; MIRANDA et al., 1998; CASSOLA et al., 1998; LEÃO et al., 2000; VIERA et al., 2005), a ω -gramotoxina SIA isolada do veneno da tarântula *Grammostola spatulata* (LAMPE et al., 1993), a toxina SNX-325, isolada do veneno da aranha *Segestria florentina* (NEWCOMB et al., 1995), a toxina DW13.3, isolada do veneno da *Filistata hibernalis* (SUTTON et al., 1998). Uma importante descoberta, proveniente do veneno da tarântula *Hysteroocrates gigas*, foi uma toxina bloqueadora seletiva de CCDV do tipo R, chamada de SNX-482 (NEWCOMB et al., 1998), que permitiu a caracterização de correntes do tipo R em vários sistemas e proveu ferramenta para elucidar o envolvimento dos canais codificados pelo gene Cav2.3 (PIEDRAS-RENTERÍA E TSIEN, 1998) em modelo animal de dor neuropática (MATTHEWS et al., 2007; YANG E STEPHENS, 2009).

Devido ao grande e variado número de compostos farmacologicamente ativos presentes no seu veneno, as aranhas são consideradas por muitos aracnólogos “farmacêuticas de oito pernas” (ESCOUBAS et al., 2006; ESTRADAS, VILLEGAS E CORZO, 2007), daí o crescente interesse da academia e da indústria farmacêutica no veneno dessas preciosidades científicas.

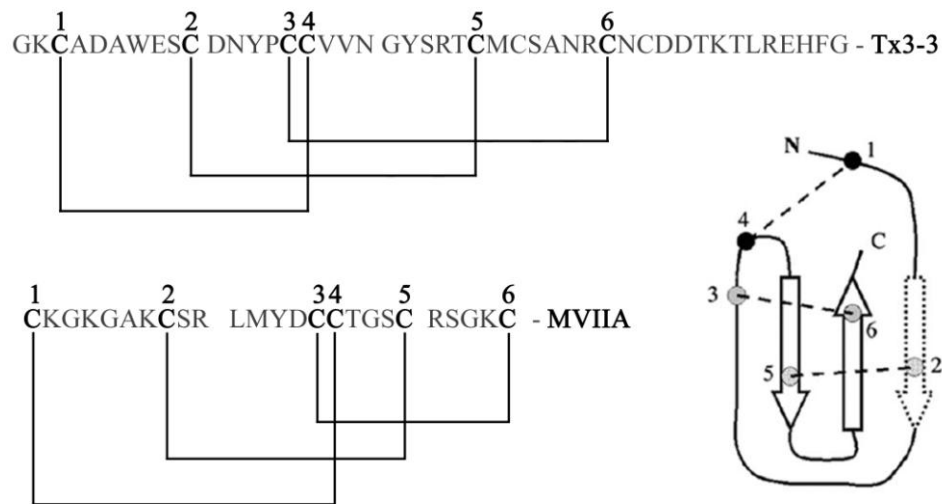


Figura 1. Sequência de aminoácidos da phonetoxina Tx3-3 e da ω -conotoxina MVIIA e estrutura tridimensional determinada pelo padrão *inhibitory cystine knot* – ICK.

III.5.1. *Phoneutria nigriventer*, A ARANHA ‘ARMADEIRA’ E SUAS PHONETOXINAS

“O povo conhece-a por ‘armadeira’ pois, quando ameaçada por um animal ou uma pessoa, costuma ‘armar-se para o bote’, isto é, coloca-se rapidamente em pé, encolhe os dois últimos pares de pernas como dois feixes de molas enrolados, eleva seu corpo em posição quase vertical, ergue as patas dianteiras e distende suas presas de veneno. Nessa ‘defesa armada’ observa atentamente todos os movimentos de seu inimigo, acompanhando-o com o balançar de seu corpo. Ai do incauto ou desavisado que, sem vê-la, lhe chegasse a uma distância de vinte ou trinta centímetros! Ela saltaria

incontinenti, encravando ferozmente na vítima seus curvos e pontiagudos ‘punhais’ veneníferos.”²

A aranha *Phoneutria nigriventer*, juntamente com as aranhas classificadas sob os gêneros *Latrodectus* (viúva negra) e *Loxosceles* (aranha marrom), integra o grupo das espécies de aranhas consideradas perigosas. O próprio nome *Phoneutria*, que quer dizer “feroz matadora”, já define o quão perigosa é esta aranha (PERTY, 1833 – revisado por BRASIL E VELLARD, 1985).

A *Phoneutria nigriventer* é comumente encontrada no sul e sudeste do Brasil. É um ser solitário, irascível – não tolerando nem mesmo a presença de companheiras da mesma espécie, errante – não constrói teia, seu sucesso como predadora se dá pela potência do seu veneno, crepuscular ou noturna – esconde-se durante o dia em locais escuros, entre folhagem de arbustos, dentro das bainhas das bananeiras, não raro nos sapatos, daí a ocorrência de um grande número de acidentes com essa aranha. A picada de uma armadeira é muito dolorosa. A dor é imediata, violenta, local no princípio, irradiando-se por todo o membro após alguns minutos e persistindo intensa durante horas. Em adultos, em geral, não é letal. Mas dependendo da quantidade de veneno injetado e do peso da vítima – crianças são mais suscetíveis, os sintomas evoluem além da dor, manifestando-se como febre, sudorese, câimbras, tremores, paralisia espástica, priapismo, arritmias, distúrbios visuais e, em casos raros, morte (BRAZIL e VELLARD, 1925; SCHEMBERG e LIMA, 1966; LUCAS, 1998).

² Trecho retirado do livro “Acúleos que matam”, escrito por Wolfgang Bücherl, que narra a sua experiência com animais peçonhentos no Instituto Butantã. Editora Livraria Kosmos, São Paulo, 1980, p. 35.

O poder tóxico do seu veneno se dá pelas diversas toxinas, capazes de interagir com canais iônicos, que o compõe. A porção tóxica do veneno é comumente dividida em 4 frações: PhTx1, PhTx2, PhTx3 e PhTx4 (REZENDE et al., 1991; CORDEIRO et al., 1990; 1992; 1993; FIGUEIREDO et al., 1995; GOMEZ et al., 2002). À parte a ação em canais de sódio, mediada por toxinas presentes na fração PhTx2 (ARAÚJO et al., 1993), que está diretamente relacionada à dor evocada pela inoculação do veneno, grande parte das ações neurotóxicas do veneno da armadeira são atribuídas às toxinas presentes na fração PhTx3 (CORDEIRO et al., 1993; GOMEZ et al., 2002). A administração intracerebroventricular dessa fração produziu paralisia flácida em camundongos (REZENDE et al., 1991), o que mais tarde foi atribuído à sua ação inibitória na liberação de neurotransmissores (GOMEZ et al., 1995; PRADO et al., 1996). A fração PhTx3 é composta por seis toxinas peptídicas (Tx3-1 a Tx3-6) que atuam quase que exclusivamente em canais de cálcio (Cordeiro, 1993). Exceto pela Tx3-1, que bloqueia correntes de potássio tipo IA (KUSHMERICK et al., 1999), as demais toxinas dessa fração inibem diferentes tipos de correntes de cálcio (PRADO et al., 1996; GUATIMOSIN et al., 1997; KALAPOTHAKIS ET AL., 1998; LEÃO et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2002; VIEIRA et al., 2005;). Uma delas, originalmente chamada de Tx3-6 e hoje conhecida como $Ph\alpha 1\beta$, bloqueia correntes de cálcio do tipo N (VIEIRA et al., 2006) e é tão eficaz quanto à ω -conotoxina MVIIA em causar antinocicepção em modelos animais de dor inflamatória e neuropática, porém com melhor janela terapêutica que a conotoxina (SOUZA et al 2008). A toxina Tx3-3, também presente na fração PhTx3 do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, é o alvo da presente tese.

A toxina Tx3-3 foi originalmente isolada por Cordeiro e colaboradores, em 1993. Foi uma das primeiras toxinas da fração PhTx3 que teve sua ação farmacológica estudada (GOMEZ et al., 2002). A Tx3-3 bloqueia correntes de cálcio em terminais pré-sinápticos e inibe a liberação de glutamato em preparações de sinaptossoma de encéfalo de ratos (PRADO et al., 1996; GUATIMOSIN et al., 1997). Essas ações são mediadas pelo bloqueio de canais de cálcio ativados por alta voltagem, descrito por LEÃO e colaboradores em 2000, que, por esse motivo, chamaram a Tx3-3 de ω -PhTx3-3. A Tx3-3 bloqueia os CCDV de maneira não seletiva, inibindo preferencialmente correntes do tipo P/Q e R (LEÃO et al., 2000).

A toxina Tx3-3 foi posteriormente clonada, por Cardoso e colaboradores (2003), e teve sua seqüência de aminoácidos deduzida: GKCADAWESCDNYPCCVVNGYSRTCMSANRCNCDDTKTLREHFG.

A seqüência de aminoácidos da Tx3-3 prediz uma estrutura tipo ICK e apresenta um resíduo de tirosina (Y) na posição 13, da mesma maneira que a ω -conotoxina MVIIA e a ω -conotoxina MVIIC (também isolada do veneno do *Conus magus*, que bloqueia CCDV do tipo P/Q e N, de forma não seletiva: >P/Q > N - HILLYARD et al., 1992).

A toxina Tx3-3 apresenta, portanto, características que a tornam um peptídeo em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos. Assim, o presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos antinociceptivo e adversos da toxina Tx3-3 em camundongos e ratos submetidos a modelos experimentais de dor.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas adultos (30-40 g) e ratos Wistar machos adultos (180-220 g), fornecidos pelo Bioterio Central da UFSM. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com livre acesso à água e ração. Os animais foram deixados ambientar ao local de experimentação por aproximadamente 1 hora antes dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações de cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais empregado e os estímulos utilizados foram o mínimo suficiente para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos e dos tratamentos empregados. O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa e Bem Estar Animal da UFSM e aprovado, estando registrado sob o número 23081.005024/2010-88.

IV.2. DROGAS

O isolamento, purificação e sequenciamento de aminoácidos da toxina Tx3-3 foram realizados na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, em colaboração com a Dra. Marta N. Cordeiro. A toxina Tx3-3 foi isolada da fração 3 (PhTx3) do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* e purificada por uma combinação de filtração em gel e cromatografia líquida de alta eficiência, de troca iônica, em fase reversa, tal como descrito previamente (CORDEIRO et al., 1993). A toxina Tx3-3 foi recebida na forma liofilizada e

dissolvida em salina tamponada com fosfato (PBS, composição mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10; pH 7,4) apenas no momento do uso. Após ser diluída, a solução de Tx3-3 foi alíquotada e armazenada, em eppendorfs siliconizados, a -20°C até o uso. Para minimizar a geração de resíduos, procurou-se preparar apenas a quantidade de drogas e reagentes necessária para a execução de cada experimento. A ω -conotoxina MVIIC foi obtida da Latoxan (Valence, França); Adjuvante completo de Freund (CFA), estreptozotocina (STZ), KN62 e sulfato de morfina foram obtidos da Sigma (USA).

IV.3. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

As toxinas Tx3-3 e ω -conotoxina MVIIC foram administradas por via intratecal ou intracerebroventricular. A administração intratecal (i.t.) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por HYLDEN E WILCOX (1980). Em suma, os animais foram imobilizados envoltos em uma toalha, e a injeção foi feita através da inserção de uma agulha (30 G_{1/2}) entre as vértebras L4 e L5. Um reflexo da cauda do animal foi o indicativo do posicionamento adequado da agulha no espaço subaracnóide da medula espinhal. A administração intracerebroventricular (i.c.v) foi feita à mão livre, visando atingir o ventrículo lateral direito ou esquerdo (de forma aleatória), de acordo com as coordenadas propostas por LAURSEN E BELKNAP (1986). As injeções i.t. e i.c.v foram feitas em um volume de 5 μ l/sítio, quando em camundongos, ou em 10 μ l/sítio, quando em ratos. A administração da morfina e da estreptozotocina foi feita por via intraperitoneal (i.p.), em um volume de 10 e 1 ml/Kg, em camundongos e ratos, respectivamente. O CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor) foi administrado por via subcutânea (s.c.) na região plantar

da pata traseira direita, em um volume de 20 µl/sítio. As toxinas Tx3-3 e ω-conotoxina MVIIC foram dissolvidas em PBS (pH 7,4); o inibidor da CaMKII, KN62, em DMSO (1%); a morfina em salina (NaCl 0,9%); a STZ em tampão citrato (pH 4,5) e o CFA em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida.

IV.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

IV.4.1. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DE DOR

IV.4.1.1. TESTE DA RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK TEST – TF)

A nocicepção aguda, evocada por estímulo térmico, foi medida através do teste da retirada da cauda, segundo metodologias descritas por D'AMOUR E SMITH (1941) e HARGREAVES et al. (1988).

Em um grupo de experimentos, os animais foram submetidos ao teste de imersão da cauda em água quente (D'AMOUR E SMITH, 1941), que consistiu na medida do tempo que o animal permanece com a cauda submersa num banho-maria com água a $48 \pm 1^\circ$ C, temperatura que determina uma latência de retirada basal média de 10 ± 2 s, o que permite a detecção tanto de hiperalgesia quanto de analgesia nos animais. Os resultados foram expressos como % latência basal, da seguinte maneira:

$\% \text{latência basal} = (\text{latência após o tratamento} - \text{latência basal}) / (\text{latência basal}) \times 100.$

Em outro grupo de experimentos, foi projetado um estímulo térmico radiante na cauda dos animais e medida a latência da resposta de retirada (HARGREAVES et al., 1988). A intensidade do estímulo térmico foi suficiente para obter uma latência de retirada média de 10 ± 2 s, ideal para a detecção

tanto de hiperalgesia quanto de analgesia. Os resultados foram expressos em segundos (s) ou como máximo efeito possível (%MPE), calculado da seguinte maneira: $\%MPE = (\text{latência após o tratamento} - \text{latência basal}) / (40 - \text{latência basal}) \times 100$.

Para ambos os testes, a medida de latência de retirada da cauda foi determinada, através da média de duas medidas isoladas, antes do tratamento (latência basal) e em diferentes tempos após o tratamento. Afim de evitar dano tecidual, foi permitido um tempo máximo de exposição à fonte de calor de 40 s em ambos os testes.

IV.4.1.2. TESTE DO VON FREY

A alodínia mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (0,02-10 g e 2-100g para camundongos e ratos, respectivamente). O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de *up-and-down* de DIXON (1980), de acordo com CHAPLAN et al. (1994). Para isso, a pata traseira dos animais foi estimulada com um de uma série de filamentos de von Frey com incrementos logarítmicos crescentes. O primeiro filamento utilizado foi aquele que normalmente é capaz de evocar a resposta de retirada em 50% dos animais testados (0,4 g em camundongos e 15 g em ratos). O filamento era aplicado durante 5 segundos. Na ausência de retirada da pata, a resposta foi considerada negativa, e o próximo filamento, mais calibroso, era então utilizado. No caso de resposta de retirada positiva, o filamento imediatamente menos calibroso era então aplicado. Foi considerada como resposta positiva a retirada da pata do contato com o filamento ou comportamento de sacudir ou lamber a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Em casos de

ambulação ou de movimentos não relacionados à resposta nociceptiva no momento da aplicação do filamento, a resposta foi considerada ambígua, e foi realizada nova estimulação. Foram realizadas 6 medidas, com um intervalo de aproximadamente 30 segundos entre cada uma. No caso de 4 respostas positivas ou negativas desde a primeira aplicação, o teste era finalizado (CHAPLAN et al., 1994). O conjunto de 6 ou 4 respostas obtido foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (DIXON, 1980), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10^{[X_f + k\delta]}$$

onde X_f = valor do último filamento de von Frey usado (em log); k = valor tabelado

para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1980); δ = diferença média (em log) entre os estímulos (0,4695).

Uma redução significativa do limiar 50% de resposta dos animais foi considerada alodínia mecânica.

IV.4.2. AVALIAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS

IV.4.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA

IV.4.2.1.1. TESTE DE LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (ROTAROD)

A coordenação motora de camundongos foi avaliada pelo teste de locomoção forçada, que permite verificar se o tratamento produz ataxia (DUNHAM E MIYA, 1957). O cilindro giratório (*rotarod*) consiste em um cilindro de 3,7 cm de diâmetro que gira em uma velocidade constante de 8 rpm. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram treinados no rotarod. O treino consistiu em forçar o animal a andar no aparato sem cair, durante 1

minuto ininterrupto. No dia do teste, os animais foram colocados no cilindro giratório e durante 2 minutos foi contado o número de quedas e a latência para a primeira queda de cada animal. A administração de morfina em altas doses (70 nmol/sítio, i.t. e 35 nmol/sítio, i.c.v), capazes de causar ataxia (LUGER et al., 1995) foi utilizada como controle positivo do teste.

IV.4.2.1.2. TESTE DO REFLEXO DE ENDIREITAMENTO (RIGHTING REFLEX TEST)

O aparecimento de flacidez muscular nos camundongos após a administração das toxinas por via i.t. ou i.c.v. foi avaliada através da observação do reflexo de endireitamento, de acordo com o método descrito por (LUVISETTO et al, 2006). O teste parte do princípio de que quando posicionado com o dorso voltado para baixo o camundongo imediatamente apresenta o reflexo de endireitamento, que nada mais é do que retornar à posição normal, com o dorso voltado para cima. Logo, o teste consistiu em posicionar o animal na horizontal, com o dorso voltado para a bancada e cronometrar o tempo gasto para retornar à posição normal.

IV.4.2.2. AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS MOTORES ANORMAIS

Foi observado o aparecimento de comportamentos anormais atribuídos ao bloqueio de CCDV, como paralisia, flacidez muscular, tremores, giros em sentido horário ou anti-horário e serpenteado de cauda (OLIVERA et al., 1985; REZENDE et al., 1991; MALMBERG E YAKSH, 1994). Os dados foram expressos como a relação entre o número de animais que manifestaram qualquer um dos comportamentos acima citados e o número total de animais avaliados.

IV.5. MODELOS ANIMAIS DE DOR CRÔNICA

IV.5.1. MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

O modelo experimental de inflamação crônica foi induzido através da injeção intraplantar de 20 µl de CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor e diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida) em camundongos previamente anestesiados por inalação de halotano (2-3 minutos), de acordo com FERREIRA et al (2001). O desenvolvimento de alodínia mecânica foi avaliado através do teste de von Frey.

A toxina Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) foi administrada imediatamente antes (pré-tratamento) ou 48 horas após (pós-tratamento) a administração de CFA.

IV.5.2. MODELOS DE DOR NEUROPÁTICA

IV.5.2.1. MODELO DE NEUROPATIA CAUSADA POR TRAUMA

O modelo de dor neuropática produzida por trauma foi produzido através da lesão parcial do nervo ciático, de acordo com a metodologia descrita por SELTZER et al. (1990), para ratos, e adaptada por MALMBERG e BASBAUM (1998), para camundongos. Para tanto, os camundongos foram anestesiados com cetamina + xilazina (90 + 3 mg/Kg, i.p.) e então foi feita uma pequena incisão na região glútea, a musculatura entre o íliaco e o músculo glúteo foi divulsionada e o nervo ciático exposto. Utilizando a agulha do fio cirúrgico 8-0, 1/3 a 1/2 do nervo foi perfurado e amarrado. Como grupo controle, um grupo de animais passou por todo o procedimento cirúrgico acima descrito, exceto pelo fato do nervo ciático, embora tenha sido exposto, não ter sido amarrado. Por

esse motivo o grupo controle foi chamado de grupo falso-operado. Sete dias após a indução da neuropatia, o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica foi verificado através do teste do von Frey e da retirada da cauda, respectivamente.

IV.5.2. 2. MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA

O modelo de dor neuropática produzido por diabetes foi feito através da administração sistêmica de estreptozotocina em camundongos (200 mg/kg, i.p.) e ratos (50 mg/kg, i.p.), de acordo com metodologia descrita por OHSAWA E KAMEI (1999) e CALCUTT E CHAPLAN (1997), respectivamente. O valor de glicemia (medida pelo sistema de tiras dosadoras de glicemia Accu-Check, Roche Diagnostics, Brazil) e o desenvolvimento de alodínia mecânica (avaliada no teste de von Frey) foram medidos 15 e 21 dias após a administração de STZ em camundongos e ratos, respectivamente. Apenas os animais que apresentaram valores de glicemia > 300 mg/dl (CALCUTT E CHAPLAN, 1997) e limiar de resposta a estímulo mecânico reduzido (caracterizando alodínia mecânica) foram incluídos no grupo de animais neuropáticos.

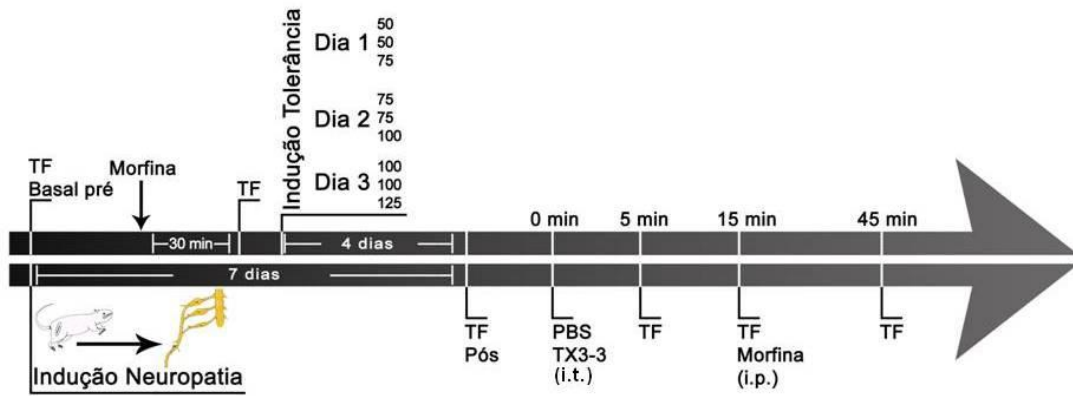
IV.6. MODELO DE TOLERÂNCIA A OPIÓIDE

A tolerância a opióides foi induzida utilizando o protocolo de administração repetida de morfina, descrito por MARSHALL E WEINSTOCK (1971). O protocolo consistiu na administração de doses crescentes de morfina (50+50+75;75+75+100;100+100+125 mg/kg, i.p.) durante 3 dias. Em suma, os camundongos receberam 3 injeções intraperitoneais de morfina por dia, com um intervalo de 4 a 5 horas entre cada injeção. Foi administrado 50, 50 e 75

mg/Kg de morfina no primeiro dia; 75, 75 e 100 mg/Kg no segundo dia, e assim sucessivamente. O incremento de 25 mg/kg na última injeção de cada dia do tratamento teve como propósito minimizar a precipitação de síndrome de abstinência durante a noite. No quarto dia, o limiar térmico dos camundongos foi verificado através do teste da retirada da cauda, (HARGREAVES et al., 1988) e então os animais receberam a dose-desafio de morfina (10 mg/kg, i.p.) e tiveram seu limiar térmico novamente mensurado, afim de verificar o desenvolvimento de tolerância.

Um dia antes de iniciar o protocolo de indução de tolerância os camundongos tiveram seus limiares térmicos medidos e foi então administrada morfina (10 mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal. Trinta minutos após a administração, os animais foram novamente submetidos ao teste de retirada da cauda a fim de verificar a resposta antinociceptiva usual da morfina. Os animais foram então divididos em dois grupos; um grupo recebeu administrações repetidas de salina e o outro de morfina por 3 dias (MARSHALL E WEINSTOCK, 1971). No quarto dia, os animais receberam PBS (5 µl/sítio) ou Tx3-3 (30 pmol/sítio) por via intratecal 15 minutos antes da administração da dose-desafio de morfina (10 mg/Kg, i.p.). Foi medida a latência de retirada da cauda de ambos os grupos aos 5, aos 15 e aos 45 (ou 30 minutos após a administração de morfina) minutos após a administração das drogas por via intratecal.

O protocolo de administração de drogas executado no quarto dia (Tx3-3 i.t. + morfina i.p.) foi também utilizado na avaliação da Tx3-3 na hiperalgesia térmica induzida por neuropatia, conforme o esquema a seguir.



Desenho experimental para avaliação da Tx3-3 em modelos de dor resistentes a opióides; TF = teste da retirada da cauda.

IV.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do teste t de Student ou por análise de variância (ANOVA) de uma via, *post-hoc* teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ou de duas vias, *post-hoc* teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E COLATERAIS PRODUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE TX3-3 E ω -CONOTOXINA MVIIC EM CAMUNDONGOS

A administração intratecal da toxina Tx3-3 causou antinocicepção no teste de retirada da cauda. O valor de DE_{50} estimado a partir da curva dose-resposta (1-100 pmol/sítio) foi de 8,8 (4,1-18,8) pmol/sítio e o efeito máximo (E_{max}), obtido a partir da administração de 30 pmol/sítio de Tx3-3, foi de $51 \pm 14\%$ de aumento na latência de retirada da cauda em relação à latência basal (Figura 1A). Esse efeito foi observado aos 5 minutos após a administração e cessou em aproximadamente 15 minutos (Figura 1B). É importante salientar que não foi observada diferença na duração ou na magnitude do efeito da Tx3-3 entre camundongos machos e fêmeas ($46 \pm 9\%$ e $56 \pm 17\%$ de E_{max} observado em camundongos machos e fêmeas, respectivamente). A administração intratecal de Tx3-3 não causou disfunção motora nem mesmo numa dose 10 vezes maior que a dose efetiva (300 pmol/sítio).

A ausência de alterações na coordenação motoras foi confirmada através do teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Tabela 1). Ademais, os animais administrados com Tx3-3 não tiveram o reflexo de endireitamento alterado em relação ao grupo controle (os animais tratados com Tx3-3 e PBS demoraram $0,11 \pm 0,02$ e $0,12 \pm 0,03$ segundos para retornar à posição normal, respectivamente).

A seguir, foi testado o efeito da administração intratecal da ω -conotoxina MVIIC, uma toxina extraída do veneno do molusco *Conus magus*, capaz de

bloquear CCDV de forma não seletiva similar à Tx3-3, mas com maior afinidade por canais que permeiam correntes do tipo P/Q e N (HILLYARD et al., 1992; MCDONOUGH et al., 1996). A administração de 300 pmol/sítio de ω -conotoxina MVIIC, embora tenha produzido um acentuado aumento no limiar de resposta a estímulo térmico nos primeiros 15 minutos (Figura 1D), causou efeitos tóxicos. Esses efeitos tornaram-se evidentes cerca de 20 minutos após a administração e manifestaram-se como uma flacidez muscular que evoluiu para paralisia nos membros inferiores. Tal disfunção motora foi quantificada através do teste do reflexo de endireitamento. Os animais administrados com a ω -conotoxina MVIIC tiveram o reflexo de endireitamento alterado ($2,78 \pm 0,67$ segundos) em relação ao grupo administrado com PBS ($0,12 \pm 0,03$ segundos). A maioria (6/8) dos animais administrados com 300 pmol/sítio de ω -conotoxina MVIIC apresentou paralisia dos membros inferiores, a qual foi reversível em 24 horas (a duração de tal efeito não foi sistematicamente observada). Com a administração de uma menor dose de ω -conotoxina MVIIC – 100 pmol/sítio – não foi observado efeito no teste de antinocicepção térmica (Figura 1C) e, como demonstrado na Tabela 1, o aparecimento de efeitos motores foi menos freqüente. Devido à condição motora alterada, os animais administrados com a ω -conotoxina MVIIC não foram submetidos ao teste de locomoção forçada em cilindro giratório.

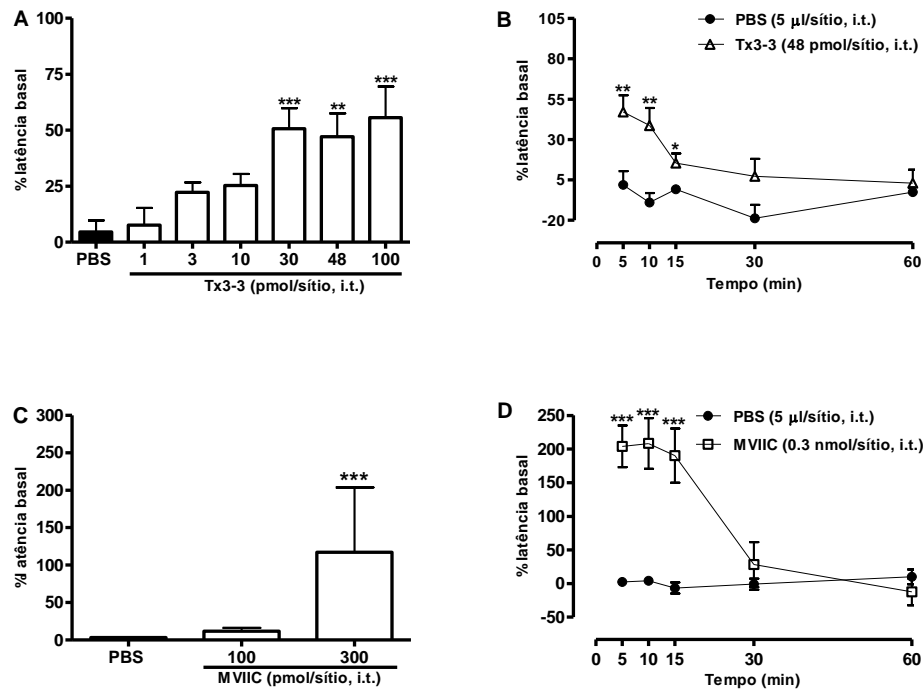


Figura 1. Efeito antinociceptivo produzido pela administração i.t. de Tx3-3 ou ω -conotoxina MVIIC no teste de retirada da cauda. Curva dose-resposta (A e C) e decurso temporal do efeito antinociceptivo (B e D) causado pela administração i.t. de Tx3-3 (1-100 pmol/sítio) ou MVIIC (100-300 pmol/sítio) em camundongos. Os resultados estão expressos como %latência basal. Nos casos de curva dose-resposta, o %latência basal foi calculado aos 5 minutos. Cada coluna ou ponto representam a média de 6 a 9 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada utilizando ANOVA de uma (A e C) ou de duas vias (B e D) seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle (tratado com PBS).

V.2. EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E COLATERAIS PRODUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECEREBROVENTRICULAR DE Tx3-3 E ω -CONOTOXINA MVIIC EM CAMUNDONGOS

A ação da toxina Tx3-3 em áreas supraespinhais, através da administração por via intracerebroventricular, também produziu efeito antinociceptivo no teste de retirada da cauda. De maneira similar à administração intratecal, o efeito foi observado a partir dos 5 minutos e durou aproximadamente 10 minutos (Figura 2B). O valor de DE_{50} , estimado a partir da curva dose-resposta (1-30 pmol/sítio), foi de 3,7 (1,6-8,4) pmol/site e o E_{max} foi de $84 \pm 16\%$ de aumento na latência de retirada da cauda em relação à latência basal (Figura 2A).

A administração de até 300 pmol/sítio de Tx3-3 por via i.c.v não causou efeitos colaterais perceptíveis. Afim de confirmar a ausência de efeitos na atividade motora dos animais, os mesmos foram testados no teste de locomoção forçada em cilindro giratório. Como demonstrado na Tabela 1, a administração intracerebroventricular de Tx3-3 (1-300 pmol/sítio) não alterou a performance dos animais no teste, enquanto que a morfina (35 nmol/sítio, i.c.v.), utilizada como controle positivo do teste, piorou o desempenho dos animais no rotarod.

O efeito causado pela administração intracerebroventricular da toxina Tx3-3 foi também comparado com aquele produzido pela administração supraespinhal de ω -conotoxina MVIIC. A ω -conotoxina MVIIC causou efeito antinociceptivo, com potência, eficácia e duração similar ao produzido pela administração de Tx3-3 (Figura 2C e 2D). A DE_{50} , calculada a partir da curva dose-resposta (0,3-3,0 pmol/sítio) de ω -conotoxin MVIIC, foi de 0,6 (0,1-2,8)

pmol/sítio e o E_{max} foi de $62 \pm 13\%$ de aumento no limiar térmico em relação ao limiar basal.

Porém, diferente da Tx3-3, a administração i.c.v de ω -conotoxin MVIIC causou efeitos colaterais a partir da dose de 10 pmol/sítio. Foi observado comportamento anormal (giros no contralaterais ao lado da injeção), tremor, fraqueza muscular e alteração na coordenação motora em poucos minutos após a administração. (Tabela 1). A administração de 100 e 300 pmol/sítio de ω -conotoxin MVIIC produziu disfunção motora grave, o que impossibilitou testar os animais no teste de locomoção forçada em cilindro giratório.

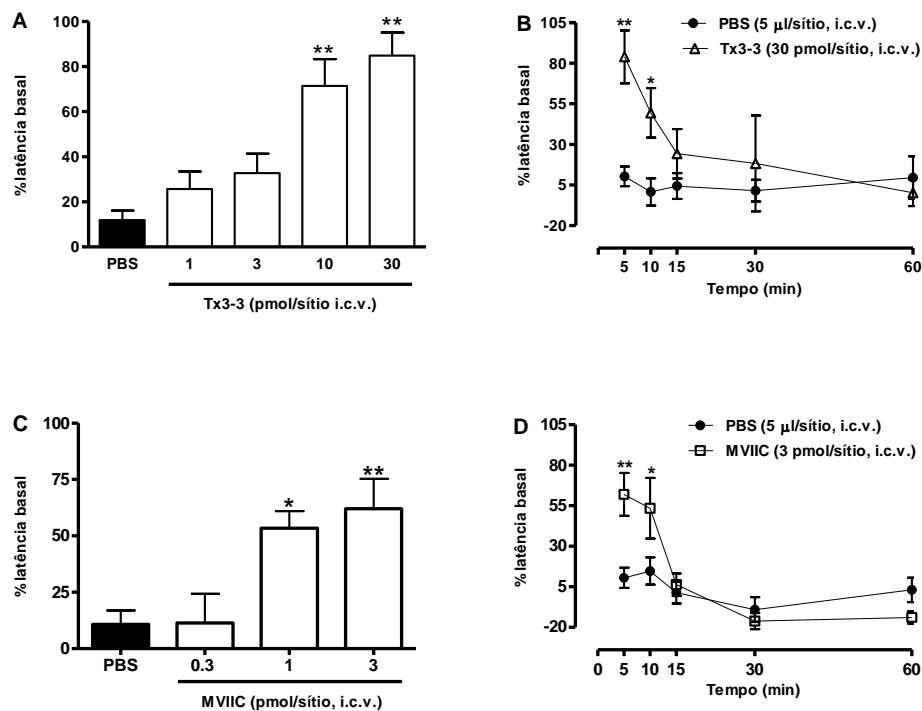


Figura 2. Efeito antinociceptivo produzido pela administração i.c.v. de Tx3-3 ou ω -conotoxina MVIIC no teste de retirada da cauda. Curva dose-resposta (A e C) e decurso temporal do efeito antinociceptivo (B e D) causado pela administração i.c.v. de Tx3-3 (1-30 pmol/sítio) ou MVIIC (0,3-3 pmol/sítio) em camundongos. Os resultados estão expressos como %latência basal. Nos casos de curva dose-resposta, o %latência basal foi calculado aos 5 minutos. Cada coluna ou ponto representam a média de 8 a 11 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada utilizando ANOVA de uma (A e C)

ou de duas vias (B e D) seguida do teste post-hoc de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente. *P<0,05 e **P<0,01 denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle (tratado com PBS).

Tabela 1. Efeitos colaterais produzidos pela administração intratecal ou intracerebroventricular de Tx3-3 ou MVIIC em camundongos

Tratamento/via	Dose (pmol/sítio)	Tremor	Flacidez Muscular	Paralisia	Rotarod: nº de quedas	Rotarod: Latência (s)
PBS/i.t.		–	–	0/6	0,9 ± 0,4	84,3 ± 14,3
Morfina/i.t.	70 x 10 ³	–	–	0/5	3,0 ± 0,9***	31,6 ± 6,6*
Tx3-3/i.t.	1	0/5	0/5	0/5	0,4 ± 0,2	99,8 ± 12,5
	3	0/4	0/4	0/4	0,3 ± 0,3	108,3 ± 11,8
	10	0/4	0/4	0/4	0,3 ± 0,3	94,8 ± 25,3
	30	0/4	0/4	0/4	0,5 ± 0,3	115,0 ± 5,0
	48	0/4	0/4	0/4	0,8 ± 0,6	85,0 ± 22,1
	100	0/4	0/4	0/4	0,8 ± 0,5	96,6 ± 15,7
	300	0/4	0/4	0/4	0,2 ± 0,5	106,4 ± 13,6
MVIIC/i.t.	100	0/6	2/6	2/6	–	–
	300	0/8	6/8	6/8	–	–
PBS/i.c.v.		–	–	0/6	0,8 ± 0,7	93,5 ± 16,8
Mofina/i.c.v.	35 x 10 ³	–	–	0/4	7,8 ± 1,8***	25,3 ± 13,7*
Tx3-3/i.c.v.	1	0/6	0/6	0/6	0,2 ± 0,2	112,5 ± 7,5
	3	0/6	0/6	0/6	0,3 ± 0,2	91,2 ± 18,9
	10	0/5	0/5	0/5	0,8 ± 0,6	91,0 ± 18,7
	30	0/5	0/5	0/5	0,8 ± 0,4	86,6 ± 14,4
	100	0/6	0/6	0/6	0,7 ± 0,4	98,8 ± 13,8
	300	0/6	0/6	0/6	1,3 ± 0,5	74,6 ± 20,5
MVIIC/i.c.v.	0,3	0/5	0/5	0/5	0,8 ± 0,4	92,2 ± 14,2
	1	0/5	0/5	0/5	1,6 ± 0,6	60,8 ± 17,2
	3	0/6	0/6	0/6	0,6 ± 0,3	92,0 ± 38,9
	10	3/4	3/4	0/4	7,3 ± 2,5**	40,3 ± 26,7
	30	6/8	6/8	0/8	4,8 ± 2,3*	7,3 ± 3,0**
	100	3/3	3/3	0/3	–	–
	300	2/2	2/2	0/2	–	–

Os dados estão expressos como média ± erro padrão ou como a relação entre o número de animais afetados e o número total de animais avaliados (n = 2 a 8 animais). *P<0,05, **P<0,01 ***P<0,001 denotam diferença significativa em relação ao grupo tratado com PBS; ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

Uma vez que a administração intratecal e intracerebroventricular de Tx3-3 produziu efeitos semelhantes, a via intratecal - utilizada na clínica para a administração de fármacos analgésicos – foi escolhida para a administração de Tx3-3 nos demais experimentos.

V.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 EM MODELO ANIMAL DE DOR INFLAMATÓRIA

Foi avaliado o efeito da administração intratecal de Tx3-3 em modelo de dor inflamatória induzida por CFA. Para tanto, foi administrado 20 µl de CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor) na pata direita traseira dos camundongos e a toxina Tx3-3 foi administrada no momento da indução do processo inflamatório (imediatamente antes da injeção do CFA), ou 48 horas após a indução. Na Figura 3 pode-se observar que a administração intraplantar de CFA produziu um decréscimo significativo no limiar de reposta dos animais ao estímulo mecânico, desde os primeiros minutos após a injeção, caracterizando o desenvolvimento de alodinia mecânica. Contudo, a administração de 30 pmol/sítio de Tx3-3 imediatamente antes (Figura 3A) ou 48 horas após a injeção de CFA (Figura 3B) não alterou a alodínia desses animais. A administração intratecal de Tx3-3 (30 pmol/sítio) também não alterou a sensibilidade mecânica normal dos animais, avaliada pelo teste de von Frey (Figura 3C).

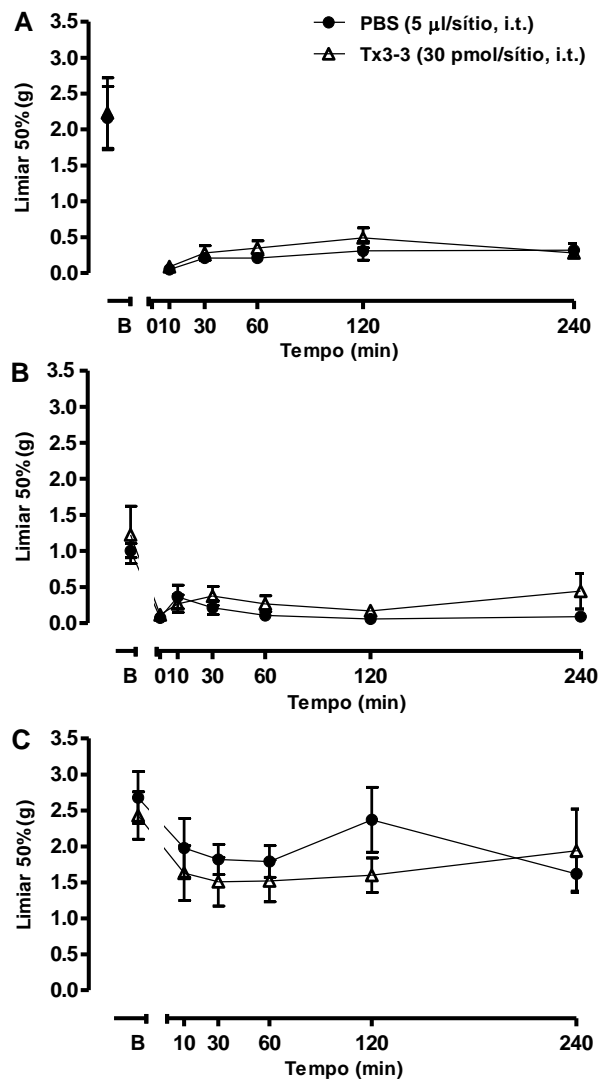


Figura 3. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 em modelo de dor inflamatória crônica. (A) Efeito do pré-tratamento com Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na alodínia mecânica causada por CFA (20 µl/paw) em camundongos. (B) Efeito do pós-tratamento com Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na alodínia mecânica prduzida por CFA (20 µl/paw) em camundongos. (C) Efeito da administração intratecal de Tx3-3 (30 pmol/sítio) na sensibilidade mecânica de camundongos. Os resultados estão expressos como Limiar 50%, em gramas (g). Cada ponto representa a média de 8 a 11 animais e a linha vertical expressa o erro padrão. A análise estatística foi avaliada através de ANOVA de duas vias.

V.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA

A ligação parcial do nervo ciático de camundongos causou alodínia mecânica, caracterizada pela diminuição do limiar de resposta ao estímulo mecânico de $1,46 \pm 0,25$ g para $0,19 \pm 0,05$ g (Figura 4A). O grupo falso-operado não teve o limiar de resposta ao estímulo mecânico alterado (o limiar de resposta 50% foi de $1,85 \pm 0,33$ g e $2,21 \pm 0,29$ antes e depois do procedimento cirúrgico, respectivamente). A administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) reduziu a alodínia mecânica desde os 30 minutos após a sua administração (46 ± 13 % de inibição), e foi efetiva por 1 hora (53 ± 22 % de inibição).

A administração de Tx3-3 também reduziu a alodínia mecânica causada por neuropatia diabética (Figuras 4B). Os camundongos tratados com STZ apresentaram, aos 15 dias após a administração de STZ, valor de glicemia aumentado ($455,0 \pm 17,5$ mg/dl e $125,5 \pm 4,8$ mg/dl para o grupo tratado com STZ e grupo controle, respectivamente), e alodínia mecânica (limiar de resposta 50% de $2,68 \pm 0,36$ g e $0,73 \pm 0,23$ g para o grupo tratado com STZ e o grupo controle, respectivamente) em relação ao grupo controle. A administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) reduziu a alodínia mecânica dos camundongos diabéticos. O efeito anti-alodínico da Tx3-3 foi observado a partir de 30 minutos (69 ± 9 % de inibição), atingiu seu ponto máximo em 1 hora (83 ± 15 % de inibição) e foi observado até 2 horas após a administração (57 ± 11 % de inibição).

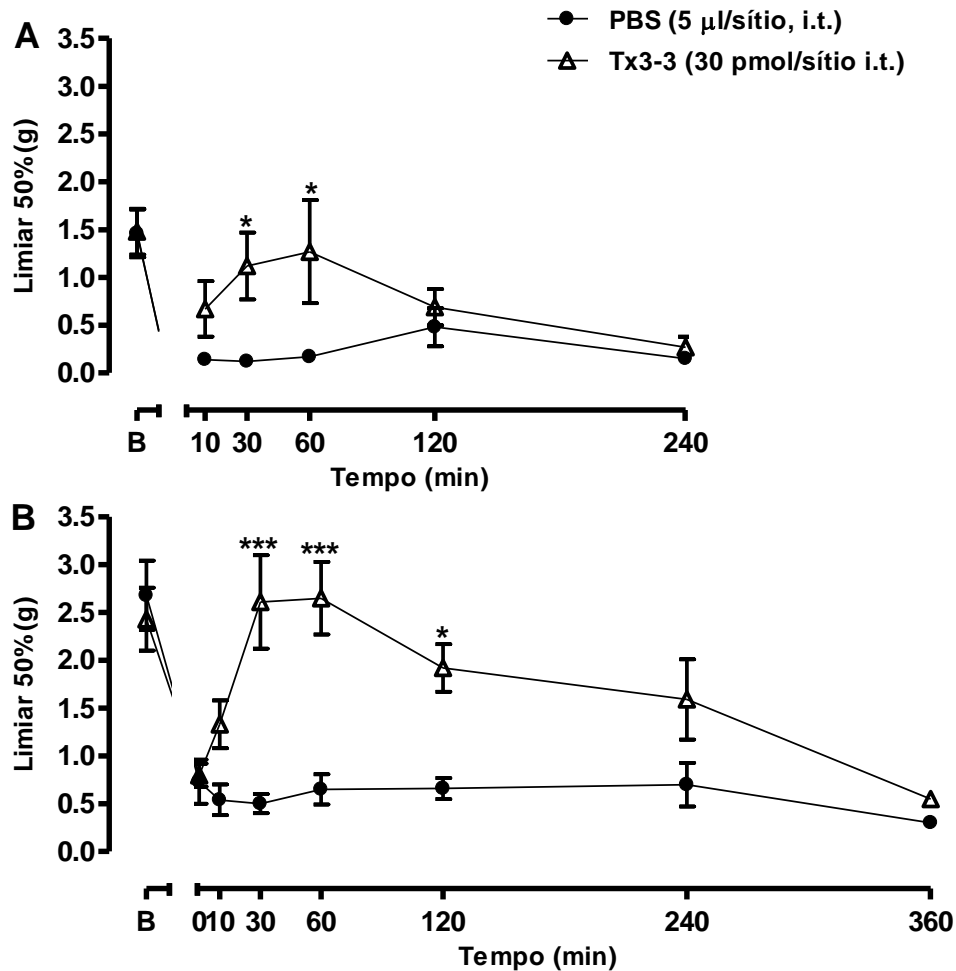


Figura 4. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 em modelo de dor neuropática. (A) Efeito da Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na alodínia produzida por modelo de dor neuropática causada por trauma em camundongos. (B) Efeito da Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na alodínia causada por neuropatia diabética em camundongos. Os resultados estão expressos como limiar 50%, em gramas (g). O Limiar 50% foi medido 7 (A) ou 15 (B) dias após a indução de neuropatia. Cada ponto representa a média de 7 a 11 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada utilizando ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle (tratado com PBS).

De maneira similar, a administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio,i.t.) reduziu a alodínia mecânica de ratos diabéticos. Nos ratos tratados com STZ, foi verificado valor de glicemia aumentado ($488,5 \pm 41,4$ mg/dl e $120,4 \pm 12,1$ mg/dl para o grupo diabético e o grupo controle, respectivamente) e alodínia mecânica (limiar de resposta 50% de $8,1 \pm 1,3$ g, e $27,5 \pm 4,8$ g para o grupo

diabético e controle, respectivamente) 21 dias após o tratamento com STZ. Embora tenha sido observado efeito significativo desde os 10 minutos após a administração ($70 \pm 19\%$ de inibição), tanto a eficácia quanto a duração do efeito anti-alodínico da Tx3-3 em ratos foi similar ao verificado em camundongos (Figura 5A). A administração intratecal de Tx3-3 também não alterou a sensibilidade mecânica de ratos (Figura 5B)

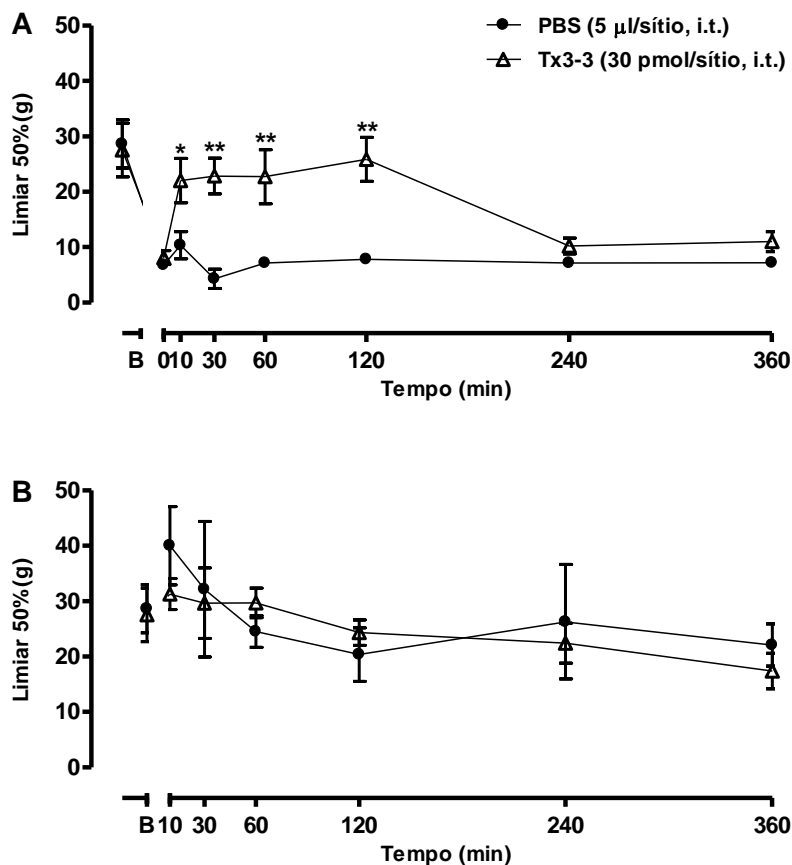


Figura 5. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 em modelo de dor neuropática causada por diabetes em ratos. (A) Efeito da Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na alodínia causada pela neuropatia diabética em ratos. (B) Efeito da administração intratecal de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na sensibilidade mecânica de ratos. Os resultados estão expressos como limiar 50%, em gramas (g) e foram medidos 21 dias após a indução de neuropatia. Cada ponto representa a media de 5 a 6 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada utilizando ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. * $P < 0,5$ e ** $P < 0,01$ denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle (tratado com PBS).

V.5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE Tx3-3 NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA

Embora fármacos opióides sejam, em geral, o tratamento de escolha em casos de dor intensa, o uso desses medicamentos para o tratamento de dores crônicas é limitado pelo aparecimento de tolerância analgésica. Além disso, em algumas circunstâncias, como por exemplo em alguns casos de dor neuropática, a morfina apresenta eficácia analgésica reduzida. Por esse motivo, foi testado o efeito da administração intratecal de Tx3-3 na antinocicepção causada pela administração sistêmica de morfina, numa dose em que esse opióide não apresenta boa eficácia antinociceptiva e em situações em que há diminuição da eficácia antinociceptiva da morfina.

V.5.1. EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE Tx3-3 NA ANTINOCICEPÇÃO CAUSADA PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE UMA DOSE SUBEFETIVA DE MORFINA

Inicialmente foi avaliado o efeito antinociceptivo de diferentes doses de morfina no teste de retirada da cauda, afim de determinar a dose subefetiva desse opióide. A DE_{50} da morfina, calculada a partir da curva dose-resposta (1 – 30 mg/kg, i.p.) foi de 7,5 (4,6 – 12,4) mg/kg e o E_{max} , observado 30 minutos após a sua administração, foi de $76,2 \pm 16,5\%$. Como pode ser observado na Figura 6B, a dose de 3 mg/kg de morfina não causou antinocicepção significativa no teste da retirada da cauda. A seguir, os camundongos foram administrados por via intratecal com Tx3-3 (30 pmol/sítio) e após 15 minutos (momento em que não há mais efeito da Tx3-3 no limiar de resposta a estímulo térmico – Figura 6A) foram injetados com morfina (3 mg/kg, i.p.). A pré-administração de Tx3-3 aumentou efeito antinociceptivo obtido pela

administração de 3 mg/Kg de morfina (o %MPE passou de $5,14 \pm 4,02$ para $63,47 \pm 10,01$ quando Tx3-3 foi previamente administrada – Figura 6C). A seguir, foi investigado se a administração intratecal de uma dose de Tx3-3 (10 pmol/sítio, i.t.) que não causa efeito no limiar de resposta a estímulo térmico (Figura 6A) também seria capaz de aumentar a eficácia da morfina. Como demonstrado na Figura 6D, a administração intratecal de Tx3-3 na dose de 10 pmol/sítio, assim como a dose de 30 pmol/sítio, melhorou a eficácia da morfina (%MPE de $34,79 \pm 13,57$).

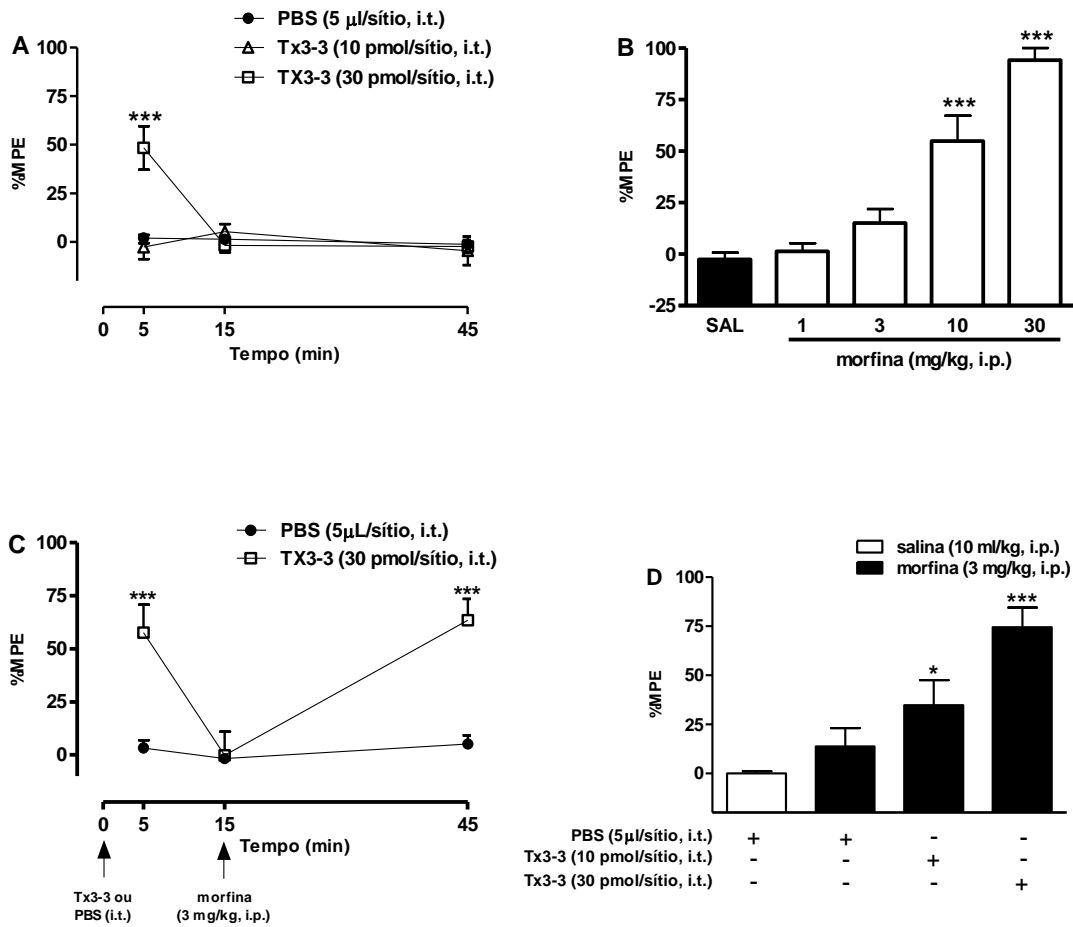


Figura 6. Administração intratecal de Tx3-3 causa aumento na eficácia antinociceptiva da morfina. (A) Decurso temporal do efeito da Tx3-3 (10 e 30 pmol/sítio, i.t.) no teste de retirada de cauda em camundongos. (B) Curva dose-resposta (1-30 mg/Kg, i.p.) do efeito antinociceptivo da morfina no teste de retirada da cauda em camundongos. (C) Efeito da administração intratecal de Tx3-3 (30 pmol/sítio) 15 minutos antes da administração de morfina (3 mg/Kg, i.p.) no teste da retirada de cauda em camundongos. (D) Efeito da administração intratecal de Tx3-3 (10 e 30 pmol/sítio, i.t.) 15 minutos antes da da administração de morfina (3 mg/Kg, i.p.) no teste da retirada de cauda em camundongos. Os resultados estão expressos como % MPE. Os dados da curva dose-resposta foram calculados 30 minutos após a administração de morfina. Cada coluna ou ponto representam a média de 5 a 9 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada através de ANOVA de duas (A e C) ou uma (B e D) via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni e de Student-Newman-Keuls, respectivamente. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle (PBS em A,C e D e salina em B).

V.5.2. EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE Tx3-3 NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA EM ANIMAIS TOLERANTES A OPIÓIDES

O próximo passo foi avaliar se a administração intratecal da Tx3-3 também seria capaz de melhorar a resposta antinociceptiva da morfina em camundongos tolerantes a opióides. Para tanto, após a indução de tolerância a opióides, foi administrada Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) e após 15 minutos os camundongos foram desafiados com 10 mg/kg de morfina. Como demonstrado na Figura 7C a administração de Tx3-3 foi capaz de restabelecer o efeito antinociceptivo da morfina em camundongos tolerantes (o %MPE da morfina foi de 37.3 ± 8.3 and 30.0 ± 11.0 em camundongos não tolerantes e tolerantes tratados previamente com Tx3-3, respectivamente). Além da tolerância antinociceptiva (o %MPE da morfina diminui de $60,8 \pm 11,3$ to $6,8 \pm 1,9$ após a indução de tolerância – Figura 7B), o protocolo de administração repetida de morfina causou uma queda no limiar de resposta a estímulo térmico (a latência de retirada da cauda diminui de 10.8 ± 1.6 s para 4.5 ± 0.5 s), o que caracteriza hiperalgesia térmica (Figura 7A). Como pode ser visto na Figura 7D, a administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t) antes da administração sistêmica de morfina (10 mg/Kg, i.p.) não apenas reverteu o estado hiperalgésico, como também foi efetiva em recuperar a eficácia antinociceptiva da morfina nos camundongos tolerantes a opióides.

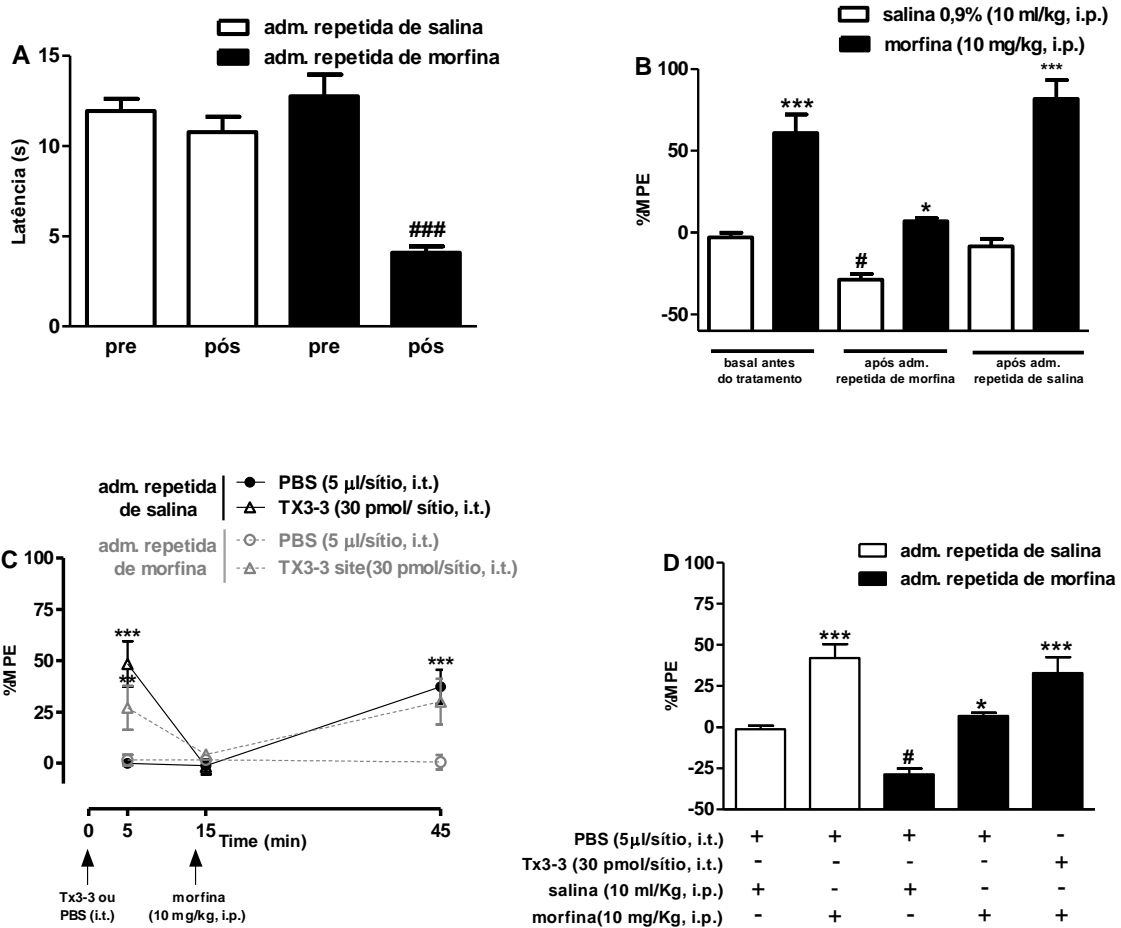


Figura 7. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 na eficácia analgésica da morfina em camundongos tolerantes a opióides. (A) Limiar de resposta a estímulo térmico em camundongos antes e depois da indução de tolerância a opióides. (B) Eficácia analgésica da morfina (10 mg/kg, i.p.) antes e depois da indução de tolerância a opióides. (C) Efeito da administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na eficácia analgésica da morfina (10 mg/Kg, i.p.) em camundongos submetidos ao modelo de tolerância a opióides. (D) Efeito da administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) 15 minutos antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) na hiperalgesia térmica causada pelo modelo de tolerância a opióides. Os resultados estão expressos como % MPE. Cada coluna ou ponto representam a media de 8 a 10 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. Os símbolos * e # denotam os níveis de significância em comparação aos grupos controle. *P<0,05 e ***P<0,001 referem-se à diferença significativa em relação ao grupo tratado com salina (B) ou PBS (C e D); # P<0,05 refere-se à diferença significativa em relação ao tratamento com salina – grupo não-tolerante.

V.5.3. EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DE Tx3-3 NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA EM ANIMAIS NEUROPÁTICOS

Uma vez que o desenvolvimento de tolerância à morfina está relacionado a mecanismos de neuroplasticidade na medula espinhal semelhantes aos envolvidos na dor neuropática (MAYER et al., 1999), foi investigado o efeito da administração intratecal de Tx3-3 em camundongos submetidos ao modelo de neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo ciático (SELTZER et al., 1990; MALMBERG E BASBAUM, 1998) .

Assim como os camundongos submetidos ao protocolo de indução de tolerância a opióides, os camundongos submetidos ao modelo experimental de neuropatia por compressão do nervo ciático apresentaram hiperalgesia térmica (a latência de retirada da cauda diminuiu de $11,5 \pm 1,95$ para $6,22 \pm 0,78$ s), aos 7 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 8A). Como demonstrado na Figura 8B, a hiperalgesia térmica foi acompanhada de redução na eficácia antinociceptiva da morfina (o %MPE da morfina foi de $58,4 \pm 10,2$ to $2,7 \pm 3,0$ em camundongos falso-operados e camundongos neuropáticos, respectivamente). O efeito da Tx3-3 foi avaliado através do mesmo desenho experimental utilizado para testar o efeito da toxina em animais tolerantes. De maneira similar aos achados em animais tolerantes, a administração prévia Tx3-3 promoveu um aumento na resposta antinociceptiva da morfina (o %MPE da morfina foi de $2,6 \pm 3,6$ e $53,8 \pm 11$ em camundongos neuropáticos tratados com Tx3-3 ou PBS, respectivamente – Figura 8C e 8D).

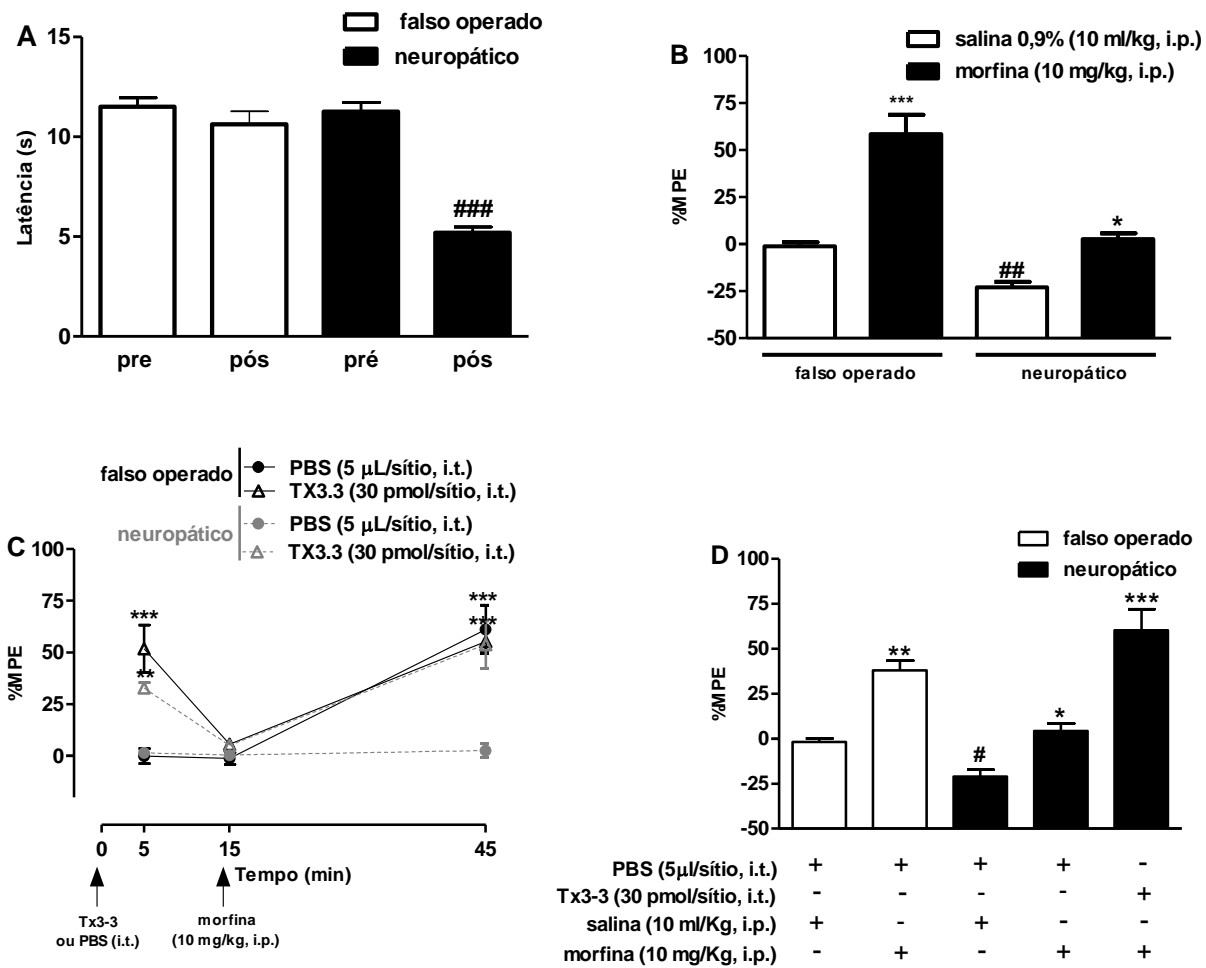


Figura 8. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 na eficácia analgésica da morfina em camundongos neuropáticos. (A) Limiar de resposta a estímulo térmico em camundongos falso-operados e camundongos neuropáticos. (B) Eficácia analgésica da morfina (10 mg/kg, i.p.) em camundongos falso-operados e camundongos neuropáticos. (C) Efeito da administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) na eficácia analgésica da morfina (10 mg/Kg, i.p.) em camundongos neuropáticos. (D) Efeito da administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) 15 minutos antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) na hiperalgesia térmica induzida por neuropatia. Os resultados estão expressos como % MPE. Cada coluna ou ponto representam a media de 6 a 9 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. Os símbolos * e # denotam os níveis de significância em comparação aos grupos controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ referem-se à diferença significativa em relação ao grupo tratado com salina (B) ou PBS (C e D); # $P < 0,05$ refere-se à diferença significativa em relação ao grupo falso-operado.

VI. DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

O veneno da aranha *Phoneutria nigreventer* apresenta uma vasta gama de toxinas com propriedades farmacológicas interessantes, e constitui, deste modo, uma fonte de ferramentas farmacológicas e de fármacos com potencial para o uso clínico. A toxina Tx3-3, isolada da fração peptídica 3, PhTx3, do veneno da aranha armadeira, demonstrou, na série de experimentos aqui descritos, ser um peptídeo em potencial para o tratamento da dor neuropática ou para aquelas dores que, assim como a produzida por neuropatia, não respondem bem à analgesia da morfina.

A primeira parte do presente estudo (manuscrito 1- Apêndice C) destinou-se a analisar o efeito da administração espinal e supraespinal da toxina Tx3-3 em teste de nocicepção aguda, além de modelos animais de dor crônica inflamatória e neuropática e avaliar o possível desenvolvimento de efeitos motores indesejáveis produzidos pela administração dessa toxina. Em seguida, foi avaliado o efeito da administração intratecal de Tx3-3 em modelos de dor resistentes à analgesia da morfina.

A administração i.t. e i.c.v da toxina Tx3-3 causou efeito antinociceptivo no teste da retirada de cauda, um teste que avalia a ação de drogas na nocicepção aguda, evocada por estímulo térmico. O efeito da administração espinal ou supraespinal da Tx3-3 foi fugaz, com pico de ação observado aos 5 minutos e duração de aproximadamente 15 minutos. A transmissão da dor aguda envolve a liberação de glutamato em sítios espinais e supraespinais (DMITRIEVA et al., 2004; MARABESE et al., 2007). Em estudos anteriores, a Tx3-3 demonstrou ser capaz de inibir o influxo de cálcio (GUATIMOSIM et al.,

1997; MIRANDA et al., 1998) e a liberação de glutamato em preparação de sinaptosoma de encéfalo de ratos (PRADO et al., 1996; GUATIMOSIM et al., 1997). Esses efeitos foram posteriormente atribuídos à inibição de correntes de cálcio do tipo P/Q e R exercida pela Tx3-3 (LEÃO et al., 2000). De fato, os CCDV do tipo P/Q e R regulam o influxo de cálcio e a liberação de neurotransmissores em sítios espinhais e supraespinhais (MILLER, 1987; OLIVEIRA et al., 1994). Portanto, a ação inibitória da Tx3-3 na liberação de glutamato dependente de cálcio justifica a sua ação antinociceptiva no teste de retirada da cauda. É importante salientar que a resposta de retirada da cauda, embora pareça um simples arco-reflexo, é controlada por estruturas supraespinhais que modulam o sistema descendente da dor (WALL, 1967; BASBAUM E FIELDS, 1984; FIELDS, HEINRICHER E MASON, 1991) e, portanto, o efeito antinociceptivo observado pela administração i.c.v da Tx3-3 provavelmente se deve ao bloqueio dos CCDV alvo dessa toxina localizados em estruturas supraespinhais, como a RVM e a PAG, que medeiam a ativação do sistema descendente facilitatório da dor através da liberação de neurotransmissores como o glutamato (SAEGUSA et al., 2000; PORRECA, OSSIPOV E GEBHART, 2002; URBAN et al., 2005).

Além do efeito na nocicepção aguda, foi avaliado o eventual aparecimento de efeitos motores indesejáveis, já relatados em estudos com ω -conotoxinas bloqueadoras de CCDV (OLIVEIRA et al., 1985; MALMBERG et al., 1994), após a administração i.t. e i.c.v da Tx3-3. Além disso, os efeitos da administração da Tx3-3 foram comparados aos produzidos pela administração da ω -conotoxina MVIIC, uma toxina peptídica extraída do veneno do molusco *Conus magus* que, de maneira similar à Tx3-3, inibe a liberação de glutamato

dependente de cálcio (PRADO et al., 1996), pelo bloqueio não seletivo de CCDV, com preferência para correntes de cálcio do tipo P/Q (HILLYARD et al., 1992; MCDONOUGH et al., 1996). A administração i.t. ou i.c.v da ω -conotoxina MVIIC, embora efetiva no teste da retirada de cauda, produziu inúmeros efeitos adversos, como paralisia flácida e tremores, outrora relatados por Olivera e colaboradores (OLIVERA et al., 1985). Esses e outros efeitos motores observados não foram produzidos pela administração de até 300 pmol/sítio de Tx3-3, uma dose pelo menos 10 vezes maior que a dose capaz de produzir antinocicepção no teste da retirada da cauda. É possível especular que a melhor janela terapêutica da Tx3-3 em comparação a da ω -conotoxina MVIIC se deva à ação da phonetoxina em CCDV do tipo R (LEÃO et al., 2000), que desempenham considerável papel na transmissão nociceptiva (SAEGUSA et al., 2000; SAEGUSA, MATSUDA E TANABE, 2002; MATTHEWS et al., 2007) mas, diferente dos CCDV do tipo P/Q (JUN et al., 1999), não estão essencialmente envolvidos na transmissão motora (WESTENBROEK, HOSKINS E CATTERALL, 1998; JUN et al., 1999; SAEGUSA et al., 2000). Alternativamente, a Tx3-3 pode estar operando em variantes de *splicing* de CCDV do tipo P/Q que não são acessíveis à ω -conotoxina MVIIC (BOURINET et al. 1999; GRAVES et al., 2008).

Outro ponto interessante a ser discutido é que, embora tenha aumentado momentaneamente o limiar de resposta a estímulo térmico, a administração intratecal da toxina Tx3-3 não alterou a sensibilidade mecânica dos animais. Essa diferença pode ser explicada pelo padrão de expressão dos CCDV alvo da Tx3-3 em diferentes fibras sensoriais. Normalmente a resposta a estímulo térmico nocivo é determinada pela ativação de fibras C peptidérgicas,

enquanto que a ativação de fibras C não peptidérgicas e fibras A δ produz resposta a estímulos mecânicos nocivos (D'MELLO E DICKENSON, 2008; CAVANAUGH et al., 2009; SCHERRER et al., 2009). Fisiologicamente, os CCDV do tipo N e R são expressos em fibras C peptidérgicas (WESTENBROEK, HOSKINS E CATTERALL, 1998; FANG et al., 2007), enquanto que os CCDV do tipo P/Q predominam nos terminais sinápticos de fibras A δ e fibras C não peptidérgicas (WESTENBROEK, HOSKINS E CATTERALL, 1998). Logo é possível supor que, em estado fisiológico, a ação antinociceptiva da Tx3-3 seja resultado do bloqueio de CCDV do tipo R. Já em situações patológicas, como em casos de neuropatia, ocorrem mudanças fenotípicas, como a alteração na expressão de CCDV e rearranjos de fibras nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (WOOLF, SHORTLAND E COGGESHALL, 1992; MANNION et al., 1996; KOERBER et al., 1999; YUSAF et al., 2001; ABE et al., 2002; UMEDA et al., 2006). Tais alterações justificam a ocorrência de alodínia e podem ser responsáveis pelo efeito mais duradouro da Tx3-3 na alodínia mecânica produzida por neuropatia.

Ainda, o perfil de ação da Tx3-3, fugaz em situação fisiológica e prolongada nos modelos de neuropatia, sugere uma ação tipo 'bloqueio dependente de estado', já descrita para alguns anestésicos locais que agem em canais de sódio (HILLE, 1977; HONDEGHEM E KATZUNG, 1977) e para drogas antiarrítmicas bloqueadoras de CCDV do tipo L (BEAN, 1984), em que a ligação da droga ao seu receptor é mais forte e duradoura quando o receptor encontra-se em um determinado estado conformacional. Os canais iônicos dependentes de voltagem, como os CCDV, podem ser encontrados em um de três estados conformacionais: o estado de repouso (fechado), o estado ativado

ou de condução (aberto) e o estado inativado, que é o estado intermediário entre o estado aberto e o estado fechado do canal (CARBONE E SWANDULLA, 1990; ZHANG et al., 1994). Uma vez no estado de inativação, o canal torna-se refratário a nova estimulação durante certo intervalo de tempo. Portanto, o estado de inativação define a duração da resposta do canal a um determinado estímulo e também é responsável pela proporção de canais disponíveis para ativação em certo período (ZHANG et al., 1994; STOTZ, JARVIS E ZAMPONI, 2003). Considerando a hipótese do bloqueio dependente de estado, a toxina Tx3-3 teria uma maior afinidade e maior constante de dissociação para o CCDV no estado de inativação. Essa característica já foi demonstrada para algumas ω -conotoxinas bloqueadoras de CCDV (STOCKER et al., 1997; BERECKI et al., 2010) e é interessante já que o bloqueio dependente de estado é mais provável durante períodos de alta frequência de estimulação dos canais – já que o acesso à conformação inativa do canal é mais provável durante sucessivos e repetitivos períodos de estado de ativação/inativação – que são encontrados, por exemplo, em estados patológicos, como na dor neuropática, mas são bem menos frequentes em situações fisiológicas (WINQUIST, PAN E GRIBKOFF, 2005). Logo, um perfil de ação dependente de estado é relevante para o desenvolvimento de fármacos com bom perfil de segurança. É o caso das dihidropiridinas, bloqueadores CCDV do tipo L, amplamente utilizadas na clínica por apresentarem uma excelente janela terapêutica, que se deve, provavelmente à sua ligação preferencial aos CCDV no estado de inativação (BEAN et al., 1984). Enquanto que a ziconotida, cuja ação não parece ser dependente de estado, uma vez que o bloqueio de CCDV do tipo N por essa ω -conotoxina

ocorre tanto no estado inativado quanto no estado ativado ou de repouso (FENG et al., 2003), apresenta uma estreita janela terapêutica (SNUTCH, 2005, WALLACE et al., 2008). Contudo, mais estudos são necessários para a caracterização da ação da Tx3-3 em estados neuronais hiperexcitados.

A dor neuropática é caracterizada pelo estado hiperexcitado de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (JI E WOOLF, 2001), iniciada pela liberação de neurotransmissores excitatórios dos terminais sinápticos das fibras nociceptivas, através da ativação de CCDV (YAKSH, 2006). De fato, uma série de estudos tem demonstrado a participação de CCDV em mecanismos espinhais envolvidos na dor neuropática (CHAPLAN et al. 1994; KOSTYUK, PRONCHUK E SHMIGOL, 1995; SAEGUSA et al., 2000; MATTHEWS E DICKENSON, 2001; YUSAF et al., 2001; LUVISETTO et al., 2006; YANG E STEPHENS, 2009). Em um recente estudo, foi demonstrado, através de medidas eletrofisiológicas *in vivo*, que o aumento das descargas pós-sinápticas de neurônios do corno dorsal da medula espinhal causado por ligação do nervo espinhal é, em grande parte, mediado por adaptações nas correntes de cálcio do tipo R, uma vez que o bloqueador dessas correntes, a toxina SNX 482, teve eficácia superior em condições de dor neuropática (MATTHEWS et al., 2007). Da mesma maneira, adaptações nas correntes de cálcio do tipo R decorrentes da neuropatia podem explicar o bom perfil terapêutico da Tx3-3. Outro importante aspecto subjacente à dor neuropática é a alteração fenotípica de fibras sensoriais produzida pela modificação dos canais iônicos que as compõem, como os CCDV (YUSAF et al., 2001; LUO et al., 2002 YAKSH, 2006; YANG E STEPHENS, 2009; FOSSAT et al., 2010). De particular importância, estudos demonstram o aumento na expressão da subunidade $\alpha 1$

de CCDV do tipo P/Q em neurônios de pequeno, médio e grande calibre no DRG e na medula espinhal de ratos e camundongos submetidos ao modelo de diabetes por administração de STZ (YUSAF et al., 2001; UMEDA et al., 2006). De acordo, a toxina Tx3-3 exibiu efeito antinociceptivo bastante semelhante em camundongos e ratos submetidos ao modelo de neuropatia diabética induzida por STZ. Além disso, há uma significativa homologia entre os CCDV de diferentes espécies, incluindo os de camundongos, de ratos e humanos (SNUTCH, 2005), o que não apenas ressalta a importância desses canais ao longo da evolução como também justifica o efeito da Tx3-3 em camundongos e ratos. Além disso, atualmente tem-se enfatizado a importância da inserção de animais machos e fêmeas em estudos de dor (MOGIL, 2009). Desta maneira, no presente estudo foi incluído ambos os gêneros de animais. Através dos testes utilizados, não foram identificadas diferenças na resposta basal dos animais, nem na magnitude ou na duração do efeito da Tx3-3 entre machos e fêmeas.

O efeito antinociceptivo da Tx3-3 em modelos de dor neuropática não apenas a torna uma toxina em potencial para o tratamento da dor neuropática como também evidencia a participação de CCDV do tipo P/Q e R nessa doença, cujo tratamento representa um desafio para os clínicos, já que é refratária aos fármacos analgésicos convencionais, inclusive à morfina.

Na medula espinhal, os receptores opióides são expressos, em grande parte, nas lâminas mais superficiais (I e II), sendo que os receptores MOR, alvos da morfina, são predominantemente expressos nos terminais pré-sinápticos de fibras C e A δ (BESSE et al., 1990a; 1990b). Logo, a analgesia mediada por opióides, tanto endógenos quanto exógenos está, em grande

parte, relacionada com a inibição da liberação de neurotransmissores, através da ação inibitória em CCDV (LOMBARD E BESSON, 1989; BOURINET et al., 1996). De acordo com estudos que demonstram que o bloqueio de CCDV do tipo P/Q e R aumentam o efeito antinociceptivo da morfina (FUKUIZUMI, OHKUBO E KITAMURA, 2003; YOKOYAMA et al., 2004), o presente estudo demonstrou que a administração intratecal de Tx3-3 aumenta a eficácia antinociceptiva desse opióide. A perda da eficácia da morfina em situações de dor neuropática pode ser atribuída à diminuição no nível de receptores MOR nos neurônios do DRG e da medula espinhal após a lesão completa ou parcial do nervo (BESSE et al., 1992; OBARA et al., 2009) que, somada ao aumento da atividade de CCDV (MATTHEWS et al., 2007, HILAIRE et al., 2005) culminaria numa marcante diminuição na eficácia da ação pré-sináptica da morfina. Além disso, é possível que em situações de dor neuropática a modulação dos CCDV pela proteína G esteja de alguma maneira prejudicada (SWARTZ, 1993). De fato, Hall e colaboradores (2001) demonstraram, através de técnicas eletrofisiológicas e farmacológicas, que ocorre uma diminuição na modulação dos CCDV pela proteína G em DRG de ratos tratados com STZ, o que implica em aumento no influxo de cálcio. Os achados do presente trabalho corroboram a participação dos CCDV na diminuição da eficácia analgésica da morfina na dor neuropática, uma vez que o bloqueio de CCDV do tipo P/Q e R espinhais permitiu o efeito antinociceptivo da morfina em animais neuropáticos.

Por outro lado, os CCDV alvo da Tx3-3 não parecem ser importantes na sensibilização central decorrente de inflamação, uma vez que a alodínia mecânica resultante da inflamação induzida por CFA não foi alterada pela administração espinhal dessa toxina. De fato, conforme mostrado por Rycroft e

colaboradores (2007), a inflamação induzida por CFA, embora cause adaptações nas correntes de cálcio do tipo N, não altera as do tipo P/Q e R. Um outro aspecto interessante a ser destacado é que, diferente da dor neuropática, a dor inflamatória apresenta boa resposta à analgesia da morfina, que apresenta até mesmo eficácia superior em quadros inflamatórios (STANFA E DICKENSON, 1995; PRZEWŁOCKI E PRZEWŁOCKA, 2001; OBARA et al., 2009). O contrário também acontece, drogas eficazes no tratamento da dor neuropática não apresentam a mesma eficácia para tratar dores de origem inflamatória. De forma similar aos achados aqui descritos, a eficácia analgésica da gabapentina na dor neuropática não é reproduzida na dor inflamatória induzida por CFA (NAGAKURA et al., 2003).

A tolerância à analgesia da morfina em situações de dor neuropática parece estar relacionada a mecanismos de sensibilização central comuns aos envolvidos no desenvolvimento de tolerância a opióide (MAO et al., 1995; 2001; MAYER et al., 1999). Do mesmo modo que em animais neuropáticos, a administração intratecal de Tx3-3 também foi capaz de restituir a ação analgésica da morfina em animais tolerantes a opióides. Além disso, a administração prolongada de morfina pode, paradoxalmente, causar um quadro de hiperalgesia conhecido como hiperalgesia induzida por opióide (OSSIPOV, 2003). Tal fenômeno é descrito em estudos clínicos (revisado por BANNISTER E DICKENSON, 2010) e pré-clínicos (revisado por CHANG, CHEN E MAO, 2007) e tem sido relacionado à perda da eficácia da morfina com o seu uso crônico. No presente estudo, além da tolerância à analgesia da morfina, também foi observada a instalação de hiperalgesia térmica nos camundongos

submetidos ao protocolo de indução de tolerância a opióide, através do teste de retirada da cauda.

O teste de retirada da cauda é normalmente utilizado em estudos pré-clínicos para avaliar o efeito antinociceptivo de drogas opióides. Embora inúmeros estudos demonstrem o estabelecimento de tolerância a opióides através desse teste, a hiperalgesia induzida por opióide nem sempre é evidenciada devido à alta intensidade do estímulo térmico aplicado, que não permite detectar diminuição na latência da resposta de retirada (OSSIPOV et al., 1995; SMITH, DOMBROWSKI E DEWEY, 1999; LIN et al., 2005). Por esse motivo, nós adaptamos a metodologia descrita por Hargreaves e colaboradores (1988), que utiliza um estímulo térmico radiante brando, originalmente destinada a medir a latência de retirada de pata, para medir a resposta de retirada da cauda. Dessa maneira foi possível observar o estabelecimento de hiperalgesia térmica tanto em animais tolerantes quanto em animais neuropáticos. É importante salientar que nos animais neuropáticos a hiperalgesia foi detectada através da aplicação do estímulo térmico na cauda, ou seja, numa área que não aquela primariamente lesionada, caracterizando um quadro de hiperalgesia extraterritorial, que indica sensibilização central (WOOLF 1983; JI E WOOLF 2001). Uma observação clínica interessante é que o tratamento prolongado com opióides, em geral, produz dor em áreas do corpo não relacionadas à queixa primária que levou ao uso do opióide e se manifesta, entre outros aspectos, como uma diminuição no limiar de resposta a estímulos térmicos (ALI, 1986; DE CONNO et al., 1991; ; WHITE, 2004; CHEN et al., 2009).

A dor paradoxal causada por opióides, assim como a dor neuropática, apresenta-se como sensações de queimação e choque (ALI, 1986, CHEN et al., 2009), hiperestesia (ALI, 1986; ARNER, 1988; DE CONNO et al., 1991, DEVULDER, 1997) e hiperalgesia (STILLMAN, MOULIN E, FOLEY, 1987; ARNER, RAWAL E GUSTAFSSON, 1988; DE CONNO et al., 1991, CHEN et al., 2009). Os mecanismos envolvidos na hiperalgesia induzida por opióide ainda não estão bem estabelecidos mas tem sido associados, em estudos pré-clínicos, com inúmeras alterações plásticas ocorridas na medula espinhal (MAYER et al., 1999), que culminam em aumento da exocitose de neurotransmissores excitatórios (GARDELL et al., 2002, MAO, PRICE E MAYER, 1994; WEN et al., 2004, LIN et al., 2005 Ref), no aumento da atividade de receptores NMDA (TRUJILLO E AKIL, 1991; MAREK et al., 1991; MAO, 1999; LAULIN et al., 2002) e da ativação de proteínas cinase (MAO E MAYER, 2001; ZEITZ et al., 2002; LIANG, LI E CLARK, 2004; TANG et al., 2006a; CHEN, YANG E WANG, 2010).

Tanto a tolerância a opióides quanto o fenômeno de hiperalgesia induzida por opióide convergem para o mesmo ponto: a diminuição do efeito analgésico da morfina. Embora há muito estudado, os mecanismos moleculares envolvidos na tolerância a opióides ainda não foram demonstrados de maneira inequívoca (revisado por KIEFFER E EVANS, 2002). Do contrário, uma série de conceitos e teorias sobre tal fenômeno tem sido abordada nos diversos estudos da área. Algumas vertentes defendem que mecanismos adaptativos compensatórios, como a superativação da adenilato ciclase e o aumento das correntes de cálcio, inicialmente destinados a conter a contínua inibição de tais sinalizações celulares causada pela ativação prolongada de

receptores MOR, acabam por sobressair e determinam um estado de hiperexcitabilidade que diminui a eficácia da morfina (WELCH E OLSON, 1991; GINTZLER E CHAKRABARTI, 2006). A idéia de que a tolerância a opióides é fruto de adaptações celulares, mesmo que antiga, vem ao encontro do conceito recente de que a tolerância a opióides se dá por mecanismos adaptativos na medula espinhal, que culminam em hiperexcitabilidade - manifestada como hiperalgesia - após o seu uso prolongado (OSSIPOV, 2003).

Classicamente, a tolerância a opióides é atribuída ao mecanismo de dessensibilização via internalização do receptor MOR, comum aos receptores acoplados à proteína G (FEGUSON, 2001). Esses receptores normalmente estão sujeitos à regulação via fosforilação por cinases específicas, que sinalizam a ligação dos mesmos com proteínas β -arristinas que irão ancorar o receptor à proteína clatrina e induzir à internalização em endossomas intracelulares, limitando, assim, o número de receptores na membrana plasmática disponíveis para a ação de agonistas. Entretanto, o fenômeno de internalização - estudado *in vitro*, através de técnicas de expressão em sistemas heterólogos (transfecção do receptor MOR em células), - jamais foi evidenciado com o agonismo da morfina, exceto quando receptores “quiméricos” heterodímeros de MOR e DOR foram testados, ou através da oligomerização de receptores MOR induzida por subdose de DAMGO – [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] - protótipo de agonista MOR que apresenta maior eficácia intrínseca que a morfina, como demonstrado por He e colaboradores em 2002. O trabalho de He e colaboradores, aliás, corrobora a teoria sustentada por Whistler e colegas (1999) da internalização dependente do complexo ligante-receptor, conhecida por RAVE (*relative agonist versus*

endocytosis), que relaciona a eficácia intrínseca do agonista com a proporção de receptores internalizados como medida preditiva de tolerância (ALVAREZ, ARTTAMANGKUL E WILLIAMS, 2001). Tais fenômenos evidenciados *in vitro* não são suficientes, todavia, para esclarecer o fenômeno de tolerância *in vivo*. Por exemplo, mesmo em animais *knockout* para o gene que codifica a proteína β -arristina (especificamente a β -arristina-2) há desenvolvimento de tolerância, ainda que mais tardio em relação aos animais que expressam a β -arristina, mesmo que o agonista opióide utilizado para tanto tenha sido o DAMGO (BOHN, LEFKOWITZ E CARON, 2002). De qualquer maneira, o mecanismo de tolerância via internalização de receptor MOR não se aplica ao presente estudo, uma vez que o agonista opióide aqui utilizado foi a morfina. Um achado interessante do trabalho que utilizou camundongos *knockout* para a β -arristina é que uma vez desenvolvida a tolerância, essa foi agudamente revertida através da administração intraperitoneal de queleritrina, um inibidor da PKC (BOHN, LEFKOWITZ E CARON, 2002). Além desse, uma série de estudos tem mostrado que a inibição da PKC bloqueia o desenvolvimento de tolerância em camundongos (NARITA et al., 1995; GRANADOS-SOTO et al., 2000; INOUE E UEDA, 2000), porém, como em geral os inibidores de PKC inibem toda e qualquer isoforma de PKC, não é possível identificar qual delas está especificamente envolvida no fenômeno de tolerância. Contudo, através de estudos com camundongos *knockout* para a isoforma gama da PKC (PKC γ), Zeitz e colaboradores (2001) relataram redução na tolerância à morfina na ausência dessa isoforma. Cabe aqui lembrar que a isoforma gama da PKC é também implicada no desenvolvimento da dor neuropática (MALMBERG et al., 2007b).

De fato, outra alternativa para explicar a tolerância a opióides seria a dessensibilização dos receptores MOR via fosforilação (LIU E ANAND, 2001). O receptor MOR exhibe sítios de consenso à fosforilação pela PKC e CaMKII, conservados entre diferentes espécies, incluindo ratos e humanos (CHEN, 1993; MIN et al., 1994; MESTEK et al., 1995). A ativação dessas cinases está relacionada à dessensibilização de receptores MOR expressos em sistemas heterólogos (MESTEK et al., 1995). A ação da CaMKII se dá em resíduos de serina (S₂₆₁ e S₂₆₆) localizados na terceira alça intracelular do receptor MOR, num sítio muito próximo àquele relacionado com o acoplamento da proteína G (KOCH et al., 1997; WANG et al., 2001), o que implica num possível desacoplamento do receptor à proteína G via fosforilação. Além disso, a CaMKII está co-localizada com receptores MOR em diversas áreas relacionadas ao processamento da dor. Nas lâminas superficiais da medula espinhal a proporção de neurônios que co-expressam ambas as proteínas aumenta consideravelmente (BRÜGGEMANN et al., 2000). Segundo Brüggemann e colaboradores (2000), na medula espinhal praticamente todos os neurônios que expressam MOR também expressam CaMKII. Considerando que a porção mais externa (ou ventral) da lâmina II da medula espinhal também é rica em PKC γ , cinase expressa em interneurônios que normalmente não estão envolvidos em processos nociceptivos, mas parecem ser críticos no desenvolvimento da dor neuropática (MALMBERG et al., 1997b; BASBAUM et al., 2009), é possível acreditar que, em situações particulares como na tolerância e na neuropatia, o receptor MOR sofra ação dessas cinases, que o tornam inativo. Ainda, a porção da lâmina II que expressa PKC γ recebe aferência de fibras não mielinizadas, que expressam o receptor P2X₃ e ligam-

se à isolecitina B4 (SCHERRER et al., 2009). Tais fibras também expressam os CCDV do tipo P/Q (WESTENBROEK, HOSKINS E CATTERALL, 1998). Nos dados aqui apresentados, o bloqueio de CCDV do tipo P/Q e R desencadeado pela administração intratecal Tx3-3 restituiu o efeito da morfina em animais tolerantes e neuropáticos. Logo, é possível sugerir que o bloqueio dos CCDV reduza a ação dessas cinases - cuja ativação é dependente de cálcio - sobre o receptor MOR. De acordo, Lee e colegas descreveram que o influxo de cálcio via CCDV do tipo P/Q acarreta na ativação do complexo cálcio/calmodulina, que por sua vez aumenta o influxo de cálcio – numa retroalimentação positiva (LEE et al., 1999). Ainda que não se possa estabelecer uma relação direta, nós também verificamos que a inibição da CaMKII, através da administração do seu inibidor, o 1 - [N,O – bis (5 - isoquinolinesulphonyl) - N - metil - L – tirosil]-4-phenilpiperazina, ou simplesmente KN62, por via intratecal, mimetizou o efeito da Tx3-3 em animais tolerantes e neuropáticos (apêndice B, Figura II).

Ultimamente, alguns estudos tem demonstrado o envolvimento da CaMKII espinhal na tolerância e hiperalgesia induzida por opióides (LIANG et al., 2004; TANG et al., 2006a; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ et al., 2007; CHEN, YANG E WANG, 2010). Além do mais, essa cinase está intimamente relacionada a processos de neuroplasticidade e sensibilização central envolvidos na dor crônica, incluindo a dor neuropática (FANG et al., 2002; DAI et al., 2005; CHEN et al., 2009). O envolvimento da CaMKII na plasticidade neuronal através da regulação de sítios pós-sinápticos é bem conhecida (FANG et al., 2002 LEE, 2006). Em sítios pré-sinápticos, a CaMKII modula a plasticidade neuronal interferindo na liberação de neurotransmissores (CHAPMAN et al., 1995; LU E HAWKINS, 2006). A liberação de

neurotransmissores está atrelada ao influxo de cálcio através dos CCDV que contem o sítio de ligação (*synprint*) para a maquinaria responsável pela exocitose de vesículas sinápticas, como é o caso dos CCDV do tipo P/Q e N (ZAMPONI, 2003). A atividade desses canais é rigorosamente regulada. O CCDV do tipo P/Q, em particular, sofre regulação pela interação com a CaMKII, que ao se ligar na porção C-terminal do canal modula a cinética de inativação do mesmo, causando uma facilitação de longa duração no influxo de correntes P/Q (LEE et al., 1999; JIANG ET AL., 2008). A modulação de CCDV do tipo P/Q representa, por conseguinte, uma forma de regulação pré-sináptica da liberação de neurotransmissores efetuada pela CaMKII. A inibição do influxo de cálcio e a liberação de neurotransmissores através do bloqueio de correntes de cálcio do tipo P/Q e R efetuados pela Tx3-3 já foi outrora mencionado. Porém, cabe salientar que a Tx3-3 é também capaz de modular a cinética de inativação desses canais, aumentando o grau de inativação das correntes P/Q e R (LEÃO et al., 2000). Curiosamente, o composto KN62, designado como inibidor da CaMKII por interagir com o domínio regulatório dessa enzima, impedindo a sua autorfosforilação (TOKUMITSU et al., 1990) também é capaz de atenuar a liberação de glutamato através da inibição de correntes de cálcio (SIHRA AND PEARSON, 1995), provavelmente devido à sua ação regulatória em VDCC do tipo P/Q (JIANG ET AL., 2008). Logo, a modulação de CCDV, em especial os do tipo P/Q, parece ser um mecanismo interessante para conter mecanismos de neuroplasticidade. Embora não esteja fortemente envolvido na liberação de neurotransmissores, os CCDV pré-sinápticos do tipo R também estão ligados a mecanismos de neuroplasticidade, estando implicados na indução de potencialização de longa duração (*long term potentiation* - LTP)

(DIETRICH et al., 2003). Embora a LTP, tenha sido originalmente evidenciada em neurônios hipocámpais (LØMO T, 2003), e por isso seja primariamente relacionada a mecanismos de memória, tal fenômeno também é observado em neurônios excitatórios da medula espinhal, em situações de sensibilização central e hiperalgesia (JI et al., 2003; IKEDA, KIRITOSHI E MURASE, 2009) presentes, por exemplo, na dor neuropática (ZIMMERMANN et al. 2001; MATSUMURA et al., 2010) e na tolerância a opióides (ZHOU et al., 2010).

Os CCDV espinhais, de fato, parecem ser importantes para a neuroplasticidade que acompanha a dor neuropática e a tolerância a opióides. O bloqueio de CCDV espinhais, curiosamente os do tipo L, abole a hiperalgesia e a tolerância a opióides em camundongos (DOGRUL et al., 2005). Animais *knockout* para o gene que codifica o CCDV do tipo R (mas não os *knockout* para o CCDV do tipo N) não desenvolvem tolerância a opióides (YOKOYAMA et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado o aumento nos níveis de cálcio intracelular em preparações de sinaptossomas de medula espinhal de camundongos tratados cronicamente com morfina (WELCH AND OLSON, 1991), o que implica em aumento na liberação de neurotransmissores. Realmente, há um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), na medula espinhal de animais neuropáticos e tolerantes a opióides (MAO, PRICE E MAYER, 1994; WEN et al., 1994; GARDELL et al., 2002; 2003). Ou seja, a falta de efeito da morfina na neuropatia e na tolerância a opióides parece estar relacionada a adaptações no aparato de excitação sináptica espinhal, que se torna mais suscetível à estimulação, produzindo hiperexcitabilidade, manifestada como hiperalgesia. Nesse sentido, um recente estudo demonstrou que camundongos transgênicos

que superexpressam a subunidade $\alpha 2\delta 1$ de CCDV, mimetizando uma situação de neuropatia, apresentam hiperexcitabilidade neuronal e hiperalgesia que estão diretamente relacionados ao aumento da liberação de glutamato de neurônios pré-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal (NGUYEN et al., 2009). Assim, drogas capazes de conter o aumento na transmissão sináptica seriam efetivas não apenas no tratamento da dor neuropática como também no tratamento da dor em situações de tolerância a opióides. De acordo com essa premissa, Lin e colaboradores (2005) relataram que a administração intratecal de gabapentina, restabelece a eficácia antinociceptiva da morfina em animais tolerantes a opióides - quando administrada 30 minutos antes da administração da dose desafio de morfina - por inibir a exocitose de aminoácidos excitatórios. Os resultados aqui descritos estão em harmonia com os acima citados e apontam para os CCDV como alvos proeminentes no controle da hiperalgesia resistente à analgesia da morfina.

É interessante ressaltar que embora os CCDV do tipo P/Q e R não sejam considerados fundamentais para a transmissão nociceptiva em condições fisiológicas, papel desempenhado majoritariamente pelos CCDV do tipo N, eles parecem ser importantes para transmissão dolorosa anormal que ocorre, sobretudo, em situações de sensibilização central. Por exemplo, a deleção do gene Cav2.1, que codifica a subunidade $\alpha 1$ de CCDV do tipo P/Q, ou daquele que gera a subunidade $\alpha 1$ de CCDV do tipo R mantém intacta a transmissão nociceptiva basal mas reduz a nocicepção em condições de hiperalgesia, como a causada por neuropatia (SAEGUSA et al, 2000; LUVISETTO et al., 2006). Como demonstrado na Figura I (apêndice A), a administração intratecal de Tx3-3 só foi capaz de reduzir a segunda fase da

formalina (considerada resultado da sensibilização central) quando administrada após a indução do processo de sensibilização (após a administração da formalina). Esse resultado está de acordo com estudos que demonstram a participação de CCDV do tipo P/Q e R apenas na segunda fase da formalina (MALMBERG E YAKSH, 1994; SAEGUSA et al, 2000; LUVISETTO et al., 2006) e reforça a proposta de bloqueio dependente de estado como mecanismo de ação da Tx3-3.

A inibição de mecanismos exclusivamente envolvidos em situações patológicas é interessante para o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros. A dor neuropática, por ter etiologia diversa, pode apresentar diversos mecanismos alvos para o seu tratamento. Um mecanismo largamente atribuído à dor neuropática, incluindo a causada por trauma e a causada por diabetes, é o aumento da expressão da subunidade $\alpha 2\delta$ de CCDV (NEWTON et al., 2001; YUSAF et al., 2001; LUO et al., 2002). No entanto, a subunidade $\alpha 2\delta$ pode coexistir com qualquer uma das subunidades $\alpha 1$ dos diferentes CCDV. Inclusive, a ação analgésica da gabapentina e de seus congêneres (como a pregabalina) na dor neuropática parece depender de mecanismos adicionais à ligação na subunidade $\alpha 2\delta$ dos CCDV, já que, em ratos, outras drogas com afinidade por essa subunidade não foram capazes de reduzir a nocicepção causada pela ligação do nervo espinhal (LYNCH et al., 2006). Um dado interessante, é que a co-expressão da subunidade $\alpha 2\delta$ com a subunidade $\alpha 1$ dos CCDV do tipo N reduz a afinidade de ω -conotoxinas - inclusive a da ω -conotoxina MVIIA – por esses canais (MOULD et al., 2004), o que poderia estar relacionado à estreita janela terapêutica da ziconotida. De particular relevância, foi demonstrado que a inibição da transmissão sináptica na medula espinhal

causada pela gabapentina é atribuída ao bloqueio de correntes de cálcio do tipo P/Q (BAYER, AHMADI E ZEILHOFER, 2004). Embora não possamos afirmar com certeza, dados preliminares (não mostrados aqui) demonstram que a toxina Tx3-3 também é capaz de se ligar na subunidade $\alpha 2\delta$ de CCDV.

Além da eficácia na dor neuropática, o reestabelecimento da eficácia da morfina causado pela administração intratecal de Tx3-3 é um achado interessante já que a morfina é um dos analgésicos mais efetivos no alívio completo da dor. E, por mais que o uso contínuo desse opióide possa produzir hipersensibilidade dolorosa, o uso de morfina no tratamento da dor crônica proporciona a melhoria do bem estar geral e do humor dos pacientes (TASSAIN et al., 2003; CHU, CLARK E ANGST, 2006; CHEN et al., 2009). Logo, o ideal seria intervir nos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de sensibilização central que acompanham o tratamento com opióides. Os resultados aqui relatados apontam os CCDV do tipo P/Q e R como alvos promitentes.

Os dados aqui apresentados demonstram que a toxina Tx3-3, isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, apresentou eficácia antinociceptiva, com bom perfil terapêutico, em modelos animais de dor neuropática e permitiu a ação da morfina em animais neuropáticos e tolerantes a opióides. Esses resultados ressaltam o papel dos CCDV do tipo P/Q e R em estados hiperalgésicos resistentes à analgesia da morfina e apontam a Tx3-3 como uma toxina promissora para o tratamento da dor crônica refratária a opióides.

VII. CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

1. A administração intratecal e intracerebroventricular da toxina Tx3-3 causou efeito antinociceptivo no teste que avalia nocicepção aguda em camundongos.
2. A administração de Tx3-3 por via intratecal ou intracerebroventricular não causou efeitos motores adversos.
3. A toxina Tx3-3 apresentou melhor janela terapêutica do que a ω -conotoxina MVIIC.
4. A toxina Tx3-3 não apresentou efeito antinociceptivo em modelo animal de dor inflamatória crônica induzida por CFA.
5. A administração intratecal de Tx3-3 causou efeito antinociceptivo tanto no modelo experimental de dor neuropática causada por trauma em camundongos como no modelo experimental de dor neuropática causada por diabetes em camundongos e ratos.
6. A administração intratecal de Tx3-3 restabeleceu a eficácia antinoceptiva da morfina em modelos animais de dor resistentes a opióides.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; KURIHARA, T.; HAN, W.; SHINOMIYA, K.; TANABE, T. Changes in expression of voltage-dependent ion channel subunits in dorsal root ganglia of rats with radicular injury and pain. **Spine (Phila Pa 1976)** 27(14):1517-1524; discussion 1525, 2002.

ADAMS, M.E.; MYERS, R.A.; IMPERIAL, J.S.; OLIVERA, B.M. Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. **Biochemistry** 32(47):12566-12570, 1993.

ADAMS, M.E.; OLIVERA, B.M. Neurotoxins: overview of an emerging research technology. **Trends Neurosci** 17(4):151-155, 1994.

ADRIAN, E.D.; ZOTTERMAN, Y. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ. **J Physiol** 61(2):151-171, 1926.

AKIL, H.; OWENS, C.; GUTSTEIN, H.; TAYLOR, L.; CURRAN, E.; WATSON, S. Endogenous opioids: overview and current issues. **Drug Alcohol Depend** 51(1-2):127-140, 1998.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J Neurosci** 19(6):2181-2186, 1999.

ALEY, K.O.; MESSING, R.O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J Neurosci** 20(12):4680-4685, 2000.

ALI, N.M. Hyperalgesic response in a patient receiving high concentrations of spinal morphine. **Anesthesiology** 65(4):449, 1986.

ALTIER, C.; ZAMPONI, G.W. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends Pharmacol Sci** 25(9):465-470, 2004.

ALVAREZ, V.; ARTTAMANGKUL, S.; WILLIAMS, J.T. A RAVE about opioid withdrawal. **Neuron** 32(5):761-763, 2001.

ARAUJO, D.A.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; BEIRAO, P.S. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 347(2):205-208, 1993.

ARIKATH, J.; CAMPBELL, K.P. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. **Curr Opin Neurobiol** 13(3):298-307, 2003.

ARNER, S.; MEYERSON, B.A. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. **Pain** 33(1):11-23, 1988.

ARNER, S.; RAWAL, N.; GUSTAFSSON, L.L. Clinical experience of long-term treatment with epidural and intrathecal opioids--a nationwide survey. **Acta Anaesthesiol Scand** 32(3):253-259, 1988.

ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet** 353(9167):1865-1869, 1999.

AVERILL, S.; MCMAHON, S.B.; CLARY, D.O.; REICHARDT, L.F.; PRIESTLEY, J.V. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. **Eur J Neurosci** 7(7):1484-1494, 1995.

BALLANTYNE, J.C.; MAO, J. Opioid therapy for chronic pain. **N Engl J Med** 349(20):1943-1953, 2003.

BALLANTYNE, J.C.; SHIN, N.S. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. **Clin J Pain** 24(6):469-478, 2008.

BANNISTER, K.; DICKENSON, A.H. Opioid hyperalgesia. **Curr Opin Support Palliat Care** 4(1):1-5, 2010.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell** 139(2):267-284, 2009.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci** 7:309-338, 1984.

BAYER, K.; AHMADI, S.; ZEILHOFER, H.U. Gabapentin may inhibit synaptic transmission in the mouse spinal cord dorsal horn through a preferential block of P/Q-type Ca²⁺ channels. **Neuropharmacology** 46(5):743-749, 2004.

BEAN, B.P. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 81(20):6388-6392, 1984.

BELL, C. Idea of a new anatomy of the brain: submitted for the observations of his friends. London: Strahan and Preston, 1811.

BERECKI, G.; MOTIN, L.; HAYTHORNTHWAITE, A.; VINK, S.; BANSAL, P.; DRINKWATER, R.; WANG, C.I.; MORETTA, M.; LEWIS, R.J.; ALEWOOD, P.F.; CHRISTIE, M.J.; ADAMS, D.J. Analgesic (omega)-conotoxins CVIE and CVIF selectively and voltage-dependently block recombinant and native N-type calcium channels. **Mol Pharmacol** 77(2):139-148, 2010.

BERNARD, J.F.; BESSON, J.M. The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. **J Neurophysiol** 63(3):473-490, 1990.

BERNARD, J.F.; PESCHANSKI, M.; BESSON, J.M. A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. **Neurosci Lett** 100(1-3):83-88, 1989.

BESSE, D.; LOMBARD, M.C.; PERROT, S.; BESSON, J.M. Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. **Neuroscience** 50(4):921-933, 1992.

BESSE, D.; LOMBARD, M.C.; ZAJAC, J.M.; ROQUES, B.P.; BESSON, J.M. Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. **Brain Res** 521(1-2):15-22, 1990a.

BESSE, D.; LOMBARD, M.C.; ZAJAC, J.M.; ROQUES, B.P.; BESSON, J.M. Pre- and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. **Prog Clin Biol Res.** 328(183-186, 1990b.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet** 353(9164):1610-1615, 1999.

BESSOU, P.; BURGESS, P.R.; PERL, E.R.; TAYLOR, C.B. Dynamic properties of mechanoreceptors with unmyelinated (C) fibers. **J Neurophysiol** 34(1):116-131, 1971.

BESSOU, P.; PERL, E.R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J Neurophysiol** 32(6):1025-1043, 1969.

BOHN, L.M.; LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. **J Neurosci** 22(23):10494-10500, 2002.

BOURINET, E.; SOONG, T.W.; STEA, A.; SNUTCH, T.P. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(4):1486-1491, 1996.

BOURINET, E.; SOONG, T.W.; SUTTON, K.; SLAYMAKER, S.; MATHEWS, E.; MONTEIL, A.; ZAMPONI, G.W.; NARGEOT, J.; SNUTCH, T.P. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. **Nat Neurosci** 2(5):407-415, 1999.

BRASIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. **Memb Inst Butan** 1:1-70, 1925.

BROSE, W.G.; GUTLOVE, D.P.; LUTHER, R.R.; BOWERSOX, S.S.; MCGUIRE, D. Use of intrathecal SNX-111, a novel N-type voltage-sensitive calcium channel blocker in the management of intractable brachial plexus avulsion pain. **Clin J Pain** 13:256-259, 1997.

BROWN-SÉQUARD, C.E. Course of Lectures on the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. Philadelphia: Collins, 1860.

BROWN-SÉQUARD, C.E. Lectures on the physiology and pathology of the nervous system; and on the treatment of organic nervous affections. **Lancet** 2:593–596, 1868.

BRUERA, E.; PALMER, J.L.; BOSNJAK, S.; RICO, M.A.; MOYANO, J.; SWEENEY, C.; STRASSER, F.; WILLEY, J.; BERTOLINO, M.; MATHIAS, C.; SPRUYT, O.; FISCH, M.J. Methadone versus morphine as a first-line strong opioid for cancer pain: a randomized, double-blind study. **J Clin Oncol** 22(1):185-192, 2004.

BRUGGEMANN, I.; SCHULZ, S.; WIBORNY, D.; HOLLT, V. Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions. **Brain Res Mol Brain Res** 85(1-2):239-250, 2000.

CALCUTT, N.A.; CHAPLAN, S.R. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. **Br J Pharmacol** 122(7):1478-1482, 1997.

CARBONE, E.; SWANDULLA, D. Neuronal calcium channels: kinetics, blockade and modulation. **Prog Biophys Mol Biol** 54(1):31-58, 1989.

CARDOSO, F.C.; PACIFICO, L.G.; CARVALHO, D.C.; VICTORIA, J.M.; NEVES, A.L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and characterization of Phoneutria nigriventer toxins active on calcium channels. **Toxicon** 41(7):755-763, 2003.

CASSOLA, A.C.; JAFFE, H.; FALES, H.M.; CASTRO AFECHE, S.; MAGNOLI, F.; CIPOLLA-NETO, J. omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider phoneutria nigriventer. **Pflugers Arch** 436(4):545-552, 1998.

CASTRO, A.; ANDRADE, A.; VERGARA, P.; SEGOVIA, J.; AGUILAR, J.; FELIX, R.; DELGADO-LEZAMA, R. Involvement of R-type Ca²⁺ channels in neurotransmitter release from spinal dorsolateral funiculus terminals synapsing motoneurons. **J Comp Neurol** 513(2):188-196, 2009.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annu Rev Cell Dev Biol** 16:521-555, 2000.

CAVANAUGH, D.J.; LEE, H.; LO, L.; SHIELDS, S.D.; ZYLKA, M.J.; BASBAUM, A.I.; ANDERSON, D.J. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(22):9075-9080, 2009.

CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; MCNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron** 23(3):617-624, 1999.

CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(26):15435-15439, 1996.

CHANG, G.; CHEN, L.; MAO, J. Opioid tolerance and hyperalgesia. **Med Clin North Am** 91(2):199-211, 2007.

CHAPLAN, S.R.; POGREL, J.W.; YAKSH, T.L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. **J Pharmacol Exp Ther** 269(3):1117-1123, 1994.

CHAPMAN, P.F.; FRENGUELLI, B.G.; SMITH, A.; CHEN, C.M.; SILVA, A.J. The alpha-Ca²⁺/calmodulin kinase II: a bidirectional modulator of presynaptic plasticity. **Neuron** 14(3):591-597, 1995.

CHEN, L.; MALARICK, C.; SEEFELD, L.; WANG, S.; HOUGHTON, M.; MAO, J. Altered quantitative sensory testing outcome in subjects with opioid therapy. **Pain** 143(1-2):65-70, 2009.

CHEN, Y.; LUO, F.; YANG, C.; KIRKMIRE, C.M.; WANG, Z.J. Acute inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II reverses experimental neuropathic pain in mice. **J Pharmacol Exp Ther** 330(2):650-659, 2009.

CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; HURLEY, J.A.; YU, L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. **Mol Pharmacol** 44(1):8-12, 1993.

CHEN, Y.; YANG, C.; WANG, Z.J. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha is required for the initiation and maintenance of opioid-induced hyperalgesia. **J Neurosci** 30(1):38-46, 2010.

CHRISTENSEN, B.N.; PERL, E.R. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. **J Neurophysiol** 33(2):293-307, 1970.

CHU, L.F.; CLARK, D.J.; ANGST, M.S. Opioid tolerance and hyperalgesia in chronic pain patients after one month of oral morphine therapy: a preliminary prospective study. **J Pain** 7(1):43-48, 2006.

CHUNG, D.; GAUR, S.; BELL, J.R.; RAMACHANDRAN, J.; NADASDI, L. Determination of disulfide bridge pattern in omega-conopeptides. **Int J Pept Protein Res** 46(3-4):320-325, 1995.

CLARK, D.; HUGHES, J.; GASSER, H.S. Afferent function in the group of nerve fibers of slowest conduction velocity. **Am J Physiol** 114:69-76, 1935.

COLLINS, W.R., JR.; NULSEN, F.E.; RANDT, C.T. Relation of peripheral nerve fiber size and sensation in man. **Arch Neurol** 3:381-385, 1960.

CORBETT, A.D.; HENDERSON, G.; MCKNIGHT, A.T.; PATERSON, S.J. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. **Br J Pharmacol** 147 Suppl 1:153-162, 2006.

CORDEIRO MDO, N.; DE FIGUEIREDO, S.G.; VALENTIM ADO, C.; DINIZ, C.R.; VON EICKSTEDT, V.R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon** 31(1):35-42, 1993.

CORDEIRO MDO, N.; DINIZ, C.R.; VALENTIM ADO, C.; VON EICKSTEDT, V.R.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **FEBS Lett** 310(2):153-156, 1992.

CORREA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol** 110(1):193-198, 1993.

CRAIG, A.D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu Rev Neurosci** 26:1-30, 2003.

CRANFIELD, PF. The way in and the way out: Francois Magendie, Charles Bell and the roots of the spinal nerve. Mount Kisco, New York: Futura Publishing Company, 1974.

CRUZ, L.J.; OLIVERA, B.M. Calcium channel antagonists. Omega-conotoxin defines a new high affinity site. **J Biol Chem** 261(14):6230-6233, 1986.

CUELLO, A.C.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; MA, W.; DE KONINCK, Y.; HENRY, J.L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regul Pept** 46(1-2):155-164, 1993.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther** 72:74-79, 1941.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth** 101(1):8-16, 2008.

DAI, Y.; WANG, H.; OGAWA, A.; YAMANAKA, H.; OBATA, K.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. **Eur J Neurosci** 21(9):2467-2474, 2005.

DE CONNO, F.; CARACENI, A.; MARTINI, C.; SPOLDI, E.; SALVETTI, M.; VENTAFRIDDA, V. Hyperalgesia and myoclonus with intrathecal infusion of high-dose morphine. **Pain** 47(3):337-339, 1991.

DEJERINE, J.; ROUSSY, G. Le syndrome thalamique. **Rev Neurol** 14:521–532, 1906.

DE WAARD, M.; LIU, H.; WALKER, D.; SCOTT, V.E.; GURNETT, C.A.; CAMPBELL, K.P. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. **Nature** 385(6615):446-450, 1997.

DEVULDER, J. Hyperalgesia induced by high-dose intrathecal sufentanil in neuropathic pain. **J Neurosurg Anesthesiol** 9(2):146-148, 1997.

DIETRICH, D.; KIRSCHSTEIN, T.; KUKLEY, M.; PEREVERZEV, A.; VON DER BRELIE, C.; SCHNEIDER, T.; BECK, H. Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. **Neuron** 39(3):483-496, 2003.

DINIZ, C.R.; CORDEIRO MDO, N.; JUNOR, L.R.; KELLY, P.; FISCHER, S.; REIMANN, F.; OLIVEIRA, E.B.; RICHARDSON, M. The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **FEBS Lett** 263(2):251-253, 1990.

DIXON, J.W. The up and down method for small samples. **Stat Assoc** 60:967-968, 1965.

DMITRIEVA, N.; RODRIGUEZ-MALAYER, A.J.; PEREZ, J.; HERNANDEZ, L. Differential release of neurotransmitters from superficial and deep layers of the dorsal horn in response to acute noxious stimulation and inflammation of the rat paw. **Eur J Pain** 8(3):245-252, 2004.

DOGRUL, A.; BILSKY, E.J.; OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; PORRECA, F. Spinal L-type calcium channel blockade abolishes opioid-induced sensory hypersensitivity and antinociceptive tolerance. **Anesth Analg** 101(6):1730-1735, 2005.

DOOLEY, D.J.; TAYLOR, C.P.; DONEVAN, S.; FELTNER, D. Ca²⁺ channel alpha2delta ligands: novel modulators of neurotransmission. **Trends Pharmacol Sci** 28(2):75-82, 2007.

DOS SANTOS, R.G.; VAN RENTERGHEM, C.; MARTIN-MOUTOT, N.; MANSUELLE, P.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MORI, Y.; DE LIMA, M.E.; SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. **J Biol Chem** 277(16):13856-13862, 2002.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol Sci** 15(6):190-197, 1994.

DUBOIS-REYMOND, E. Untersuchungen über thierische Elektrizität. Berlin: Georg Reimer, 1848.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)** 46(3):208-209, 1957.

EDINGER, L. Einiges von verlauf der gefühlsbahnen in centralen nervensysteme. **Deutsche Med Woch** 16:421–426, 1890.

ERB, W. Handbuch der Krankheiten des Nervensystems II. Leipzig: F.C.W. Vogel, 1874.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie** 82(9-10):893-907, 2000.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Nat Prod Rep** 24(1):145-161, 2007.

EVANS, R.M.; ZAMPONI, G.W. Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways. **Trends Neurosci** 29(11):617-624, 2006.

FANG, L.; WU, J.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. **J Neurosci** 22(10):4196-4204, 2002.

FANG, Z.; PARK, C.K.; LI, H.Y.; KIM, H.Y.; PARK, S.H.; JUNG, S.J.; KIM, J.S.; MONTEIL, A.; OH, S.B.; MILLER, R.J. Molecular basis of Ca_v2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. **J Biol Chem** 282(7):4757-4764, 2007.

FELSBY, S.; NIELSEN, J.; ARENDT-NIELSEN, L.; JENSEN, T.S. NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. **Pain** 64(2):283-291, 1996.

FENG, Z.P.; DOERING, C.J.; WINKFEIN, R.J.; BEEDLE, A.M.; SPAFFORD, J.D.; ZAMPONI, G.W. Determinants of inhibition of transiently expressed voltage-gated calcium channels by omega-conotoxins GVIA and MVIIA. **J Biol Chem** 278(22):20171-20178, 2003.

FERGUSON, S.S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol Rev** 53(1):1-24, 2001.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; BADER, M.; CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology** 41(8):1006-1012, 2001.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci** 5(7):565-575, 2004.

FIELDS, H.L.; BRY, J.; HENTALL, I.; ZORMAN, G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J Neurosci** 3(12):2545-2552, 1983.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 308(1136):361-374, 1985.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci** 14:19-245, 1991.

FIGUEIREDO, S.G.; GARCIA, M.E.; VALENTIM, A.C.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon** 33(1):83-93, 1995.

FOLEY, K.M. The treatment of cancer pain. **N Engl J Med** 313(2):84-95, 1985.

FOSSAT, P.; DOBREMEZ, E.; BOUALI-BENAZZOUZ, R.; FAVEREAUX, A.; BERTRAND, S.S.; KILK, K.; LEGER, C.; CAZALETS, J.R.; LANGEL, U.; LANDRY, M.; NAGY, F. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. **J Neurosci** 30(3):1073-1085, 2010.

FRIEDMAN, D.P.; MURRAY, E.A.; O'NEILL, J.B.; MISHKIN, M. Cortical connections of the somatosensory fields of the lateral sulcus of macaques: evidence for a corticolimbic pathway for touch. **J Comp Neurol** 252(3):323-347, 1986.

FROST, J.J.; WAGNER, H.N., JR.; DANNALS, R.F.; RAVERT, H.T.; LINKS, J.M.; WILSON, A.A.; BURNS, H.D.; WONG, D.F.; MCPHERSON, R.W.; ROSENBAUM, A.E.; ET AL. Imaging opiate receptors in the human brain by positron tomography. **J Comput Assist Tomogr** 9(2):231-236, 1985.

FUKUIZUMI, T.; OHKUBO, T.; KITAMURA, K. Spinally delivered N-, P/Q- and L-type Ca²⁺-channel blockers potentiate morphine analgesia in mice. **Life Sci** 73(22):2873-2881, 2003.

GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. **J Am Osteopath Assoc** 107(10 Suppl 6):39-48, 2007.

GARDELL, L.R.; VANDERAH, T.W.; GARDELL, S.E.; WANG, R.; OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; PORRECA, F. Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation. **J Neurosci** 23(23):8370-8379, 2003.

GARDELL, L.R.; WANG, R.; BURGESS, S.E.; OSSIPOV, M.H.; VANDERAH, T.W.; MALAN, T.P., JR.; LAI, J.; PORRECA, F. Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. **J Neurosci** 22(15):6747-6755, 2002.

GAURIAU, C.; BERNARD, J.F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp Physiol** 87(2):251-258, 2002.

GEE, N.S.; BROWN, J.P.; DISSANAYAKE, V.U.; OFFORD, J.; THURLOW, R.; WOODRUFF, G.N. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. **J Biol Chem** 271(10):5768-5776, 1996.

GINTZLER, A.R.; CHAKRABARTI, S. Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. **Life Sci** 79(8):717-722, 2006.

GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M.A. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cell Mol Neurobiol** 22(5-6):579-588, 2002.

GOMEZ, R.S.; CASALI, T.A.; ROMANO-SILVA, M.A.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MORAES-SANTOS, T.; PRADO, M.A.; GOMEZ, M.V. The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. **Neurosci Lett** 196(1-2):131-133, 1995.

GOWERS, W.R. A case of unilateral gunshot injury to the spinal cord. **Trans Clin Lond** 11:24-32, 1878.

GRANADOS-SOTO, V.; KALCHEVA, I.; HUA, X.; NEWTON, A.; YAKSH, T.L. Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. **Pain** 85(3):395-404, 2000.

GRAVES, T.D.; IMBRICI, P.; KORS, E.E.; TERWINDT, G.M.; EUNSON, L.H.; FRANTS, R.R.; HAAN, J.; FERRARI, M.D.; GOADSBY, P.J.; HANNA, M.G.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.; KULLMANN, D.M. Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. **Neurobiol Dis** 32(1):10-15, 2008.

GU, J.G.; ALBUQUERQUE, C.; LEE, C.J.; MACDERMOTT, A.B. Synaptic strengthening through activation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. **Nature** 381(6585):793-796, 1996.

GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M.A.; CRUZ, J.S.; BEIRAO, P.S.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; PRADO, M.A. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **Br J Pharmacol** 122(3):591-597, 1997.

HALL, K.E.; LIU, J.; SIMA, A.A.; WILEY, J.W. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. **J Neurophysiol** 86(2):760-770, 2001.

HALLING, D.B.; ARACENA-PARKS, P.; HAMILTON, S.L. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. **Sci STKE** 2006(318):er1, 2006.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain** 32(1):77-88, 1988.

HE, L.; FONG, J.; VON ZASTROW, M.; WHISTLER, J.L. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. **Cell** 108(2):271-282, 2002.

HEAD, H.; HOLMES, G. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain** 34:102–254, 1911.

HEINBECKER, P.; BISHOP, G.H.; O'LEARY, J. Pain and touch fibers in peripheral nerves. **Arch Neurol Psychiatry** 29:771–789, 1933.

HEINKE, B.; BALZER, E.; SANDKUHLER, J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. **Eur J Neurosci** 19(1):103-111, 2004.

HILAIRE, C.; INQUIMBERT, P.; AL-JUMAILY, M.; GREUET, D.; VALMIER, J.; SCAMPS, F. Calcium dependence of axotomized sensory neurons excitability. **Neurosci Lett** 380(3):330-334, 2005.

HILLE, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. **J Gen Physiol** 69(4):497-515, 1977.

HILLER, J.M.; PEARSON, J.; SIMON, E.J. Distribution of stereospecific binding of the potent narcotic analgesic etorphine in the human brain: predominance in the limbic system. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 6(3):1052-1062, 1973.

HILLYARD, D.R.; MONJE, V.D.; MINTZ, I.M.; BEAN, B.P.; NADASDI, L.; RAMACHANDRAN, J.; MILJANICH, G.; AZIMI-ZOONOOZ, A.; MCINTOSH, J.M.; CRUZ, L.J.; ET AL. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. **Neuron** 9(1):69-77, 1992.

HONDEGHEM, L.M.; KATZUNG, B.G. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. **Biochim Biophys Acta** 472(3-4):373-398, 1977.

HUCHO, T.; LEVINE, J.D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron** 55(3):365-376, 2007.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30(1):103-114, 1987.

HUNT, C.C.; MC, I.A. An analysis of fibre diameter and receptor characteristics of myelinated cutaneous afferent fibres in cat. **J Physiol** 153:99-112, 1960.

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci** 2(2):83-91, 2001.

HUNT, S.P.; ROSSI, J. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 308(1136):283-289, 1985.

HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol** 67(2-3):313-316, 1980.

IGGO, A. Cutaneous heat and cold receptors with slowly conducting (C) afferent fibres. **Q J Exp Physiol Cogn Med Sci** 44(362-370), 1959.

IGGO, A. Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibres. **J Physiol.** 152:337-353, 1960.

IKEDA, H.; KIRITOSHI, T.; MURASE, K. Synaptic plasticity in the spinal dorsal horn. **Neurosci Res** 64(2):133-136, 2009.

INOUE, M.; UEDA, H. Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral mu-opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. **J Pharmacol Exp Ther** 293(2):662-669, 2000.

JARVIS, S.E.; ZAMPONI, G.W. Interactions between presynaptic Ca²⁺ channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. **Trends Pharmacol Sci** 22(10):519-525, 2001.

JI, R.R.; KOHNO, T.; MOORE, K.A.; WOOLF, C.J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends Neurosci** 26(12):696-705, 2003.

JI, R.R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis** 8(1):1-10, 2001.

JIANG, X.; LAUTERMILCH, N.J.; WATARI, H.; WESTENBROEK, R.E.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(1):341-346, 2008.

JUN, K.; PIEDRAS-RENTERIA, E.S.; SMITH, S.M.; WHEELER, D.B.; LEE, S.B.; LEE, T.G.; CHIN, H.; ADAMS, M.E.; SCHELLER, R.H.; TSIEN, R.W.; SHIN, H.S. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(26):15245-15250, 1999.

KALAPOTHAKIS, E.; PENAFORTE, C.L.; LEO, R.M.; CRUZ, J.S.; PRADO, V.F.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A.; GOMEZ, M.V.; BEIRAO, P.S. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). **Toxicon** 36(12):1971-1980, 1998.

KAWAMATA, M.; OMOTE, K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. **Pain** 68(1):85-96, 1996.

KIEFFER, B.L.; EVANS, C.J. Opioid tolerance-in search of the holy grail. **Cell** 108(5):587-590, 2002.

KIEFFER, B.L.; GAVERIAUX-RUFF, C. Exploring the opioid system by gene knockout. **Prog Neurobiol** 66(5):285-306, 2002.

KING, T.; OSSIPOV, M.H.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F.; LAI, J. Is paradoxical pain induced by sustained opioid exposure an underlying mechanism of opioid antinociceptive tolerance? **Neurosignals** 14(4):194-205, 2005.

KNIGHT, Y.E.; BARTSCH, T.; KAUBE, H.; GOADSBY, P.J. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? **J Neurosci** 22(5):RC213, 2002.

KOCH, T.; KROSLAK, T.; MAYER, P.; RAULF, E.; HOLLT, V. Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization. **J Neurochem** 69(4):1767-1770, 1997.

KOERBER, H.R.; MIRNICS, K.; KAVOOKJIAN, A.M.; LIGHT, A.R. Ultrastructural analysis of ectopic synaptic boutons arising from peripherally regenerated primary afferent fibers. **J Neurophysiol** 81(4):1636-1644, 1999.

KOSTYUK, E.; PRONCHUK, N.; SHMIGOL, A. Calcium signal prolongation in sensory neurons of mice with experimental diabetes. **Neuroreport** 6(7):1010-1012, 1995.

KUSHMERICK, C.; KALAPOTHAKIS, E.; BEIRAO, P.S.; PENAFORTE, C.L.; PRADO, V.F.; CRUZ, J.S.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A. Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. **J Neurochem** 72(4):1472-1481, 1999.

LAMPE, R.A.; DEFEO, P.A.; DAVISON, M.D.; YOUNG, J.; HERMAN, J.L.; SPREEN, R.C.; HORN, M.B.; MANGANO, T.J.; KEITH, R.A. Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. **Mol Pharmacol** 44(2):451-460, 1993.

LANDAU, W.; BISHOP, G.H. Pain from dermal, periosteal, and fascial endings and from inflammation; electrophysiological study employing differential nerve blocks. **AMA Arch Neurol Psychiatry** 69(4):490-504, 1953.

LAULIN, J.P.; MAURETTE, P.; CORCUFF, J.B.; RIVAT, C.; CHAUVIN, M.; SIMONNET, G. The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. **Anesth Analg** 94(5):1263-1269, 2002.

LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J Pharmacol Methods** 16(4):355-357, 1986.

LAW, P.Y.; WONG, Y.H.; LOH, H.H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 40:389-430, 2000.

LE MERRER, J.; BECKER, J.A.; BEFORT, K.; KIEFFER, B.L. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiol Rev** 89(4):1379-1412, 2009.

LEAO, R.M.; CRUZ, J.S.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; BEIRAO, P.S. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phosphoneuria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology** 39(10):1756-1767, 2000.

LEE, A.; WONG, S.T.; GALLAGHER, D.; LI, B.; STORM, D.R.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. **Nature** 399(6732):155-159, 1999.

LEE, H.K. Synaptic plasticity and phosphorylation. **Pharmacol Ther** 112(3):810-832, 2006.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov** 2(10):790-802, 2003.

LEWIS, R.J. Conotoxin venom peptide therapeutics. **Adv Exp Med Biol** 655:44-48, 2009.

LIANG, D.; LI, X.; CLARK, J.D. Increased expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha during chronic morphine exposure. **Neuroscience** 123(3):769-775, 2004.

LIEBESKIND, J.C.; GUILBAUD, G.; BESSON, J.M.; OLIVERAS, J.L. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. **Brain Res** 50(2):441-446, 1973.

LIN, J.A.; LEE, M.S.; WU, C.T.; YEH, C.C.; LIN, S.L.; WEN, Z.H.; WONG, C.S. Attenuation of morphine tolerance by intrathecal gabapentin is associated with

suppression of morphine-evoked excitatory amino acid release in the rat spinal cord. **Brain Res** 1054(2):167-173, 2005.

LIU, J.G.; ANAND, K.J. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. **Brain Res Brain Res Rev** 38(1-2):1-19, 2001.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain** 137(3):473-477, 2008.

LOMBARD, M.C.; BESSON, J.M. Attempts to gauge the relative importance of pre- and postsynaptic effects of morphine on the transmission of noxious messages in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Pain** 37(3):335-345, 1989.

LOMO, T. The discovery of long-term potentiation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 358(1432):617-620, 2003.

LU, F.M.; HAWKINS, R.D. Presynaptic and postsynaptic Ca(2+) and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(11):4264-4269, 2006.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon** 26(9):759-772, 1988.

LUGER, T.J.; HAYASHI, T.; WEISS, C.G.; HILL, H.F. The spinal potentiating effect and the supraspinal inhibitory effect of midazolam on opioid-induced analgesia in rats. **Eur J Pharmacol** 275(2):153-162, 1995.

LUO, Z.D.; CALCUTT, N.A.; HIGUERA, E.S.; VALDER, C.R.; SONG, Y.H.; SVENSSON, C.I.; MYERS, R.R. Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. **J Pharmacol Exp Ther** 303(3):1199-1205, 2002.

LUO, Z.D.; CHAPLAN, S.R.; HIGUERA, E.S.; SORKIN, L.S.; STAUDERMAN, K.A.; WILLIAMS, M.E.; YAKSH, T.L. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **J Neurosci** 21(6):1868-1875, 2001.

LUVISETTO, S.; MARINELLI, S.; PANASITI, M.S.; D'AMATO, F.R.; FLETCHER, C.F.; PAVONE, F.; PIETROBON, D. Pain sensitivity in mice lacking the Ca(v)2.1alpha1 subunit of P/Q-type Ca2+ channels. **Neuroscience** 142(3):823-832, 2006.

LYNCH, J.J., 3RD; HONORE, P.; ANDERSON, D.J.; BUNNELLE, W.H.; MORTELL, K.H.; ZHONG, C.; WADE, C.L.; ZHU, C.Z.; XU, H.; MARSH, K.C.; LEE, C.H.; JARVIS, M.F.; GOPALAKRISHNAN, M. (L)-Phenylglycine, but not necessarily other alpha2delta subunit voltage-gated calcium channel ligands, attenuates neuropathic pain in rats. **Pain** 125(1-2):136-142, 2006.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain** 76(1-2):215-222, 1998.

MALMBERG, A.B.; BRANDON, E.P.; IDZERDA, R.L.; LIU, H.; MCKNIGHT, G.S.; BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J Neurosci** 17(19):7462-7470, 1997a.

MALMBERG, A.B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC gamma. **Science** 278(5336):279-283, 1997b.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. **J Neurosci** 14(8):4882-4890, 1994.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. **Pain** 60(1):83-90, 1995.

MANNION, R.J.; DOUBELL, T.P.; COGGESHALL, R.E.; WOOLF, C.J. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. **J Neurosci** 16(16):5189-5195, 1996.

MAO, J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. **Brain Res Brain Res Rev** 30(3):289-304, 1999.

MAO, J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. **Pain** 100(3):213-217, 2002.

MAO, J.; MAYER, D.J. Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. **Ann N Y Acad Sci** 933:175-184, 2001.

MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. **J Neurosci** 14(4):2301-2312, 1994.

MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J. Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. **Pain** 61(3):353-364, 1995.

MAO, J.; PRICE, D.D.; PHILLIPS, L.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. **Neurosci Lett** 198(2):75-78, 1995.

MARABESE, I.; ROSSI, F.; PALAZZO, E.; DE NOVELLIS, V.; STAROWICZ, K.; CRISTINO, L.; VITA, D.; GATTA, L.; GUIDA, F.; DI MARZO, V.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception. **J Neurophysiol** 98(1):43-53, 2007.

MAREK, P.; BEN-ELIYAHU, S.; GOLD, M.; LIEBESKIND, J.C. Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. **Brain Res** 547(1):77-81, 1991.

MARSHALL, I.; WEINSTOCK, M. Quantitative method for assessing one symptom of the withdrawal syndrome in mice after chronic morphine administration. **Nature** 234(5326):223-224, 1971.

MATSUMURA, S.; KUNORI, S.; MABUCHI, T.; KATANO, T.; NAKAZAWA, T.; ABE, T.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, T.; OKUDA-ASHITAKA, E.; ITO, S. Impairment of CaMKII activation and attenuation of neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylated at Tyr1472. **Eur J Neurosci** 32(5):798-810, 2010.

MATTHEWS, E.A.; BEE, L.A.; STEPHENS, G.J.; DICKENSON, A.H. The Cav2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. **Eur J Neurosci** 25(12):3561-3569, 2007.

MATTHEWS, E.A.; DICKENSON, A.H. Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. **Pain** 92(1-2):235-246, 2001.

MAYER, D.J.; MAO, J.; HOLT, J.; PRICE, D.D. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(14):7731-7736, 1999.

MAYER, D.J.; WOLFLE, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J.C. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science** 174(16):1351-1354, 1971.

MCDONOUGH, S.I.; SWARTZ, K.J.; MINTZ, I.M.; BOLAND, L.M.; BEAN, B.P. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. **J Neurosci** 16(8):2612-2623, 1996.

MCGARAUGHTY, S.; FARR, D.A.; HEINRICHER, M.M. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res** 1009(1-2):223-227, 2004.

MCGIVERN, J.G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatr Dis Treat** 3(1):69-85, 2007.

MCLACHLAN, E.M.; JANIG, W.; DEVOR, M.; MICHAELIS, M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature** 363(6429):543-546, 1993.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science** 150(699):971-979, 1965.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med** 348(13):1243-1255, 2003.

MENG, G.; WU, N.; ZHANG, C.; SU, R.B.; LU, X.Q.; LIU, Y.; YUN, L.H.; ZHENG, J.Q.; LI, J. Analgesic activity of ZC88, a novel N-type voltage-dependent calcium channel blocker, and its modulation of morphine analgesia, tolerance and dependence. **Eur J Pharmacol** 586(1-3):130-138, 2008.

MERSKEY, H; BOGDUK, N. Classification of chronic pain – descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2th ed. Seattle, USA: IASP Press, 2002.

MESTEK, A.; HURLEY, J.H.; BYE, L.S.; CAMPBELL, A.D.; CHEN, Y.; TIAN, M.; LIU, J.; SCHULMAN, H.; YU, L. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. **J Neurosci** 15:2396-2406, 1995.

MEYER, RA.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: MCMAHON SB, KOLTZENBURG M. Wall and Melzack's Textbook of Pain. Philadelphia: Elsevier, p. 3–34, 2008.

MICHALUK, J.; KAROLEWICZ, B.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; VETULANI, J. Effects of various Ca²⁺ channel antagonists on morphine analgesia, tolerance and dependence, and on blood pressure in the rat. **Eur J Pharmacol** 352(2-3):189-197, 1998.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol** 57(1):1-164, 1999.

MILLER, R.J. Multiple calcium channels and neuronal function. **Science** 235(4784):46-52, 1987.

MIN, B.H.; AUGUSTIN, L.B.; FELSHEIM, R.F.; FUCHS, J.A.; LOH, H.H. Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(19):9081-9085, 1994.

MIRANDA, D.M.; ROMANO-SILVA, M.A.; KALAPOTHAKIS, E.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; SANTOS, T.M.; PRADO, M.A.; GOMEZ, M.V. Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. **Neuroreport** 9(7):1371-1373, 1998.

MIZUMURA, K. Peripheral mechanism of hyperalgesia--sensitization of nociceptors. **Nagoya J Med Sci** 60(3-4):69-87, 1997.

MOCHIDA, S.; WESTENBROEK, R.E.; YOKOYAMA, C.T.; ZHONG, H.; MYERS, S.J.; SCHEUER, T.; ITOH, K.; CATTERALL, W.A. Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(5):2819-2824, 2003.

MOGIL, J.S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci** 10(4):283-294, 2009.

MOGIL, J.S.; YU, L.; BASBAUM, A.I. Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. **Annu Rev Neurosci** 23:777-811, 2000.

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P. Drug development from marine natural products. **Nat Rev Drug Discov** 8(1):69-85, 2009.

MOORE, K.A.; BABA, H.; WOOLF, C.J. Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn. **Prog Brain Res** 129:63-80, 2000.

MOORE, K.A.; KOHNO, T.; KARCHEWSKI, L.A.; SCHOLZ, J.; BABA, H.; WOOLF, C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **J Neurosci** 22(15):6724-6731, 2002.

MOULD, J.; YASUDA, T.; SCHROEDER, C.I.; BEEDLE, A.M.; DOERING, C.J.; ZAMPONI, G.W.; ADAMS, D.J.; LEWIS, R.J. The alpha2delta auxiliary subunit reduces affinity of omega-conotoxins for recombinant N-type (Cav2.2) calcium channels. **J Biol Chem** 279(33):34705-34714, 2004.

MÜLLER, J. Handbuch der Physiologie des Menschen für Vorlesungen. Koblenz: J. Hölscher, 1840.

MURAKAMI, M.; NAKAGAWASAI, O.; SUZUKI, T.; MOBARAKEH, II; SAKURADA, Y.; MURATA, A.; YAMADERA, F.; MIYOSHI, I.; YANAI, K.; TANNONO, K.; SASANO, H.; TADANO, T.; IJIMA, T. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel alpha 1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. **Brain Res** 1024(1-2):122-129, 2004.

NAFE, J.P. A quantitative theory of feeling. **J Gen Psychol** 2:199-211, 1929.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **J Pharmacol Exp Ther** 306(2):490-497, 2003.

NARITA, M.; NARITA, M.; MIZOGUCHI, H.; TSENG, L.F. Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse. **Eur J Pharmacol** 280(2):1-3, 1995.

NEUBERT, M.J.; KINCAID, W.; HEINRICHER, M.M. Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. **Pain** 110(1-2):158-165, 2004.

NEWCOMB, R.; PALMA, A.; FOX, J.; GAUR, S.; LAU, K.; CHUNG, D.; CONG, R.; BELL, J.R.; HORNE, B.; NADASDI, L.; ET AL. SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider *Segestria florentina*. **Biochemistry** 34(26):8341-8347, 1995.

NEWCOMB, R.; SZOKE, B.; PALMA, A.; WANG, G.; CHEN, X.; HOPKINS, W.; CONG, R.; MILLER, J.; URGE, L.; TARCZY-HORNOCH, K.; LOO, J.A.; DOOLEY, D.J.; NADASDI, L.; TSIEN, R.W.; LEMOS, J.; MILJANICH, G. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. **Biochemistry** 37(44):15353-15362, 1998.

NEWTON, R.A.; BINGHAM, S.; CASE, P.C.; SANGER, G.J.; LAWSON, S.N. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. **Brain Res Mol Brain Res** 95(1-2):1-8, 2001.

NGUYEN, D.; DENG, P.; MATTHEWS, E.A.; KIM, D.S.; FENG, G.; DICKENSON, A.H.; XU, Z.C.; LUO, Z.D. Enhanced pre-synaptic glutamate release in deep-dorsal horn contributes to calcium channel alpha-2-delta-1 protein-mediated spinal sensitization and behavioral hypersensitivity. **Mol Pain** 5:6, 2009.

NORTON, R.S.; PALLAGHY, P.K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. **Toxicon** 36(11):1573-1583, 1998.

O'CONNOR, A.B.; DWORKIN, R.H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. **Am J Med** 122(10 Suppl):22-32, 2009.

OBARA, I.; PARKITNA, J.R.; KOROSTYNSKI, M.; MAKUCH, W.; KAMINSKA, D.; PRZEWLOCKA, B.; PRZEWLOCKI, R. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain** 141(3):283-291, 2009.

OHSAWA, M.; KAMEI, J. Role of intracellular calcium in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. **Brain Res** 833(2):278-281, 1999.

OHSAWA, M.; NARITA, M.; MIZOGUCHI, H.; CHENG, E.; TSENG, L.F. Reduced hyperalgesia induced by nerve injury, but not by inflammation in mice lacking protein kinase C gamma isoform. **Eur J Pharmacol** 429(1-3):157-160, 2001.

OHSAWA, M.; NARITA, M.; MIZOGUCHI, H.; SUZUKI, T.; TSENG, L.F. Involvement of spinal protein kinase C in thermal hyperalgesia evoked by partial sciatic nerve ligation, but not by inflammation in the mouse. **Eur J Pharmacol** 403(1-2):81-85, 2000.

OLIVERA, B.M.; GRAY, W.R.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J.M.; VARGA, J.; RIVIER, J.; DE SANTOS, V.; CRUZ, L.J. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science** 230(4732):1338-1343, 1985.

OLIVERA, B.M.; CRUZ, L.J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G.W.; GRIFFIN, D.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J.M.; GALYEAN, R.; VARGA, J.; GRAY, W.R. et al. Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. **Biochemistry** 26(8):2086-2090, 1987.

OLIVERA, B.M.; MILJANICH, G.P.; RAMACHANDRAN, J.; ADAMS, M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. **Annu Rev Biochem** 63: 823-867, 1994.

OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F. Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. **Life Sci** 73(6):783-800, 2003.

OSSIPOV, M.H.; LOPEZ, Y.; NICHOLS, M.L.; BIAN, D.; PORRECA, F. The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. **Neurosci Lett** 199(2):87-90, 1995.

PENN, R.D.; PAICE, J.A. Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. **Pain** 85(1-2):291-296, 2000.

PERL, E.R. Myelinated afferent fibres innervating the primate skin and their response to noxious stimuli. **J Physiol** 197(3):593-615, 1968.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nat Rev Neurosci** 8(1):71-80, 2007.

PERT, C.B.; KUCHAR, M.J.; SNYDER, S.H. Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 73(10):3729-3733, 1976.

PIEDRAS-RENTERIA, E.S.; TSIEN, R.W. Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(13):7760-7765, 1998.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci** 25(6):319-325, 2002.

PRADO, M.A.; GUATIMOSIM, C.; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; ROMANO-SILVA, M.A. A novel tool for the investigation of glutamate

release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochem J.** 314:145-150, 1996.

PRICE, D.D. Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. **Mol Interv** 2(6):392-403, 339, 2002.

PRICE, D.D.; MAYER, D.J. Neurophysiological characterization of the anterolateral quadrant neurons subserving pain in *M. mulatta*. **Pain** 1(1):59-72, 1975.

PRICE-CARTER, M.; HULL, M.S.; GOLDENBERG, D.P. Roles of individual disulfide bonds in the stability and folding of an omega-conotoxin. **Biochemistry** 37(27):9851-9861, 1998.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur J Pharmacol** 429(1-3):79-91, 2001.

PUD, D.; COHEN, D.; LAWENTAL, E.; EISENBERG, E. Opioids and abnormal pain perception: New evidence from a study of chronic opioid addicts and healthy subjects. **Drug Alcohol Depend** 82(3):218-223, 2006.

RAUCK, R.L.; WALLACE, M.S.; LEONG, M.S.; MINEHART, M.; WEBSTER, L.R.; CHARAPATA, S.G.; ABRAHAM, J.E.; BUFFINGTON, D.E.; ELLIS, D.; KARTZINEL, R. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of intrathecal ziconotide in adults with severe chronic pain. **J Pain Symptom Manage** 31(5):393-406, 2006.

REZENDE JUNIOR, L.; CORDEIRO, M.N.; OLIVEIRA, E.B.; DINIZ, C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon** 29(10):1225-1233, 1991.

ROSENBLUM, A.; MARSCH, L.A.; JOSEPH, H.; PORTENOY, R.K. Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions. **Exp Clin Psychopharmacol** 16(5):405-416, 2008.

RUEFF, A.; DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent fibres in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. **Neuroscience** 54(2):527-535, 1993.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu Rev Med** 49:123-133, 1998.

RYCROFT, B.K.; VIKMAN, K.S.; CHRISTIE, M.J. Inflammation reduces the contribution of N-type calcium channels to primary afferent synaptic transmission onto NK1 receptor-positive lamina I neurons in the rat dorsal horn. **J Physiol** 580(Pt.3):883-894, 2007.

SAEGUSA, H.; KURIHARA, T.; ZONG, S.; MINOWA, O.; KAZUNO, A.; HAN, W.; MATSUDA, Y.; YAMANAKA, H.; OSANAI, M.; NODA, T.; TANABE, T. Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(11):6132-6137, 2000.

SAEGUSA, H.; MATSUDA, Y.; TANABE, T. Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission. **Neurosci Res** 43(1):1-7, 2002.

SANCHEZ-BLAZQUEZ, P.; RODRIGUEZ-MUNOZ, M.; MONTERO, C.; DE LA TORRE-MADRID, E.; GARZON, J. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phospholipase C- β protein. **Neuropharmacology** 54(2):319-330, 2008.

SCHENBERG, W.; PEREIRA LIMA, F.A. Pharmacology of the polypeptides from the venom of the spider Phoneutria. **Mem Instit Butan** 33:627-638, 1966.

SCHERRER, G.; IMAMACHI, N.; CAO, Y.Q.; CONTET, C.; MENNICKEN, F.; O'DONNELL, D.; KIEFFER, B.L.; BASBAUM, A.I. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. **Cell** 137(6):1148-1159, 2009.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci** 5 Suppl(1062-1067), 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain** 43(2):205-218, 1990.

SHACHAM, S.; TOPF, M.; AVISAR, N.; GLASER, F.; MARANTZ, Y.; BAR-HAIM, S.; NOIMAN, S.; NAOR, Z.; BECKER, O.M. Modeling the 3D structure of GPCRs from sequence. **Med Res Rev** 21(5):472-483, 2001.

SHERRINGTON, C. S. The Integrative Action of the Nervous System. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1906.

SHIFF, J.M. Lehrbuch der physiologie des menschen. Lahr: Schauenberg, 1858.

SIHRA, T.S.; PEARSON, H.A. Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor KN62 attenuates glutamate release by inhibiting voltage-dependent Ca(2+)-channels. **Neuropharmacology** 34(7):731-741, 1995.

SNUTCH, T.P. Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. **NeuroRx** 2(4):662-670, 2005.

SNYDER, S.H.; PASTERNAK, G.W. Historical review: Opioid receptors. **Trends Pharmacol Sci** 24(4):198-205, 2003.

SOLDO, B.L.; MOISES, H.C. μ -opioid receptor activation inhibits N- and P-type Ca²⁺ channel currents in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus. **J Physiol** 513:787-804, 1998.

SOUZA, A.H.; FERREIRA, J.; CORDEIRO MDO, N.; VIEIRA, L.B.; DE CASTRO, C.J.; TREVISAN, G.; REIS, H.; SOUZA, I.A.; RICHARDSON, M.; PRADO, M.A.; PRADO, V.F.; GOMEZ, M.V. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. **Pain** 140(1):115-126, 2008.

STAATS, P.S.; YEARWOOD, T.; CHARAPATA, S.G.; PRESLEY, R.W.; WALLACE, M.S.; BYAS-SMITH, M.; FISHER, R.; BRYCE, D.A.; MANGIERI, E.A.; LUTHER, R.R.; MAYO, M.; MCGUIRE, D.; ELLIS, D. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. **Jama** 291(1):63-70, 2004.

STANFA, L.; DICKENSON, A. Spinal opioid systems in inflammation. **Inflamm Res** 44(6):231-241, 1995.

STILLMAN, M.J.; MOULIN, D.E.; FOLEY, K.M. Paradoxical pain following high-dose spinal morphine. **Pain** 4:(Suppl), 1987.

STOCKER, J.W.; NADASDI, L.; ALDRICH, R.W.; TSIEN, R.W. Preferential interaction of omega-conotoxins with inactivated N-type Ca²⁺ channels. **J Neurosci** 17(9):3002-3013, 1997.

SUTTON, K.G.; SIOK, C.; STEA, A.; ZAMPONI, G.W.; HECK, S.D.; VOLKMANN, R.A.; AHLIJANIAN, M.K.; SNUTCH, T.P. Inhibition of neuronal calcium channels by a novel peptide spider toxin, DW13.3. **Mol Pharmacol** 54(2):407-418, 1998.

SWARTZ, K.J. Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. **Neuron** 11(2):305-320, 1993.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience** 32(3):577-580, 1989.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanisms in the skin of the rat. **Brain Res** 492(1-2):397-399, 1989.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience** 48(2):485-490, 1992.

TANG, L.; SHUKLA, P.K.; WANG, L.X.; WANG, Z.J. Reversal of morphine antinociceptive tolerance and dependence by the acute supraspinal inhibition of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. **J Pharmacol Exp Ther** 317(2):901-909, 2006a.

TANG, L.; SHUKLA, P.K.; WANG, Z.J. Trifluoperazine, an orally available clinically used drug, disrupts opioid antinociceptive tolerance. **Neurosci Lett** 397(1-2):1-4, 2006b.

TANG, N.K.; CRANE, C. Suicidality in chronic pain: a review of the prevalence, risk factors and psychological links. **Psychol Med** 36(5):575-586, 2006.

TASSAIN, V.; ATTAL, N.; FLETCHER, D.; BRASSEUR, L.; DEGIEUX, P.; CHAUVIN, M.; BOUHASSIRA, D. Long term effects of oral sustained release morphine on neuropsychological performance in patients with chronic non-cancer pain. **Pain** 104(1-2):389-400, 2003.

TEDFORD, H.W.; ZAMPONI, G.W. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. **Pharmacol Rev** 58(4):837-862, 2006.

TOKUMITSU, H.; CHIJIWA, T.; HAGIWARA, M.; MIZUTANI, A.; TERASAWA, M.; HIDAKA, H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J Biol Chem** 265(8):4315-4320, 1990.

TRUJILLO, K.A.; AKIL, H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. **Science** 251(4989):85-87, 1991.

UMEDA, M.; OHKUBO, T.; ONO, J.; FUKUIZUMI, T.; KITAMURA, K. Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca²⁺ channels in dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic mice. **Life Sci** 79(21):1995-2000, 2006.

URBAN, M.O.; COUTINHO, S.V.; GEBHART, G.F. Biphasic modulation of visceral nociception by neurotensin in rat rostral ventromedial medulla. **J Pharmacol Exp Ther** 290(1):207-213, 1999.

URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(14):7687-7692, 1999.

URBAN, M.O.; REN, K.; SABLAD, M.; PARK, K.T. Medullary N-type and P/Q-type calcium channels contribute to neuropathy-induced allodynia. **Neuroreport** 16(6):563-566, 2005.

VIEIRA, L.B.; KUSHMERICK, C.; HILDEBRAND, M.E.; GARCIA, E.; STEA, A.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; GOMEZ, M.V.; SNUTCH, T.P. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. **J Pharmacol Exp Ther** 314(3):1370-1377, 2005.

WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **J Physiol (Lond)** 188:403-423, 1967.

WALL, P.D.; DEVOR, M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. **Pain** 17(4):321-339, 1983.

WALL, P.D.; GUTNICK, M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. **Exp Neurol** 43(3):580-593, 1974.

WALLACE, M.S.; RAUCK, R.; FISHER, R.; CHARAPATA, S.G.; ELLIS, D.; DISSANAYAKE, S. Intrathecal ziconotide for severe chronic pain: safety and tolerability results of an open-label, long-term trial. **Anesth Analg** 106(2):628-637, table of contents, 2008.

WANG, D.; QUILLAN, J.M.; WINANS, K.; LUCAS, J.L.; SADEE, W. Single nucleotide polymorphisms in the human mu opioid receptor gene alter basal G protein coupling and calmodulin binding. **J Biol Chem** 276(37):34624-34630, 2001.

WELCH, S.P.; OLSON, K.G. Opiate tolerance-induced modulation of free intracellular calcium in synaptosomes. **Life Sci** 48(19):1853-1861, 1991.

WEN, Z.H.; CHANG, Y.C.; CHERNG, C.H.; WANG, J.J.; TAO, P.L.; WONG, C.S. Increasing of intrathecal CSF excitatory amino acids concentration following morphine challenge in morphine-tolerant rats. **Brain Res** 995(2):253-259, 2004.

WESTENBROEK, R.E.; HOSKINS, L.; CATTERALL, W.A. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. **J Neurosci** 18(16):6319-6330, 1998.

WHISTLER, J.L.; CHUANG, H.H.; CHU, P.; JAN, L.Y.; VON ZASTROW, M. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. **Neuron**. 23(4):737-746, 1999.

WHITE, J.M. Pleasure into pain: the consequences of long-term opioid use. **Addict Behav** 29:1311-1324, 2004.

WINQUIST, R.J.; PAN, J.Q.; GRIBKOFF, V.K. Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. **Biochem Pharmacol** 70(4):489-499, 2005.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature** 306(5944):686-688, 1983.

WOOLF, C.J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(14):7723-7730, 1999.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet** 353(9168):1959-1964, 1999.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science** 288(5472):1765-1769, 2000.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R.E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. **Nature** 355(6355):75-78, 1992.

WOOLF, C.J.; THOMPSON, S.W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. **Pain** 44(3):293-299, 1991.

YAJIMA, Y.; NARITA, M.; SHIMAMURA, M.; NARITA, M.; KUBOTA, C.; SUZUKI, T. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. **Brain Res** 992(2):288-293, 2003.

YAKSH, T.L. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. **J Pain** 7(1 Suppl 1):S13-30, 2006.

YANG, L.; STEPHENS, G.J. Effects of neuropathy on high-voltage-activated Ca(2+) current in sensory neurones. **Cell Calcium** 46(4):248-256, 2009.

YASAKA, T.; TIONG, S.Y.; HUGHES, D.I.; RIDDELL, J.S.; TODD, A.J. Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. **Pain** 151(2):475-488, 2010.

YOKOYAMA, K.; KURIHARA, T.; SAEGUSA, H.; ZONG, S.; MAKITA, K.; TANABE, T. Blocking the R-type (Cav2.3) Ca²⁺ channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. **Eur J Neurosci** 20(12):3516-3519, 2004.

YUSAF, S.P.; GOODMAN, J.; GONZALEZ, I.M.; BRAMWELL, S.; PINNOCK, R.D.; DIXON, A.K.; LEE, K. Streptozocin-induced neuropathy is associated with altered expression of voltage-gated calcium channel subunit mRNAs in rat dorsal root ganglion neurones. **Biochem Biophys Res Commun** 289(2):402-406, 2001.

ZAMPONI, G.W. Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. **J Pharmacol Sci** 92(2):79-83, 2003.

ZAMPONI, G.W.; BOURINET, E.; NELSON, D.; NARGEOT, J.; SNUTCH, T.P. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. **Nature** 385(6615):442-446, 1997.

ZEITZ, K.P.; MALMBERG, A.B.; GILBERT, H.; BASBAUM, A.I. Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice. **Pain** 94(3):245-253, 2001.

ZHANG, J.F.; ELLINOR, P.T.; ALDRICH, R.W.; TSIEN, R.W. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. **Nature** 372(6501):97-100, 1994.

ZHOU, H.Y.; CHEN, S.R.; CHEN, H.; PAN, H.L. Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. **J Neurosci** 30(12):4460-4466, 2010.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16(2):109-110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol** 429(1-3):23-37, 2001.

ZOTTERMAN, Y. Studies in the peripheral nervous mechanism of pain. **Acta Med Scand** 80:1-64, 1933.

IX. APÊNDICES

IX. APÊNDICES

APÊNDICE A - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE TX3-3 NO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EVOCADO POR FORMALINA.

O teste da formalina é considerado um modelo de dor evocada por estímulo químico, com características de dor inflamatória aguda. A injeção de formalina na pata traseira dos animais causa uma resposta tipicamente bifásica: durante os primeiros 5 minutos observa-se intensa resposta nociceptiva, que consiste em morder e/ou morder a pata injetada. O período de 0–5 minutos após a administração da formalina é chamado de fase neurogênica. Logo após uma interfase, que dura aproximadamente 10 minutos, onde pouca ou nenhuma resposta nociceptiva é observada, tem início a segunda fase do teste, chamada de fase inflamatória. A fase inflamatória é caracterizada por uma resposta do animal de lambem, morder, sacudir ou proteger (manter recolhida) a pata injetada, que persiste por aproximadamente 1 hora (HUNSKAAR E HOLE, 1987). Para a realização do teste, foi injetado 20 µl de uma solução de 2,5% de formalina em água destilada (v/v) na pata direita traseira dos camundongos. Imediatamente após a injeção, os animais foram transferidos para uma caixa (20 x 20x 20 cm) com paredes e assoalho de vidro, sendo que, sob o assoalho, foi mantido um espelho em um ângulo de 45°, para otimizar a observação do comportamento do animal. O comportamento nociceptivo – tempo, medido em segundos (s), em que o animal permaneceu lambendo, mordendo, sacudindo a pata ou com a mesma recolhida – foi observado nos primeiros 5 minutos (fase neurogênica) e dos 15 aos 30 minutos (fase inflamatória) após a administração de formalina (CORRÊA E CALIXTO, 1993).

A análise do efeito da Tx3-3 no teste da formalina foi feito através da aplicação de dois protocolos de administração, denominados pré- e pós-tratamento. No protocolo de pré-tratamento, os camundongos foram administrados com 30 pmol/sítio de Tx3-3 por via intratecal 5 minutos antes da injeção intraplantar de formalina. O pós-tratamento consistiu em administrar a Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) no período de interfase, 10 minutos após a administração intraplantar de formalina (aproximadamente 5 minutos antes de começar a fase inflamatória).

Quando pré-administrada (30 pmol/sítio, i.t., 5 minutos antes da administração de formalina), a Tx3-3 não alterou o comportamento nociceptivo dos camundongos em ambas as fases (Figura IA). Todavia, a administração de Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) 10 minutos após a injeção de formalina inibiu em $47,5 \pm 15,6\%$ o comportamento de nociceção dos camundongos (Figura IB).

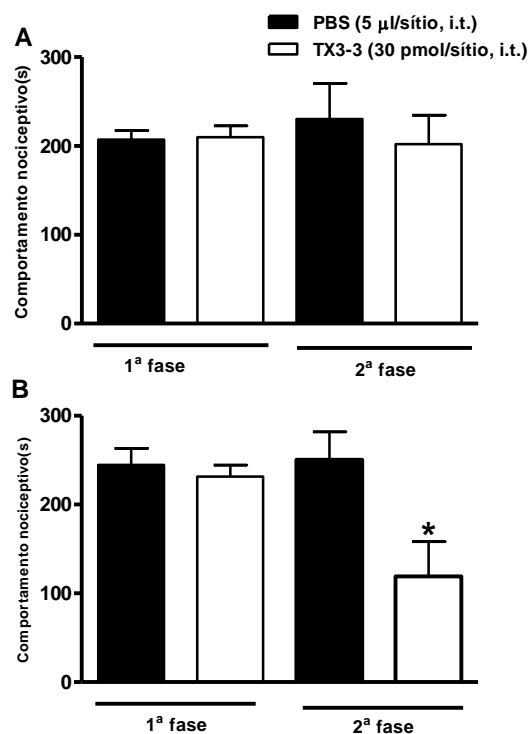


Figura I. Efeito da administração intratecal de Tx3-3 no comportamento nociceptivo evocado por formalina. (A) Efeito do pré-tratamento com Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) 5 minutos antes da injeção de formalina (2,5%; 20 µl/pata, s.c.). (B) Efeito do pós-tratamento com Tx3-3 (30 pmol/sítio, i.t.) 10 minutos após injeção de formalina (2,5%; 20 µl/pata, s.c.). Os resultados estão expressos como comportamento nociceptivo, em segundos (s). Cada coluna representa a média de 8 a 10 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. A análise estatística foi executada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls $P < 0,05$ denota o nível de significância em comparação ao grupo controle (tratado com PBS).

APÊNDICE B - EFEITO DA INIBIÇÃO DA CAMKII ESPINHAL NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MORFINA

Da mesma maneira que a Tx3-3, a administração intratecal de KN62 (10 nmol/sítio) 15 minutos antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) recuperou o efeito antinociceptivo da morfina em camundongos tolerantes (o %MPE da morfina foi de $88,1 \pm 11,9$ e $71,6 \pm 11,9$ nos animais não tolerantes e tolerantes tratados com KN62, respectivamente – Figura IIA) e neuropáticos (o %MPE da morfina foi de $0,9 \pm 2,8$ and $47,8 \pm 9,5$ nos camundongos neuropáticos pré-tratados com PBS e KN62, respectivamente – Figura IIC). Como pode ser visto nas Figuras IIB e IID, a inibição da CaMKII imediatamente antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) reverteu a hiperalgesia induzida pela administração crônica de morfina e também a hiperalgesia produzida pela neuropatia. No entanto, a pré-administração de KN62 (10 nmol/sítio, i.t.) não causou aumento significativo do efeito antinociceptivo causado pela administração da dose sub-efetiva de morfina (o %MPE causado pela administração i.p. de 3 mg/Kg de morfina foi de $-2,25 \pm 3,55$ e $-0,97 \pm 3,78$ em camundongos pré-tratados com PBS e KN62, respectivamente – dados não mostrados).

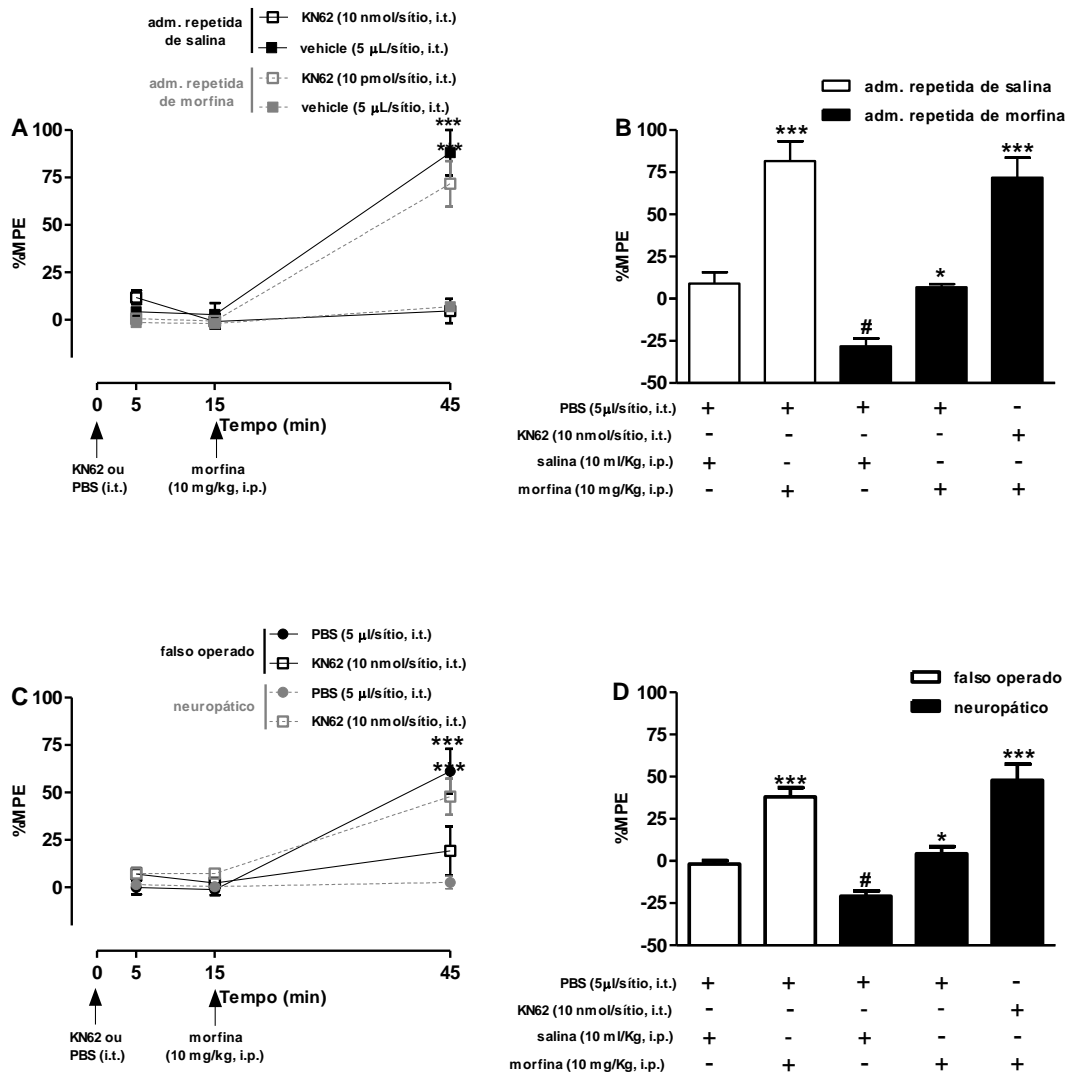


Figura II. Efeito da administração intratecal de KN62 na eficácia analgésica da morfina em estados hiperálgicos resistentes a opióides. (A) Efeito da administração de KN62 (10 nmol/sítio, i.t.) na eficácia analgésica da morfina (10 mg/Kg, i.p.) em camundongos submetidos ao modelo de tolerância a opióides. (B) Efeito da administração de KN62 (10 nmol/sítio, i.t.) 15 minutos antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) na hiperálgia térmica causada pelo modelo de tolerância a opióides. (C) Efeito da administração de KN62 (10 nmol/sítio, i.t.) na eficácia analgésica da morfina (10 mg/Kg, i.p.) em camundongos neuropáticos. (D) Efeito da administração de KN62 (10 nmol/sítio, i.t.) 15 minutos antes da administração de morfina (10 mg/Kg, i.p.) na hiperálgia térmica induzida por neuropatia. Os resultados estão expressos como % MPE. Cada coluna ou ponto representam a média de 8 a 9 animais e as linhas verticais expressam o erro padrão. Os símbolos * e # denotam os níveis de significância em comparação aos grupos controle. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ referem-se à diferença significativa em relação ao grupo tratado com PBS ; # $P < 0,05$ refere-se à diferença significativa em relação ao grupo tolerante a opióides (B) ou ao grupo neuropático (D).

APÊNDICE C- MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA PAIN

Elsevier Editorial System(tm) for Pain
Manuscript Draft

Manuscript Number: PAIN-D-10-7179

Title: Antinociceptive effect of the armed spider toxin Tx3-3 in acute and chronic animal models of pain

Article Type: Full-Length Article

Keywords: Neuropathic pain; calcium channel; calcium channel blocker; toxin; antinociception; pain.

Corresponding Author: Dr. Juliano Ferreira,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Santa Maria

First Author: Gerusa D Dalmolin, M.D.

Order of Authors: Gerusa D Dalmolin, M.D.; Cássia R Silva; Flávia K Rigo; Marta do Nascimento Cordeiro; Michael Richardson; Marco Aurélio R Silva; Marco Antonio M Prado; Marcus V Gomez; Juliano Ferreira

Abstract: In this study we investigated the analgesic potential of Tx3-3, a toxin isolated from *Phoneutria nigriventer* venom that blocks voltage-dependent calcium channels (VDCC). Intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) administration of Tx3-3 in mice caused a short-lasting antinociceptive effect in an acute thermal model of pain, without visible side effects. In contrast, the injection of the VDCC blocker omega-conotoxin MVIIC produced motor disabilities at doses close to those able to reduce acute nociception. When tested in neuropathic pain models, Tx3-3 showed a long-lasting antinociceptive effect. Spinal injection of Tx3-3 diminished tactile allodynia caused by partial ligation of the sciatic nerve in mice and also by diabetes in mice and rats. On the other hand, i.t. Tx3-3 was ineffective in the model of chronic inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. Taken together, our data show that Tx3-3 is effective in neuropathic pain models, suggesting that this toxin may have potential to be used as a therapeutic agent to control neuropathic pain.

Suggested Reviewers: Giles A Rae
garae@farmaco.ufsc.br

Gerald W Zamponi
zamponi@ucalgary.ca

Carolyn Fairbanks
carfair@umn.edu

Andrew Rice
a.rice@imperial.ac.uk

Opposed Reviewers:

Santa Maria, June 15th, 2010.

Professor Allan I. Basbaum
Editor-in-Chief, PAIN

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript “**Antinociceptive effect of the armed spider toxin Tx3-3 in acute and chronic animal models of pain**”, which we are submitting for publication in PAIN®. We declare that there are not any financial or other relationships that might lead to a conflict of interest on our manuscript. Moreover, we recommend Dr. Frank Porreca as Field Editor and the potential Reviewers cited below:

1) Giles Alexander Rae

Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Brazil.
garae@farmaco.ufsc.br

2) Carolyn Fairbanks

Department of Pharmaceutics, University of Minnesota, USA.
carfair@umn.edu

3) Andrew Rice

Department of Anaesthetics, Pain Medicine & Intensive Care, Imperial College
London, UK.
a.rice@imperial.ac.uk

4) Gerald W. Zamponi

Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Canada.
zamponi@ucalgary.ca

Sincerely yours,

Professor Juliano Ferreira

Antinociceptive effect of the armed spider toxin Tx3-3 in acute and chronic animal models of pain

Gerusa Duarte Dalmolin¹, Cássia Regina da Silva², Flávia Karine Rigo¹, Marta do Nascimento Cordeiro³, Michael Richardson³, Marco Aurélio Romano Silva⁴, Marco Antonio Máximo Prado^{1,6}, Marcus Vinícius Gomez^{1,4,5}, Juliano Ferreira^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴Laboratório de Neurociência, Departamento de Saúde Mental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁵Núcleo de Pós-graduação, Santa Casa de Belo Horizonte, Brazil.

⁶Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

*Corresponding author: Juliano Ferreira, Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Tel: 55 55 32208053; Fax: 55 55 32208031.

E-mail: ferreiraj99@gmail.com

Abstract

In this study we investigated the analgesic potential of Tx3-3, a toxin isolated from *Phoneutria nigriventer* venom that blocks voltage-dependent calcium channels (VDCC). Intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) administration of Tx3-3 in mice caused a short-lasting antinociceptive effect in an acute thermal model of pain, without visible side effects. In contrast, the injection of the VDCC blocker ω -conotoxin MVIIC produced motor disabilities at doses close to those able to reduce acute nociception. When tested in neuropathic pain models, Tx3-3 showed a long-lasting antinociceptive effect. Spinal injection of Tx3-3 diminished tactile allodynia caused by partial ligation of the sciatic nerve in mice and also by diabetes in mice and rats. On the other hand, i.t. Tx3-3 was ineffective in the model of chronic inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. Taken together, our data show that Tx3-3 is effective in neuropathic pain models, suggesting that this toxin may have potential to be used as a therapeutic agent to control neuropathic pain.

Keywords: neuropathic pain; calcium channel; calcium channel blocker; toxin; antinociception, pain

1. Introduction

Venoms from spiders, cone snails, snakes and scorpions contain a pharmacopoeia of toxins that block receptors or channel activation as a means of producing shock, paralysis or death in their prey. Alternatively, these venoms have produced exceptional leads for drug development [16,33]. For example, ziconotide, the synthetic version of the peptide ω -conotoxin MVIIA found in the venom of the marine cone snail *Conus magus*, was approved (commercial name Prialt®) for the treatment of pain in patients who require intrathecal analgesia and are refractory to opioid therapy. Ziconotide was demonstrated to be efficacious in the management of severe and chronic pain by blocking spinal N-type voltage-dependent calcium channels [43].

Voltage-dependent calcium channels (VDCC) are a family of ion channels classified by both their electrophysiological and pharmacological properties. They have been generally divided into low-threshold (T-type) and high-threshold (L-, N-, P/Q- and R-types) [30]. In addition, the contribution of different VDCCs to nociception processes has gained considerable interest in recent years [3,59,66]. In fact, their presence in pain modulation areas, such as the spinal cord, dorsal root ganglia (DRG) and brainstem, indicate the essential role of these types of VDCCs in the processing of pain-related information in the central nervous system [21,27,48,70]. Furthermore, VDCCs seem to be implicated in the central pain sensitization that occurs following nerve injury and during inflammatory states [40,41,58].

The management of chronic inflammatory and, mainly, neuropathic pain is still a major challenge to clinicians because of its unresponsiveness to most of the

currently used analgesic drugs [15,71]. The discovery of an efficacious analgesic substance from cone-snail venom led to an interest in animal venom toxins with the potential to treat chronic pain. In this sense, the venom of the Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* possesses a cocktail of peptide toxins that modulate ion channels [19]. The purified fraction 3 of *Phoneutria nigriventer* venom (PhTx3) contains 6 toxin isoforms (Tx3-1 to 6) [9] that target VDCCs with different affinity patterns. Recently, one toxin, Tx3-6, isolated from PhTx3, which we have patented, named Ph α 1 β , demonstrated preferentially blocks the N-type calcium current [67]. Ph α 1 β has been demonstrated to be as potent as ω -conotoxin MVIIA to produce antinociception but presented higher therapeutic index than ω -conotoxin MVIIA in preclinical experiments [61]. Here, we focus on another PhTx3-purified toxin, the polypeptide Tx3-3, which blocks VDCCs with a preference against P/Q- and R-type calcium currents [32].

Thus, the present study aimed to investigate the analgesic potential of Tx3-3 in different animal models of pain and to compare its effects with those elicited by another P/Q-type VDCC blocker, the ω -conotoxin MVIIC, extracted from the marine cone snail *Conus magus* [23,42].

2. Methods

2.1. Animals

Male and female adult Swiss mice weighing 25-35 g and male adult Wistar rats weighing 250-300g were maintained in home cages under a 12:12 h light-dark cycle (lights on 06:00 h) and at a constant room temperature (22 ± 2 °C). The animals were acclimatized in the laboratory for at least 1 h before testing. The experiments were approved by the ethics committee of the Universidade Federal de Santa Maria (process number: 23081.005024/2010-88), and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals [75]. The number of animals and the intensity of the noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of drug treatments.

2.2. Drugs

The toxin Tx3-3 was purified from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* by a combination of chromatographic steps according to the method of Cordeiro et al. [9]. Tx3-3 has a molecular weight of approximately 6300.00 Da, and its N-terminal amino acid sequence is GCANAYKSCNGPHTCCWGYNGYKKACICSG?NWK [9]. The toxin ω -conotoxin-MVIIC was purchased from Latoxan (Valence, France). Complete Freund's adjuvant (CFA), streptozotocin (STZ) and morphine were obtained from Sigma (USA).

2.3. Drugs administration

Tx3-3, MVIIC and morphine were administered by the intrathecal (i.t.) and intracerebroventricular (i.c.v.) routes, according to the techniques described by Hylden & Wilcox [25] and by Laursen & Belknap [31], respectively. The i.t. and i.c.v. injections were delivered in a volume of 5 µl/site to mice and 10 µl/site to rats. STZ were administered by intraperitoneal (i.p) route in a volume of 10 and 1 ml/Kg to mice and rats, respectively. Tx3-3, MVIIC and morphine were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and STZ was dissolved in citrate buffer (pH 4.5). Behavioral testing was performed blind with respect to drug administration.

2.4. Behavior procedures

2.4.1. Tail-flick test

Measurement of thermal acute nociception was carried out as described by D'Amour and Smith [10], with some modifications [63]. Briefly, after the environmental habituation period, the animals were gently handled and had two thirds of their tail dipped into a bath containing water kept at $48 \pm 1^\circ\text{C}$. This low intensity stimulus yields baseline latencies (9-12 seconds) that are long enough to observe hyperalgesia or analgesia. The latency to withdraw the tail from the hot bath was recorded with a stopwatch. Each animal was tested twice before the administration of drugs to obtain the baseline withdrawal latency and several times after drug treatments. If no response occurred within 24 seconds, the test was terminated to avoid tissue damage. The results were expressed in % baseline latency, calculated as follows: % baseline latency = $(\text{latency post-drug} - \text{latency pre-drug}) / (\text{latency pre-drug}) \times 100$.

Male and female animals were used in this test because no difference was observed in baseline withdrawal latency between male and female mice in earlier pilot tests (mean latency of 10.95 ± 1.73 s and 10.10 ± 1.28 s for males and females, respectively).

2.4.2. Von Frey test

The measurement of the mechanical paw withdrawal threshold was carried out using the up-down paradigm, as described previously by Chaplan et al. [7], with minor modifications [61]. Briefly, mice were first acclimatized (1–2 hours) in individual clear Plexiglass boxes (9 x 7 x 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the hind paws. Von Frey filaments of increasing stiffness (0.02–10 g) were applied to the mice hind paw plantar surface with a pressure high enough to bend the filament. The absence of a paw lifting after 5 seconds led to the use of the next filament with increasing weight, whereas paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weaker filament. This paradigm continued for a total of six measurements, including the one before the first paw-lifting response had been made, or until four consecutive positive (assigned a score of 0.030 g or 6.59 g for mice or rats, respectively) or four consecutive negative (assigned a score of 6.76 g or 83.22 g for mice or rats, respectively) responses occurred. The 50% mechanical paw withdraw threshold (PWT) response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon [11]. The PWT was expressed in grams (g) and was evaluated before and several times after intrathecal injection of Tx3-3. A significant decrease in PWT compared to baseline values was considered as mechanical allodynia.

2.4.3. Side-effects assessment

The locomotor performance was tested in the rotarod apparatus as described previously [14], with some adaptations [44]. Five minutes after i.t. or i.c.v. administration of different doses of Tx3-3 or MVIIC, the animals were placed on a rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm) and during a 2-minute period we counted the number of falls and recorded the first fall latency. High doses of morphine (70 nmol/site, i.t. or 35 nmol/site, i.c.v.), which are able to disrupt motor activity in mice [34], were used as a positive control to the test.

To evaluate muscular weakness, the animals were submitted to a righting reflex test, according to Luvisetto et al. [35], that consisted of placing the mouse horizontally with its back on the table, which normally gives rise to an immediate coordinated twisting of the body to an upright position. The time to twist the body to the right position was recorded manually with a stopwatch.

Intended to identify any other abnormal behavior usually elicited by the central administration of toxins that block VDCCs [37], we qualitatively attempted to assess gross behaviors of treated animals, such as whole-body shaking, coordination problems, muscle weakness, paralysis and serpentine-like movements of the tail.

2.5. Induction of chronic inflammation

The complete Freund's adjuvant (CFA) inflammatory model was used to induce chronic inflammation, according to Ferreira et al. [18]. Briefly, male mice received a 20 µl intradermal injection of complete Freund's adjuvant [CFA - 1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin oil (85%) and mannide monooleate

(15%)] into the right hind paw. Tx3-3 was administered concomitantly or 48 hours after CFA injection by the i.t. route. The CFA-induced mechanical allodynia was evaluated through von Frey filaments before and several times after Tx3-3 administration.

2.6. Induction of traumatic neuropathy

For the induction of peripheral traumatic mononeuropathy, male mice were first anesthetized (90 mg/Kg of ketamine plus 3 mg/Kg of xylazine hydrochloride, i.p.), and then a partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one-half of the dorsal portion of the sciatic nerve, using a previously described procedure [36]. In sham-operated mice, the control group, the nerve was only exposed without any ligation. Seven days after the surgical procedure, the mechanical sensitivity was measured with von Frey filaments to verify the development of allodynia.

2.7. Induction of diabetic neuropathy

For the induction of diabetic polyneuropathy, male mice and male rats received 200 and 50 mg/kg of streptozotocin (STZ), respectively, according to the methods described by Ohsawa and Kamei [49] and Calcutt and Chaplan [5]. Hyperglycemia was confirmed through a strip-operated reflectance meter (Accu-Check, Roche Diagnostics, Brazil) using blood taken by a tail prick. Further, paw mechanical sensitivity was evaluated using von Frey filaments to verify the development of neuropathic allodynia. Glucose values and mechanical allodynia were verified after 15 or 21 days of diabetic induction in mice and rats, respectively. Only animals with a

blood glucose concentration > 300 mg/dl and established mechanical allodynia were included in the diabetic group.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by Student's t test or a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls' or Bonferroni posttests when appropriate. P values < 0.05 were considered significant. When possible, the ED₅₀ values were calculated by non-linear regression using a sigmoidal dose-response equation from the individual experiments, using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA); these were reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits.

3. Results

3.1. Antinociceptive and side effects produced by the intrathecal injection of peptide toxins in mice

Intended to verify the effect of Tx3-3 on short-lasting nociception, we tested its action in the tail-flick test. Spinal administration of the *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-3 (1-100 pmol/site) elicited an increase in the tail-flick latency when compared to the control group (Fig. 1A). The ED₅₀ value (and the 95% confidence limits) calculated for Tx3-3 antinociception was 8.8 (4.1-18.8) pmol/site, and the maximum effect (E_{max}) obtained by the injection of 100 pmol/site of Tx3-3 was 51±14% of the baseline latency. Spinal injection of Tx3-3 produced a rapid onset of antinociception, with a maximum response detected 5 minutes post-dosing. Thereafter, the levels of antinociception decreased, returning quickly to baseline levels, in about 15 minutes

(Fig. 1B). Additionally, there was no difference in duration (data not shown) or magnitude of the Tx3-3 antinociceptive effect between male and female mice (the % baseline latency 5 min after Tx3-3 i.t. injection was 46 ± 9 and 56 ± 17 for males and females, respectively). Tx3-3 did not produce visible abnormal effects on central and motor functions following a spinal injection of 300 pmol/site.

To further confirm the absence of any motor disability induced by the i.t. injection of Tx3-3, we assessed locomotor performance in mice using the rotarod test 5 min after Tx3-3 injection. No motor impairment was observed at any dose of Tx3-3, whereas the i.t. injection of a high dose of morphine (70 nmol/site, used as a positive control) impaired locomotor performance in the mice (Table 1). Moreover, Tx3-3 did not change the natural righting reflex when administered intrathecally (0.11 ± 0.02 seconds and 0.12 ± 0.03 seconds to twist the body for 48 pmol/site of Tx3-3 and PBS, respectively) neither in 5 minutes (when the maximum effect in tail-flick test occurred) nor in 30 minutes post-injection.

Furthermore, we compared the effects of Tx3-3 with ω -conotoxin MVIIC. Spinal administration of 300 pmol/site of ω -conotoxin MVIIC produced a marked enhancement of mice tail withdrawal latency ($204\pm 31\%$ of baseline latency) from 5 min post-injection (Fig. 1D), but no alteration in the tail-flick response was observed following the injection of a lower dose (100 pmol/site) (Fig. 1C). For this reason, it was not possible to estimate the ED_{50} value for the MVIIC antinociceptive effect when administered by the spinal route. Furthermore, the higher ω -conotoxin MVIIC dose tested (300 pmol/site) produced toxic effects around 30 minutes after intrathecal injection, visualized as hind limb flaccid paralysis. This motor disability was quantified through the righting reflex test. Intrathecal injection of ω -conotoxin MVIIC delayed the

righting reflex (2.78 ± 0.67 seconds compared with 0.12 ± 0.03 seconds for i.t. PBS; $P < 0.001$, Student's t test). This resulting paralysis prohibited the testing of the animals in the rotarod test. The paralysis, though not systematically examined, was found to be reversed within 24 hours. Thus, ω -conotoxin MVIIC produced an effect in the tail-flick test only at a dose where it caused motor impairment.

3.2. Effects produced by intracerebroventricular injection of peptide toxins in acute nociception and motor behavior in mice

Attempting to analyze the effect of Tx3-3 at supraspinal levels, where abundant levels of P/Q-type VDCCs are expressed [22], we administered this peptide toxin through the intracerebroventricular (i.c.v.) route. The i.c.v. injection of Tx3-3 (1-30 pmol/site) enhanced the tail-flick latency in a similar manner from that induced by intrathecal administration, except a shorter time-course of the antinociceptive effect was observed (Fig. 2B). The estimated ED_{50} value (and 95% confidence limits) was 3.7 (1.6-8.4) pmol/site, and the maximum effect (E_{max}), obtained by the injection of 30 pmol/site of Tx3-3, was $84 \pm 16\%$ of baseline latency (Fig. 2A). The supraspinal administration of Tx3-3 at a dose of up to 300 pmol/site did not induce perceptible effects on motor coordination or other abnormal behavior. To confirm the absence of motor impairment, the animals were observed in the rotarod test 5 minutes after i.c.v. administration. Supraspinal injection of Tx3-3 (1-300 pmol/site) did not change mice motor performance when compared to the control group (Table 1). The i.c.v. injection of morphine (35 nmol/site, used as a positive control) significantly impaired mice locomotor performance (Table 1).

We also compared the supraspinal effect of Tx3-3 with that elicited by the i.c.v. administration of ω -conotoxin MVIIC. Injection of ω -conotoxin MVIIC (0.3–3.0 pmol/site) induced acute antinociception ($62\pm 13\%$ and $10\pm 6\%$ of baseline latency for mice treated with 3 pmol/site of ω -conotoxin MVIIC and PBS, respectively) with a similar time-course of action (Fig. 2D), potency and efficacy of Tx3-3 (ED_{50} and E_{max} calculated values were 0.6 (0.1-2.8) pmol/site and $62\pm 13\%$ of baseline latency, respectively) (Fig. 2C).

However, the i.c.v administration of ω -conotoxin MVIIC at higher doses (10–300 pmol/site) produced some abnormal behaviors, such as intense whole-body shaking, coordination problems, circling behavior and muscle weakness beginning within a few minutes after ω -conotoxin MVIIC injection (Table 1).

We also examined the locomotor performance of mice treated with ω -conotoxin MVIIC in the rotarod test. As expected, supraspinal injection of ω -conotoxin MVIIC (10–30 pmol/site) impaired performance in the rotarod test in relation to the control group 5 minutes post-injection (Table 1). The highest dose tested (100–300 pmol/site) promoted severe motor disability, which prevented to test the animals in the rotarod test (Table 1).

Both i.t. or i.c.v. injection of Tx3-3 produced similar antinociceptive effects, but the former route is used in clinical area to deliver analgesic drugs directly into central nervous system. Thus, we chose the i.t. route to test the effect of Tx3-3 in clinically relevant models of pain.

3.3. Effects of intrathecal administration of Tx3-3 in an inflammatory pain model

First, we evaluated the effect of i.t. Tx3-3 injection in the early and late phases of inflammatory nociception. One group of animals received i.t. Tx3-3 (30 pmol/site) immediately after CFA injection, whereas the other group received i.t. Tx3-3 (30 pmol/site) 48 hours after CFA injection in the right hind paw. Mice injected with CFA developed mechanical allodynia, characterized by a significant reduction in the PWT when von Frey filaments were applied in injected paw (the value of 50% PWT diminished from 2.16 ± 0.44 g in baseline to 0.21 ± 0.07 g after CFA administration; $P < 0.001$, Student's t test). Tx3-3 neither prevented (Fig. 3A) nor reversed (Fig. 3B) the development of the early and late phases of mechanical allodynia. Furthermore, i.t. Tx3-3 did not alter the normal mechanical sensitivity of mice (Fig. 3C).

3.4. Effect of intrathecal administration of Tx3-3 in chronic neuropathic pain models

To assess the effect of i.t. Tx3-3 on allodynia induced by neuropathy, we produced mononeuropathic or polyneuropathic pain states using the partial sciatic nerve ligation injury and STZ-induced diabetic neuropathy, respectively.

Partial sciatic nerve ligation caused a decrease in paw withdrawal threshold measured 7 days after ligation (the value of 50% PWT diminished from 1.46 ± 0.25 g before ligation to 0.19 ± 0.05 g in neuropathic group; $P < 0.001$, Student's t test), whereas no change in mechanical sensitivity was observed in the sham-operated group (the 50% PWT values before and after the surgical procedure were 1.85 ± 0.33 g and 2.21 ± 0.29 g, respectively). The i.t. administration of Tx3-3 (30 pmol/site) reduced mechanical allodynia in neuropathic mice. The anti-allodynic effect was significant from 30 minutes after i.t. injection (46 ± 13 % of inhibition), persisted

unaltered at 60 minutes ($53 \pm 22\%$ of inhibition) and returned to baseline levels in approximately 120 minutes (Fig. 4A).

Mice treated with STZ showed increased blood glucose values (455.0 ± 17.5 mg/dl and 125.5 ± 4.8 mg/dl of glycemia in diabetic and control mice, respectively) and developed mechanical allodynia (values of 50% PWT in control and diabetic groups were 2.68 ± 0.36 g and 0.73 ± 0.23 g, respectively; $P < 0.001$, Student's t test). Intrathecal injection of Tx3-3 (30 pmol/site) substantially reduced tactile allodynia in diabetic neuropathic mice. This effect was evident 30 minutes post-injection ($69 \pm 9\%$ of inhibition), peaked at 60 minutes ($83 \pm 15\%$ of inhibition) and lasted 120 minutes ($57 \pm 11\%$ of inhibition) ending after approximately 240 minutes (Fig. 4B).

To confirm the antinociceptive power of Tx3-3, we tested its effects in another species. Similar to mice, rats treated with STZ showed increased blood glucose values (488.5 ± 41.4 mg/dl and 120.4 ± 12.1 mg/dl of glycemia in diabetic and control rat, respectively) and mechanical allodynia (values of 50% PWT to control and diabetic groups were 27.5 ± 4.8 g and 8.1 ± 1.3 g, respectively; $P < 0.001$, Student's t test). Intrathecal administration of Tx3-3 (30 pmol/site) was also effective in inhibiting the allodynia induced by diabetic neuropathy in rats. Although the anti-allodynic effect occurred faster in rats (inhibition of $70.7 \pm 19.3\%$ from 10 min after injection), both the efficacy and the duration of effect of Tx3-3 were similar to that observed in mice, lasting approximately 240 minutes (Fig. 5A). Moreover, as observed in mice, intrathecal injection of Tx3-3 did not alter the mechanical sensitivity of non-diabetic control rats (Fig. 5B).

4. Discussion

The venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* is a rich source of biologically active peptides, including the toxin Tx3-3, a high-threshold VDCC blocker. In the present study, we verified that central administration of Tx3-3 through i.t. and i.c.v. routes produced fast antinociception in an acute thermal nociception model without producing detectable side effects. Furthermore, Tx3-3 alleviated the allodynia resulting from chronic neuropathic states without changing the natural mechanical sensitivity in rodents. However, Tx3-3 did not change inflammatory-induced mechanical allodynia.

We first demonstrated that the central administration of Tx3-3 through i.t. and i.c.v. routes inhibited acute thermal nociception. Glutamate release in the spinal cord and in some supraspinal structures is involved in acute pain transmission [13,39]. Previous reports show that Tx3-3 inhibits calcium influx [46] and glutamate release in rat brain cortical synaptosomes through a mechanism coupled to calcium-dependent exocytosis [20,53]. In fact, Tx3-3 blocks VDCCs with greater efficacy against P/Q- and R-type calcium channels [32]. These VDCCs regulate the influx of calcium, initiating the release of various neurotransmitters at the spinal and supraspinal level [45,50]. Thus, the reduction in calcium-dependent glutamate release by Tx3-3 could explain, at least in part, the fast antinociception produced by both spinal and supraspinal injection of this toxin in the tail-flick test. Importantly, tail withdrawal is not only a simple spinal reflex, but it is also under the influence of supraspinal structures that modulate the descending pain-modulating pathways, such as the rostral ventromedial medulla and periaqueductal gray [2]. VDCCs expressed in such supraspinal pain-modulating structures contribute to the neurotransmitter-mediated

activation of descending facilitatory systems [52,55,65]. Therefore, i.c.v. injected Tx3-3 could be influencing the tail-flick response by blocking supraspinal VDCCs and further inhibiting glutamate release in descending pain-modulating structures.

Because it has been suggested that the generalizability of the findings from basic studies of pain could be improved by the inclusion of both sexes in the study [47], we have tested the antinociceptive effect of Tx3-3 in male and female mice. We did not find differences in the sensitivity to thermal stimulus or in the magnitude or duration of the Tx3-3 effect between the sexes. Our findings are in accordance with a recent study that also did not find differences in tail-flick sensitivity between male and female mice [60] and also indicates that the antinociceptive effect of Tx3-3 is not gender-dependent.

A known peptide toxin extracted from *Conus magus*, named ω -conotoxin MVIIC, mimics the actions produced by Tx3-3, both on glutamate release and on intracellular calcium changes [53]. Moreover, this ω -conopeptide blocks VDCCs with a preference for P/Q-type channels [23,42]. Thus, we decided to compare the ω -conotoxin MVIIC effect with that elicited by Tx3-3 in acute nociception. ω -conotoxin MVIIC showed, besides an antinociception action, numerous toxic effects when administered by i.t. or i.c.v. routes. Likewise, some of the observed abnormal behaviors produced by ω -conotoxin MVIIC i.c.v. injection were earlier described by Olivera and colleagues [50], who classified the ω -conotoxin MVIIC as a “shaker peptide”. The better pharmacological pattern of Tx3-3 in relation to ω -conotoxin MVIIC maybe is due to the Tx3-3 presents an additional affinity to the R-type calcium channels [32]. R-type calcium channels have a considerable role in nociception

[40,55,56], but seem not be involved in motor functions, which are generally attributed to P/Q-type calcium channels [26,35]. The non-selective pattern of Tx3-3 could, in this way, represents a positive attribute to its application.

Despite the effect observed in the acute thermal nociceptive test, the i.t. delivery of Tx3-3 did not modify normal mechanical sensitivity in mice. Noxious thermal and mechanical stimuli are detected by different types of sensory fibers. In the physiological state, heat pain behavior is produced by the activity of a peptidergic population of unmyelinated C-fibers, whereas mechanical pain is generated by the activity of nonpeptidergic unmyelinated C-fibers and thin myelinated ($A\delta$) fibers [6,12,57]. VDCCs are found throughout the DRG neurons, with different levels throughout unmyelinated and myelinated sensory neurons. N-type and R-type VDCCs are preferentially detected in peptidergic unmyelinated neurons [17,70]. In contrast, P/Q-type VDCCs predominate in the terminals of non-peptidergic C-fibers and $A\delta$ -fibers in the dorsal horn of the spinal cord [70]. The lack of effects of Tx3-3 on normal mechanical sensitivity, despite its effect in tail-flick test, may be due to a better action of Tx3-3 on R- than on P/Q-type in the physiological state. Events such as inflammation or nerve injury may establish a reorganization in dorsal horn of the spinal cord, with the switching of neuronal phenotype by changing the pattern of expression or activity of some ion channels, such as VDCCs [1,24,28,38,64,72,74]. These adaptations might explain the outcome of mechanical allodynia in neuropathic states and even be a determinant point to the longer pattern of action of Tx3-3 in neuropathy-induced mechanical allodynia.

Although numerous analgesic agents are available, neuropathic pain is still difficult to treat. A significant functional role of VDCCs in neuropathic pain

mechanisms has been substantiated by several lines of evidence [8,24,29,73]. In recent years, a diversity of toxins isolated from animal venoms targeting VDCCs has been tested to treat neuropathic pain [4,62,68,69]. Likewise, Tx3-3 demonstrated a promising effect on both mononeuropathy and polyneuropathy pain models. According to the inhibitory effect caused by ablation of P/Q- [35] or by blockage of R-type calcium channels [40] on allodynic state resulting from nerve injury, in the present study we showed that spinal administration of Tx3-3 was able to inhibit the tactile allodynia induced by both partial sciatic nerve ligation and STZ-induced diabetic neuropathy. Importantly, as Tx3-3 had no effect on normal mechanical sensitivity, we could suggest that neuropathy may cause pathophysiological adaptive changes in the expression or activity of the VDCCs preferentially targeted by this toxin. Accordingly, a *in vivo* electrophysiology study using the spinal nerve ligation model of neuropathy in rats demonstrated that sensitization following nerve injury causes adaptive changes in R-type VDCCs [40], indicating that blockade of the R-type current could explain the inhibition of mechanical allodynia resulting from spinal Tx3-3 injection.

Moreover, spinal Tx3-3 was able to diminish diabetic neuropathic allodynia. Interestingly, STZ-induced diabetic neuropathy produces an enhanced expression of some VDCC subunit mRNAs in large myelinated afferent fibers in rats and mice [64,74]. In agreement, we observed a similar pattern of action of Tx3-3 in mice and rats submitted to diabetic neuropathy model. The degree of similarity of VDCCs is significantly greater across species, including mice, rats and humans [59]. This similarity is consistent with the significant conservation of the Tx3-3 anti-allodynic property between mice and rats.

Conversely, the CFA-inflammatory resultant mechanical allodynia was not prevented or reversed by intrathecal Tx3-3 delivery. Although VDCCs seem to play an important role in central sensitization, the mechanisms that undergo adaptive changes in these channels during inflammatory pain states remain poorly understood. Additionally, a study demonstrated that CFA-induced inflammation produced adaptive changes in N-type calcium channels at primary afferent synaptic transmission, without changes in P/Q- or R-type currents [54]. Therefore, it is possible that neither P/Q- nor R-type calcium channel are involved in central sensitization induced by CFA injection.

In summary, the armed spider toxin Tx3-3 was effective in alleviating neuropathic pain states, without promoting the adverse effects usually observed with the central administration of VDCC blockers. Therefore, our results hold significant promise that Tx3-3 can represent a novel therapeutic agent to manage neuropathic pain.

Acknowledgments

This study was supported by the Instituto do Milênio MCT/CNPq, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular MCT/CNPq, CAPES, PRONEX and FAPEMIG. The fellowships from CNPq, CAPES and FAPEMIG are also acknowledged.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Abe M, Kurihara T, Han W, Shinomiya K, Tanabe T. Changes in expression of voltage-dependent ion channel subunits in dorsal root ganglia of rats with radicular injury and pain. *Spine* 2002;27:1517-1524.
- [2] Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosc* 1984;7:309-338.
- [3] Bourinet E, Zamponi GW. Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Curr Top Med Chem* 2005;5:539-546.
- [4] Brose WG, Gutlove DP, Luther RR, Bowersox SS, McGuire D. Use of intrathecal SNX-111, a novel, N-type, voltage-sensitive, calcium channel blocker, in the management of intractable brachial plexus avulsion pain. *Clin J Pain* 1997;13:256-259.
- [5] Calcutt NA, Chaplan SR. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1997;122:1478-1482.
- [6] Cavanaugh DJ, Lee H, Lo L, Shields SD, Zylka MJ, Basbaum AI, Anderson DJ. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral

responses to noxious thermal and mechanical stimuli. Proc Natl Acad Sci 2009;106:9075-9080.

[7] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods 1994;53:55-63.

[8] Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. J Pharmacol Exp Ther 1994;269:1117-1123.

[9] Cordeiro Mdo N, de Figueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M. Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. Toxicon 1993;31:35-42.

[10] D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther 1941;72:74-79.

[11] Dixon JW. The up and down method for small samples. Stat Assoc 1965;60:967-968.

[12] D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. Br J Anaesth 2008;101:8-16.

[13] Dmitrieva N, Rodríguez-Malaver AJ, Pérez J, Hernández L. Differential release of neurotransmitters from superficial and deep layers of the dorsal horn in response to acute noxious stimulation and inflammation of the rat paw. *Eur J Pain* 2004;8:245-252.

[14] Dunham NW, Miya, TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Amer Pharm Assoc* 1957;208-210.

[15] Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132:237-251

[16] Estrada G, Villegas E, Corzo G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat Prod Rep* 2007;24:145-161.

[17] Fang Z, Park CK, Li HY, Kim HY, Park SH, Jung SJ, Kim JS, Monteil A, Oh SB, Miller RJ. Molecular basis of Ca(v)2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. *J Biol Chem*. 2007;282:4757-4764.

[18] 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; 41:1006-1012.

[19] Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MAM. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:579-588.

[20] Guatimosim C, Romano-Silva MA, Cruz JS, Beirão PS, Kalapothakis E, Moraes-Santos T, Cordeiro MN, Diniz CR, Gomez MV, Prado MA. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol* 1997;122:591-597.

[21] Heinke B, Balzer E, Sandkühler J. Pré- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca^{2+} channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci* 2004; 19:103-111.

[22] Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinás RR. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Nat Acad Sci* 1991;88:7076-7080.

[23] Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, Imperial JS, Olivera BM. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca^{2+} channels. *Neuron* 1992;9:69-77.

[24] Hogan QH, McCallum JB, Sarantopoulos C, Aason M, Mynlieff M, Kwok WM, Bosnjak ZJ. Painful neuropathy decreases membrane calcium current in mammalian primary afferent neurons. *Pain* 2000;86:43-53.

[25] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 1980;67:313-316.

[26] Jun K, Piedras-Rentería ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS. Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the α_{1A} -subunit. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:15245-15250.

[27] Knight YE, Bartsch T, Kaube H, Goadsby PJ. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? *J Neurosci* 2002;22:1-6.

[28] Koerber HR, Mirnics K, Kavookjian AM, Light AR. Ultrastructural analysis of ectopic synaptic boutons arising from peripherally regenerated primary afferent fibers. *J Neurophysiol* 1999;81:1636-1644.

[29] Kostyuk E, Pronchuk N, Shmigol A. Calcium signal prolongation in sensory neurones of mice with experimental diabetes. *Neuroreport* 1995;6:1010-1012.

[30] Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosc* 2006;7:548-562.

[31] Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 1986;16:355-357.

[32] Leão RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirão PSL. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology* 2000;39:1756-1767.

[33] Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:790-802.

[34] Luger TJ, Hayashi T, Weiss CG, Hill HF. The spinal potentiating effect and the supraspinal inhibitory effect of midazolam on opioid-induced analgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 1995;275:153-162.

[35] Luvisetto S, Marinelli S, Panasiti MS, D'Amato FR, Fletcher CF, Pavone F, Pietrobon D. Pain sensitivity in mice lacking the Ca(v)2.1alpha1 subunit of P/Q-type Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 2006; 142:823-832.

[36] Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998;76:215-222.

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

[38] Mannion RJ, Doubell TP, Coggeshall RE, Woolf CJ. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. *J Neurosci* 1996;16:5189-5195.

[39] Marabese I, Rossi F, Palazzo E, de Novellis V, Starowicz K, Cristino L, Vita D, Gatta L, Guida F, Di Marzo V, Rossi F, Maione S. Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception. *J Neurophysiol* 2007;98:43-53.

[40] Matthews EA, Bee LA, Stephens GJ, Dickenson AH. The Ca_v2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Neurosc* 2007; 25: 3561-3569.

[41] Matthews EA, Dickenson AH. Effects of spinally delivered N- and P-type voltage-dependent calcium channel antagonists on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy. *Pain* 2001;92:235-246.

[42] McDonough SI, Swartz KJ, Mintz IM, Boland LM, Bean BP. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *J Neurosci* 1996;16:2612-2623.

[43] McGivern JG. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007;3:69-85.

[44] Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P, Zanatta N, Martins MA, Mello CF, Rubin MA, Ferreira J, Bonacorso HG. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci* 2008;83:739-746.

[45] Miller RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987;235:46-52.

[46] Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, Prado MAM, Gomez MV. *Phoneutria nigriventer* toxins blocks tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport* 1998;9:1371-1373.

[47] Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:283-294.

[48] Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T, Iijima T.

Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel α_1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res* 2004;1024:122-129.

[49] Ohsawa M, Kamei J. Role of intracellular calcium in thermal allodynia and hyperalgesia in diabetic mice. *Brain Res* 1999;833:278-281.

[50] Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 1985;230:1338-1343.

[51] Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Ann Rev Biochem* 1994;63:823–867.

[52] Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 2002;25:319-325.

[53] Prado MA, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J* 1996;314:145-150.

[54] Rycroft BK, Vikman KS, Christie MJ. Inflammation reduces the contribution of N-type calcium channels to primary afferent synaptic transmission onto NK1 receptor-positive lamina I neurons in the rat dorsal horn. *J Physiol* 2007;580:883-894.

[55] Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Minowa O, Kazuno A, Han W, Matsuda Y, Yamanaka H, Osanai M, Noda T, Tanabe T. Altered pain responses in mice lacking α_{1E} subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:6132-6137.

[56] Saegusa H, Matsuda Y, Tanabe T. Effects of ablation of N- and R-type $Ca(2+)$ channels on pain transmission. *Neurosci Res* 2002;43:1-7.

[57] Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 2009;137:1148-1159.

[58] Sluka KA. Blockade of N- and P/Q-type calcium channels reduces the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 232-237.

[59] Snutch TP. Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx* 2005;2:662-670.

- [60] Solecki W, Krowka T, Kubik J, Kaczmarek L, Przewlocki R. Increased analgesic tolerance to acute morphine in fosB knock-out mice: a gender study. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90:512-516.
- [61] Souza AH, Ferreira J, Cordeiro Mdo N, Vieira LB, De Castro CJ, Trevisan G, Reis H, Souza IA, Richardson M, Prado MA, Prado VF, Gomez MV. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 2008;140:115-126.
- [62] Staats PS, Yearwood T, Charapata SG, Presley RW, Wallace MS, Byas-Smith M, Fisher R, Bryce DA, Mangieri EA, Luther RR, Mayo M, McGuire D, Ellis D. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:63-70.
- [63] Trevisan G, Maldaner G, Velloso NA, Sant'Anna G da S, Ilha V, Velho Gewehr C de C, Rubin MA, Morel AF, Ferreira J. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. *J Nat Prod* 2009;72:608-612.
- [64] Umeda M, Ohkubo T, Ono J, Fukuizumi T, Kitamura K. Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca²⁺ channels in dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci* 2006;79:1995-2006.

[65] Urban MO, Ren K, Sablad M, Park KT. Medullary N-type and P/Q-type calcium channels contribute to neuropathy-induced allodynia. *Neuroreport* 2005; 16:563-566.

[66] Vanegas H, Schaible H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 2000; 85:9-18.

[67] Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, Richardson M, Gomez MV, Snutch TP. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1370–1377.

[68] Wallace MS, Kosek PS, Staats P, Fisher R, Schultz DM, Leong M. Phase II, open-label, multicenter study of combined intrathecal morphine and ziconotide: addition of ziconotide in patients receiving intrathecal morphine for severe chronic pain. *Pain Med* 2008a;9:271-281.

[69] Wallace MS, Rauck R, Fisher R, Charapata SG, Ellis D, Dissanayake S. Intrathecal ziconotide for severe chronic pain: safety and tolerability results of an open-label, long-term trial. *Anesth Analg* 2008b;106:628-637.

[70] Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 1998;18:6319-6330.

[71] Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet* 1999;353:1959-1964.

[72] Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992;355:75-78.

[73] Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:13-30.

[74] Yusaf SH, Goodman J, Gonzalez IM, Bramwell S, Pinnock PD, Dixon AK, Lee K. Streptozocin-induced neuropathy is associated with altered expression of voltage-gated calcium channel subunit mRNAs in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:402-406.

[75] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.

Figure Legends

Fig. 1. Antinociceptive effects produced by the intrathecal injection of peptide toxins in the thermal acute model of pain in mice. Dose-response curve (A and C) and time-course effect (B and D) caused by the intrathecal injection of Tx3-3 (1-100 pmol/site) or MVIIC (100-300 pmol/site) in mice. The effect is expressed as % baseline latency. For dose-response curves, the % baseline latency was calculated at the antinociceptive peak (5 minutes). Each column or point represents the mean of six to nine animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post-test (A and C) or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (B and D), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Fig. 2. Antinociceptive effects produced by intracerebroventricular injection of peptide toxins in the thermal acute model of pain in mice. Dose-response curve (A and C) and time-course effect (B and D) caused by intracerebroventricular injection of Tx3-3 (1-30 pmol/site) or MVIIC (0.3-3 pmol/site) in mice. The effect is expressed as % baseline latency. For dose-response curves, the % baseline latency was calculated at the antinociceptive peak (5 minutes). Each column or point represents the mean of eight to eleven animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Student-Newman-

Keuls' post-test (A and C) or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (B and D), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 3. Intrathecal administration of Tx3-3 in the inflammatory pain model. (A) Effect of pre-administration of Tx3-3 (30 pmol/site) on allodynia induced by CFA-injection (20 μ l/paw) in mice. (B) Effect of post-administration of Tx3-3 (30 pmol/site) on allodynia induced by CFA-injection (20 μ l/paw) in mice. (C) Effect of intrathecal administration of Tx3-3 (30 pmol/site) on normal mechanical sensitivity in mice. The effects of Tx3-3 are expressed as 50% paw withdraw threshold (PWT). Each point represents the mean of eight animals, and vertical lines show the SEM. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA.

Fig. 4. Effect of intrathecal administration of Tx3-3 on chronic neuropathic pain models in mice. (A) Effect of Tx3-3 (30 pmol/site) on allodynia induced by partial sciatic ligation in mice. (B) Effect Tx3-3 (30 pmol/site) on allodynia induced by STZ-induced diabetic neuropathy in mice. The effects of Tx3-3 are expressed as 50% paw withdraw threshold (PWT). PWT was calculated seven (A) or fifteen (B) days after neuropathy induction. Each point represents the mean of seven to eleven animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with PBS-treated neuropathic group values. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Fig. 5. Effect of intrathecal administration of Tx3-3 in the diabetic neuropathic pain model in rats. (A) Effect of Tx3-3 (30 pmol/site) on allodynia resulted from diabetic neuropathy model in rats. (B) Effect of intrathecal administration of Tx3-3 (30 pmol/site) on normal mechanical sensitivity in rats. The effects of Tx3-3 are expressed as 50% paw withdraw thresholds (PWT). PWT was calculated twenty-one days after STZ administration. Each point represents the mean of five to six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with PBS-treated neuropathic group values. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test, *P<0.05, **P<0.01.

Summary

The toxin Tx3-3, a calcium channel blocker, produces analgesic effect in animal neuropathic pain model.

Table 1. Side-effects assessment of central administration of Tx3-3 or MVIIC on mice behavior

Drug/route	Dose (pmol/site)	Shaking	Muscle weakness	Paralysis	Rotarod test: Number of falls	Rotarod test: First fall latency
PBS/i.t		–	–	0/6	0.9 ± 0.4	84.3 ± 14.3
Morphine/i.t.	70 x 10 ³	–	–	0/5	3.0 ± 0.9***	31.6 ± 6.6*
Tx3-3/i.t.	1	0/5	0/5	0/5	0.4 ± 0.2	99.8 ± 12.5
	3	0/4	0/4	0/4	0.3 ± 0.3	108.3 ± 11.8
	10	0/4	0/4	0/4	0.3 ± 0.3	94.8 ± 25.3
	30	0/4	0/4	0/4	0.5 ± 0.3	115.0 ± 5.0
	48	0/4	0/4	0/4	0.8 ± 0.6	85.0 ± 22.1
	100	0/4	0/4	0/4	0.8 ± 0.5	96.6 ± 15.7
	300	0/4	0/4	0/4	0.2 ± 0.5	106.4 ± 13.6
MVIIC/i.t.	100	0/6	2/6	2/6	–	–
	300	0/8	6/8	6/8	–	–
PBS/i.c.v.		–	–	0/6	0.8 ± 0.7	93.5 ± 16.8
Morphine/i.c.v.	35 x 10 ³	–	–	0/4	7.8 ± 1.8***	25.3 ± 13.7*
Tx3-3/i.c.v.	1	0/6	0/6	0/6	0.2 ± 0.2	112.5 ± 7.5
	3	0/6	0/6	0/6	0.3 ± 0.2	91.2 ± 18.9
	10	0/5	0/5	0/5	0.8 ± 0.6	91.0 ± 18.7
	30	0/5	0/5	0/5	0.8 ± 0.4	86.6 ± 14.4
	100	0/6	0/6	0/6	0.7 ± 0.4	98.8 ± 13.8
	300	0/6	0/6	0/6	1.3 ± 0.5	74.6 ± 20.5
MVIIC/i.c.v.	0.3	0/5	0/5	0/5	0.8 ± 0.4	92.2 ± 14.2
	1	0/5	0/5	0/5	1.6 ± 0.6	60.8 ± 17.2

					<i>Δnândiras</i>
3	0/6	0/6	0/6	0.6 ± 0.3	92.0 ± 38.9
10	3/4	3/4	0/4	7.3 ± 2.5**	40.3 ± 26.7
30	6/8	6/8	0/8	4.8 ± 2.3*	7.3 ± 3.0**
100	3/3	3/3	0/3	–	–
300	2/2	2/2	0/2	–	–

Data are mean ± SEM of two to eight animals. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test, *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001 compared to control group (PBS-treated groups).

Figure 1

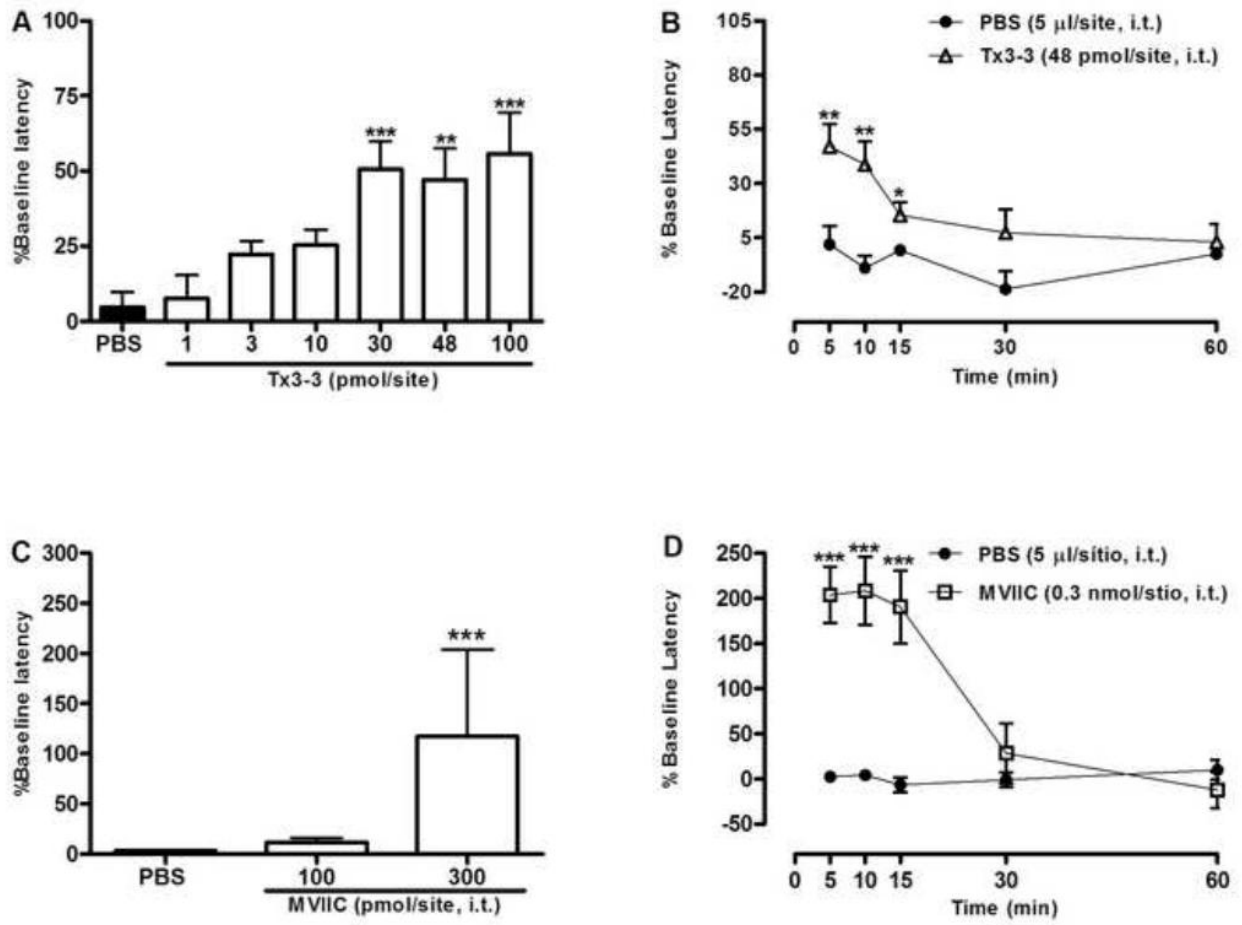


Figure 2

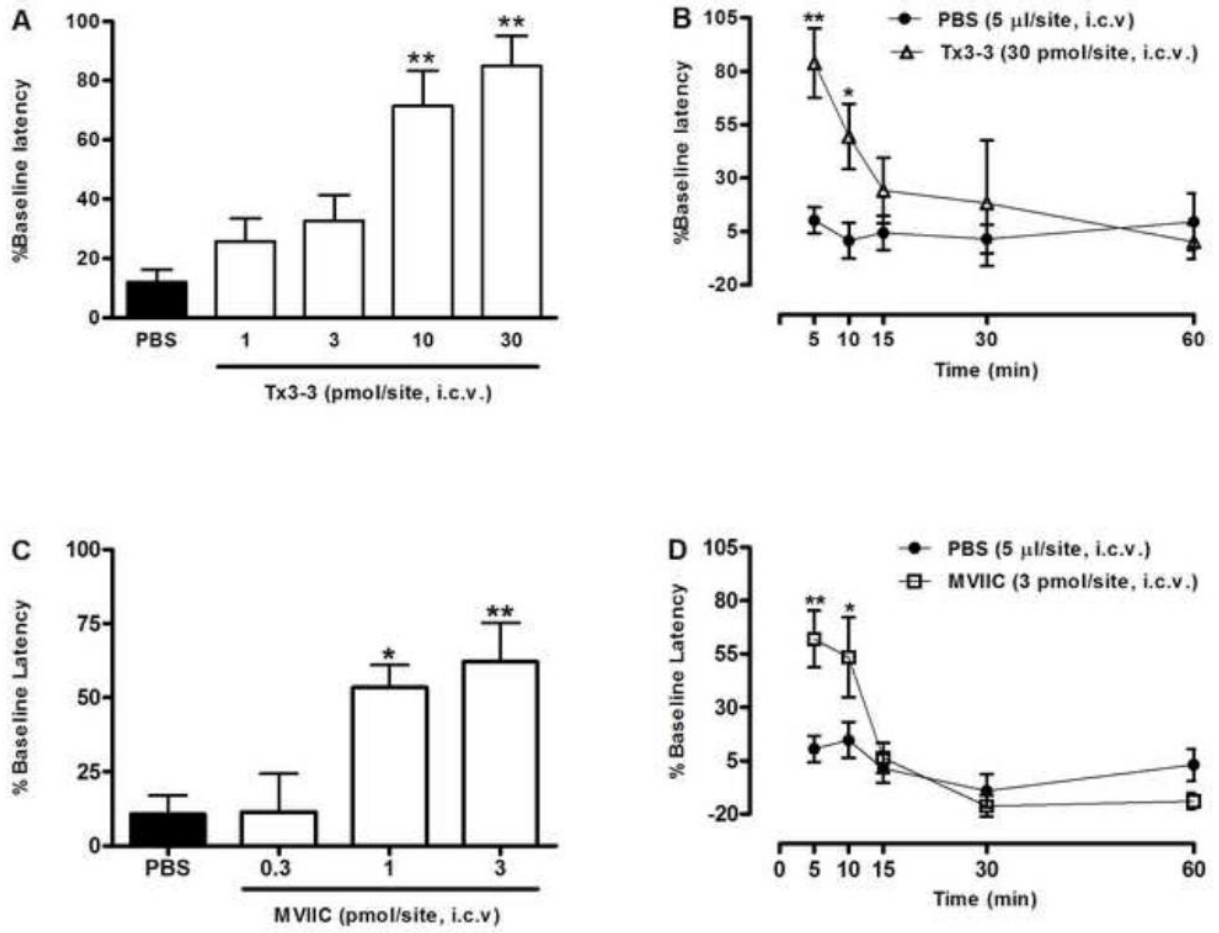


Figure 3

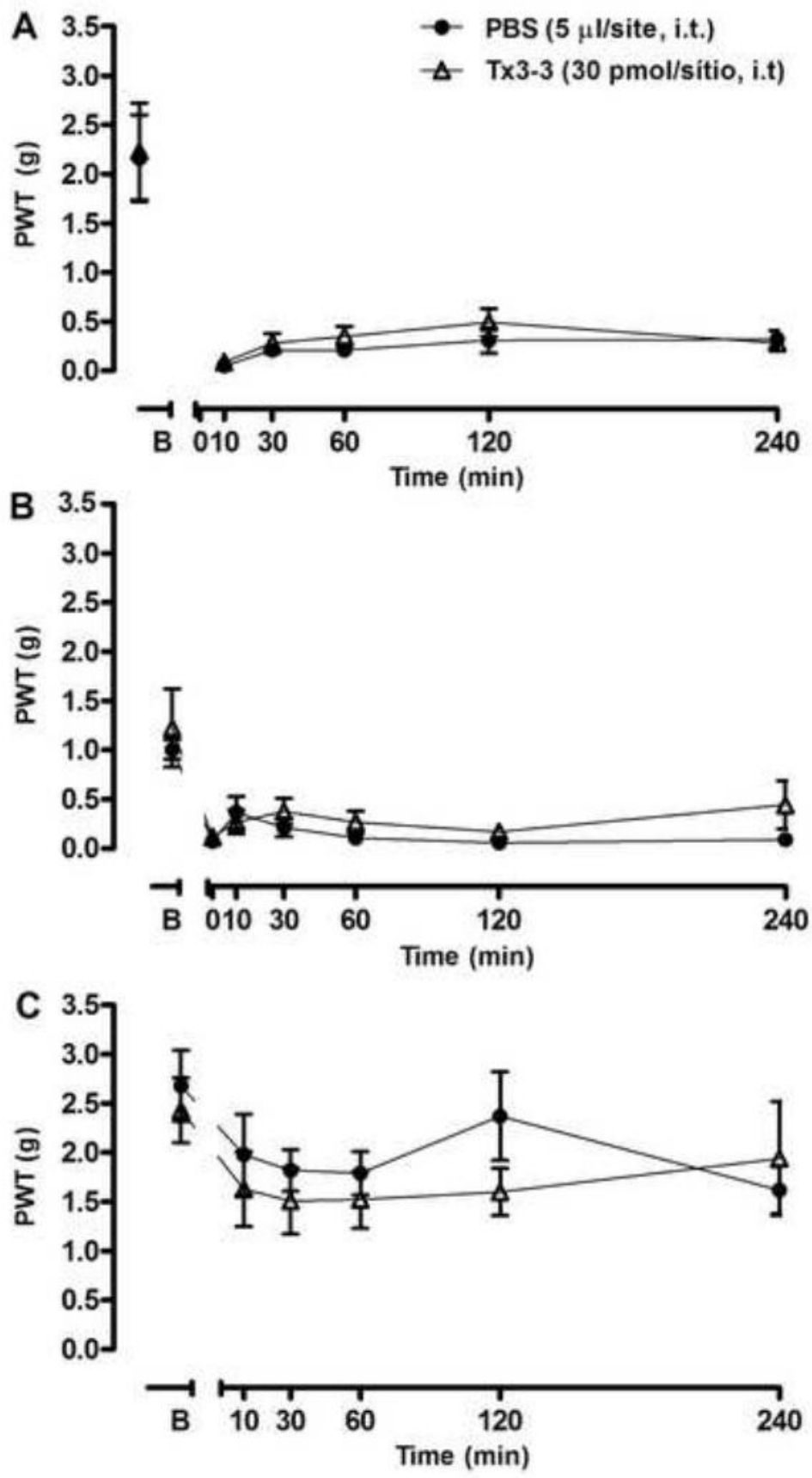


Figure 4

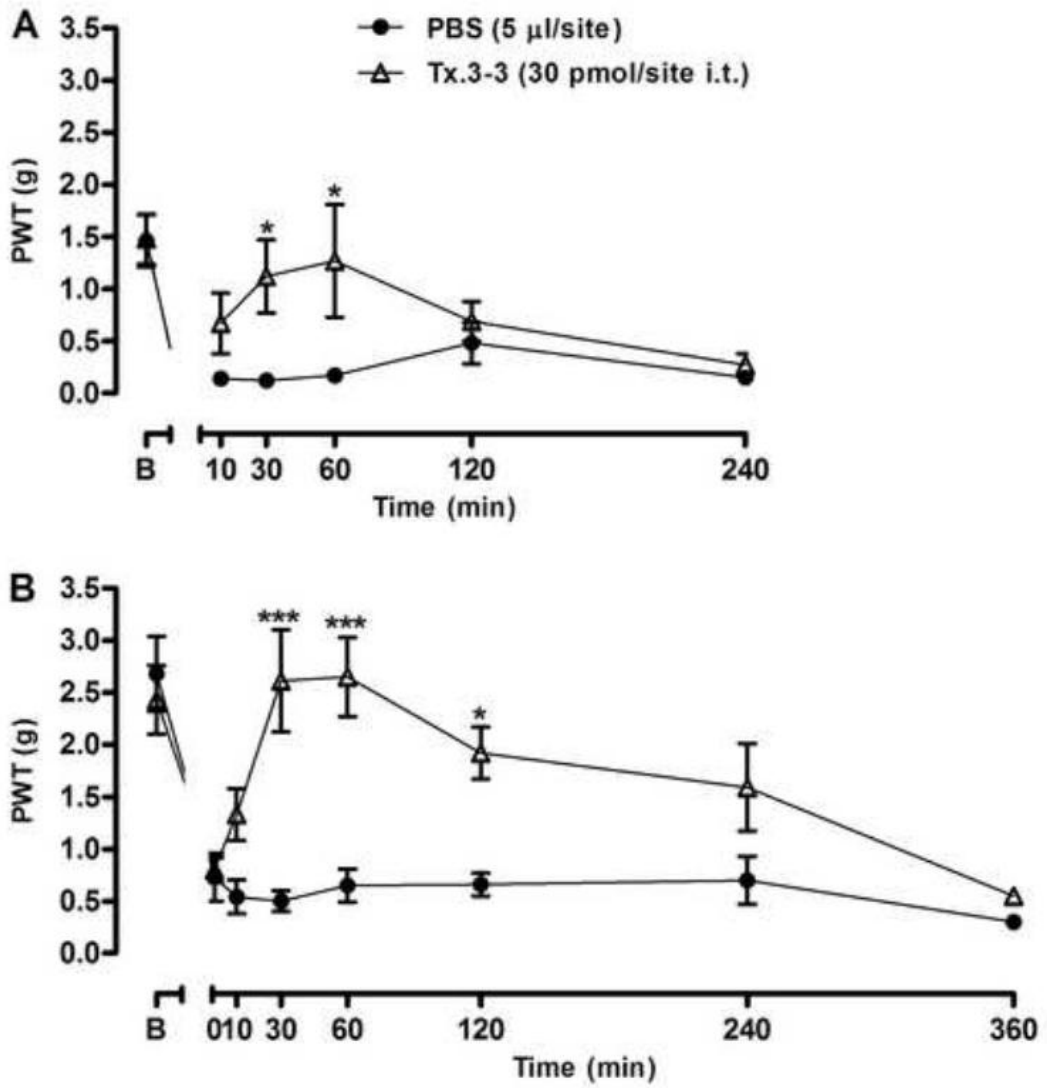


Figure 5

