

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1), isolada
do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*
(Keyserling, 1891)

Bruna Luiza Emerich Magalhães

Belo Horizonte

2013

Bruna Luiza Emerich Magalhães

Efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1), isolada
do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*
(Keyserling, 1891)

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Co-Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte
2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA), do Departamento de Bioquímica e Imunologia e no Laboratório de Dor e Analgesia do Departamento de Farmacologia, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Órgãos financiadores: CNPq, CAPES-TOXINOLOGIA, INCTTOX-FAPESP, FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

Dedico os agradecimentos deste trabalho às inúmeras pessoas, que pelos mais variados motivos me auxiliaram na realização deste.

À minha maravilhosa família que com toda a paciência e amor me deram apoio.

Aos colegas de “Bases” que estiveram comigo durante essa caminhada e não mediram esforços para me ajudar e principalmente me fazer feliz!

Aos amigos do LVTA – Laboratório de Venenos e Toxinas Animais pela presença e pela enorme disponibilidade de nos socorrer sempre que precisamos, com toda a alegria que é inerente a este lugar!

Aos alunos e à equipe do Laboratório de Dor e Analgesia por todas as técnicas transmitidas, todos os conceitos ensinados e todos os experimentos compartilhados. Lu, Átila, Paty, Giovane, Dani, Dani, Thiago, Clá, Dri e Rê.
Merci beaucoup!

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas II, da Funed, especialmente à Dr^a. Marta do Nascimento Cordeiro, ao Dr. Michel Richardson e à Dr^a. Márcia Helena Borges, que, gentilmente, purificaram e cederam a toxina.

À equipe do Cebio e à equipe do biotério por cuidarem da nossa matéria prima.

À minha orientadora, Dr^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia, por me receber no LVTA com todo o carinho e pelas orientações e auxílios neste trabalho. Por acreditar que era possível!

Ao meu co-orientador, Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, que com toda sua brilhante versatilidade e sorriso fácil, me acolheu e orientou.

Ao Dr. Adriano pela sua contribuição científica e colaboração.

Ao CNPq, à CAPES-TOXINOLOGIA, ao INCTTOX-FAPESP e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À banca examinadora pela disponibilidade e sugestões.

Aos professores e funcionários da pós graduação em Bioquímica e Imunologia pela formação profissional.

Por fim agradeço a Deus por estar sempre presente!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Espécime fêmea de *Phoneutria nigriventer*. Animal em posição de ataque - Foto: Bruno Figueiredo, Fundação Ezequiel Dias (FUNED).....15
- Figura 2: Espécime macho de *Phoneutria nigriventer*. Presença de dilatações nos pedipalpos (a) e do ventre alaranjado (b) - Foto: Rodrigo Teixeira Quadros, FUNED..16
- Figura 3: Comparação das sequências de três principais toxinas da fração PhTx4. MS – Massa molecular determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF or Q-TOF); Seq – Massa molecular calculada tendo como base a sequência completa de aminoácidos. As ligações peptídicas que possivelmente sofreram hidrólise estão sublinhadas (RICHARDSON, *et al.*, 2006).19
- Figura 4: Tipos de fibras sensitivas. α , β são fibras de largo e médio diâmetro, $\alpha\delta$ são fibras de menor diâmetro e a fibra C tem pequeno diâmetro, sendo amielinizada (extraído de JULIUS & BASBAUM, 2001).23
- Figura 5: Ação dos mediadores sobre os nociceptores diante da resposta inflamatória. No quadro estão os principais componentes da “sopa” inflamatória e seus respectivos receptores de membranas (JULIUS & BASBAUM, 2001).....26
- Figura 6: Aparelho algosimétrico (Ugo Basile, Itália). Utilizado para aferir o limiar nociceptivo dos animais. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.35
- Figura 7: Procedimento cirúrgico realizado para constrição do nervo ciático e desenvolvimento do modelo de dor neuropática. Em destaque o nervo ciático exposto antes de sofrer as amarrações (seta vermelha). Foto: David Israel, UFMG.37
- Figura 8: Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de carragenina (Cg). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina.41
- Figura 9: Efeito induzido pela administração intraplantar de 5 μ g (1000 pmoles) da toxina PnTx4(6-1) em diferentes tempos, sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg, 250 μ g/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Cg+Salina.42
- Figura 10: Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de prostaglandina E_2 (PGE_2). PGE_2 foi administrada no tempo 0. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle veículo (etanol 2% em salina).....44

Figura 11: Efeito da administração intratecal de diferentes doses da toxina PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. A toxina foi administrada duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.....45

Figura 12: PnTx4(6-1) quando administrada centralmente não afeta a pata contralateral/não tratada. PnTx4(6-1) foi administrada na dose de 800 pmoles por injeção intratecal (IT). PD: pata direita, PE: pata esquerda. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. Não houve diferença significativa entre as patas contralaterais quando tratadas com salina ou com toxina.47

Figura 13: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 de massas 5094,3 e 5053,6 Da, respectivamente, sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). As toxinas foram administradas duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.....49

Figura 14: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles das toxinas PnTx4(6-1) e ω-conotoxina MVIIA sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). As toxinas foram administradas duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.....51

Figura 15: Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela constrição do nervo ciático. O momento da cirurgia está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo controle *Naive*.....53

Figura 16: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles de PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por constrição do nervo ciático. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo Operado - Salina54

Figura 17: Comparação entre as toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3. A seta vermelha indica a única diferença no resíduo 27 dessas moléculas, onde uma lisina é substituída por uma serina. Os sublinhados em vermelho indicam os resíduos (alanina e prolina)

que possivelmente foram perdidos durante a clivagem espontânea das duas moléculas.....61

ÍNDICE

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	14
1.2 A PEÇONHA DA ARANHA <i>Phoneutria nigriventer</i>	16
1.2.1 A fração PhTx4 e a toxina PnTx4(6-1)	17
1.3 TOXINAS COM AÇÃO ANTINOCICEPTIVA.....	19
1.3 DOR E NOCICEPÇÃO.....	21
1.3.1 Transmissão ascendente da dor	22
1.3.1.1 Dor nociceptiva	24
1.3.1.2 Dor inflamatória.....	25
1.3.1.3 Dor neuropática	26
1.3.2 Sistemas de modulação endógenos da dor	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	32
3.2 OBTENÇÃO DAS TOXINAS E ARMAZENAGEM	32
3.3 AGENTES HIPERALGÉSICOS.....	33
3.4 DROGAS	33
3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS TOXINAS E DOS AGENTES HIPERALGÉSICOS	33
3.5.1. Administração Intraplantar	33
3.5.2. Administração Intratecal.....	34
3.6 TESTE NOCICEPTIVO	34
3.7 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA	36

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS.....	40
4.1 MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA.....	40
4.1.1 Avaliação do efeito da administração intraplantar de diferentes doses de Carragenina (Cg).....	40
4.1.2 Avaliação da atividade de PnTx4(6-1) frente à hiperalgesia evocada por carragenina	40
4.2 MODELO DE DOR NOCICEPTIVA.....	43
4.2.1 Avaliação do efeito da administração intraplantar de diferentes doses de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	43
4.2.2 Efeito induzido pela administração intratecal da PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	43
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TOXINAS – MODELO DE DOR NOCICEPTIVA	48
4.3.1 Comparação do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e PnTx4-3 frente a hiperalgesia evocada por PGE ₂	48
4.3.2 Comparação do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e ω-conotoxina MVIIA (ωMVIIA)	50
4.4 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA	52
4.4.1 Estabelecimento do modelo de dor neuropática.....	52
4.4.2 Efeito de PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia evocada por constrição do nervo ciático.....	52
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	67
7 PERSPECTIVAS.....	69
8 REFERÊNCIAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

Cg - carragenina

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor

ipl. - intraplantar

KA - kainato

L-Glu - L-glutamato

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMR - núcleo magno da rafe

PAG - substância cinzenta periquedutal

PD - pata direita

PE - pata esquerda

PGE₂ - prostaglandina E₂

RVM - medula rostroventromedial

SNC - sistema nervoso central

RESUMO

A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, conhecida como “aranha armadeira”, possui diversos componentes biologicamente ativos. Entre os sintomas decorrentes da picada desse animal destacam-se dor local, excitação, salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsão e paralisia flácida e espástica dos membros anteriores e posteriores. A toxina PnTx4(6-1) foi isolada da fração PhTx4 deste veneno, sendo um polipeptídeo de cadeia única composto por 48 resíduos de aminoácidos, cuja massa é de 5244,6 Da. PnTx4(6-1) foi inicialmente descrita como uma neurotoxina inseticida, que liga-se ao sítio 3 de canais para sódio em sinaptossomas de barata (*Periplaneta americana*). Entretanto, canais para sódio de músculo esquelético (rSKM1) e cérebro (rBIIA), ambos de ratos, não foram alvos da toxina PnTx4(6-1). Estes resultados corroboraram resultados anteriores em que a injeção intracerebral da toxina purificada (15 e 30 µg), em camundongos, não provocou toxicidade aparente. O presente estudo avaliou o efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1) frente a hiperalgesia evocada por carragenina, prostaglandina E₂ e por constrição do nervo ciático. A atividade antihiperalgésica foi avaliada pelo teste de retirada da pata do rato submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto, em 1957. A hiperalgesia no modelo de dor inflamatória foi causada pela injeção intraplantar de 250 µg de carragenina. Quando administrada no mesmo local, após intervalo de duas horas e trinta minutos, a toxina PnTx4(6-1) (5 µg) foi capaz de restaurar o limiar nociceptivo da pata dos animais. A hiperalgesia, no modelo de dor nociceptiva, foi evocada pela injeção intraplantar de 2 µg de prostaglandina E₂. A administração central da toxina, por injeção intratecal, causou um efeito antinociceptivo dose-dependente. As doses de 200 e 400 pmoles reverteram totalmente o efeito hiperalgésico evocado por prostaglandina E₂, tendo duração de 20 minutos. Medidas na pata contralateral revelaram que PnTx4(6-1), quando administrada pela via intratecal, não altera o limiar nociceptivo da pata não tratada. Com relação ao modelo de dor neuropática a toxina na dose de 100 pmoles reverteu, com duração de dez minutos, a hiperalgesia evocada por constrição do nervo ciático. A investigação das propriedades biológicas das toxinas animais e a perspectiva de sua utilização para o alívio da dor demonstram forte potencial terapêutico.

Palavras Chaves: Toxina de aranha, PnTx4(6-1), Nocicepção, *Phoneutria nigriventer*

ABSTRACT

The venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer* has several biologically active components including peptides, proteins, amino acids, salts etc. The symptoms resulting from this animal’s bite comprise local pain, arousal, salivation, lacrimation, priapism, seizures and spastic and flaccid paralysis of the anterior and posterior limbs. The toxin PnTx4(6-1), isolated from the PhTx4 fraction of these venom, is a single chain polypeptide composed of 48 amino acid residues, with a mass of 5244.6 Da. This polypeptide was initially described as a neurotoxin insecticide. PnTx4(6-1) appears to bind to site 3 of sodium channels in nerve cord synaptosomes of cockroach (*Periplaneta americana*) and slow down inactivation of sodium current in isolated axon of insect, without affecting sodium channels of skeletal muscle (rSKM1) and brain (rBIIA), both of rats. This result corroborated previous assays in which the intracerebral injection of the toxin (up to 30µg) in mice caused no apparent toxicity. The present study evaluated the antinociceptive effect of the PnTx4(6-1) in three experimental pain models, using the test paw withdrawal, subjected to compression (Randall & Selitto, 1957). The hyperalgesia in inflammatory pain model was caused by intraplantar injection of 250 µg of carrageenan. When administered in the same place, after an interval of two hours and thirty minutes, PnTx4(6-1) (5 µg) was able to restore the nociceptive threshold of the animals. The hyperalgesia in nociceptive pain model, was evoked by intraplantar injection of 2 µg of prostaglandin E₂ (PGE₂). The central administration of PnTx4(6-1) by intrathecal injection caused a dose-dependent antinociceptive effect against the hyperalgesia induced by PGE₂. Briefly, a dose of 100 pmoles was able to raise the nociceptive threshold of the paw of rats, and the doses of 200 and 400 pmoles totally reversed the hyperalgesic effect evoked by PGE₂, with duration of 30 minutes. The measurements in the contralateral paw revealed that PnTx4(6-1), when centrally administered, does not alter the nociceptive threshold of the paw untreated. Concerning to the neuropathic pain model the toxin (100 pmoles) reversed, lasting ten minutes, the hyperalgesia evoked by constriction of the sciatic nerve. This research with PnTx4(6-1) indicates a strong therapeutic potential to this molecule as a possible model to new analgesic.

Key Words: Spider toxin, PnTx4(6-1), Nociception, *Phoneutria nigriventer*

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aranha *Phoneutria nigriventer*

O gênero *Phoneutria* foi primeiramente descrito, em 1833, por Perty que utilizava como caráter taxonômico a curvatura da linha mediana dos olhos. A cladística recente considera o gênero como um grupo monofilético baseado nas seguintes características: 1) a presença da escópula (uma escova de pelo) prolateral densa nas tíbias e tarso dos pedipalpos que estão presentes em machos e fêmeas; 2) o comportamento defensivo, no qual, é adotada a posição ereta do corpo e movimentos laterais; 3) a posição mediana das bolsas epigianas; e 4) o ducto copulatório simples que se apresenta igual ou menor à espermateca (SIMÓ & BRESCOVIT, 2001).

Espécies do gênero *Phoneutria*, pertencentes à família Ctenidae, são conhecidas como armadeiras, devido à posição que assumem quando são ameaçadas, e são aranhas errantes, uma vez que não constroem teias. As aranhas desse gênero são consideradas de médio a grande porte, com comprimento corporal variando de 17 a 48 mm. O comprimento total, que inclui as patas estendidas, pode chegar a 180 mm (MARTINS & BERTANI, 2007).

As espécies do gênero *Phoneutria* são encontradas nas áreas de floresta da América Central (Costa Rica) e em toda região da América do Sul compreendida entre o leste dos Andes e o norte da Argentina. Na região amazônica são encontradas *P. fera*, *P. reidyi* e *P. boliviensis* (PICKARD-CAMBRIDGE, 1897). Nas regiões, que não incluem a Amazônia, as espécies são restritas ao norte da Argentina, ao Paraguai e ao Brasil, em áreas de Mata Atlântica, incluindo fragmentos florestais no Cerrado (SIMÓ & BRESCOVIT, 2001). Os representantes do gênero são responsáveis por um grande número de acidentes no Brasil (Ministério da Saúde, 2012).

As aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* ocorrem no Brasil especialmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CAPOCASALE, 1984).



Figura 1: Espécime fêmea de *Phoneutria nigriventer*. Animal em posição de ataque - Foto: Bruno Figueiredo, Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

A espécie *Phoneutria nigriventer* (Figuras 1 e 2) foi descrita por Keyserling, em 1891. Os exemplares da espécie apresentam as quelíceras com coloração marrom escura e presença de cerdas avermelhadas; o opstossoma, na região dorsal, apresenta coloração amarelo-marrom ou marrom escuro. Já na região ventral este apresenta coloração uniforme que pode variar do preto ao marrom escuro e em alguns casos, o macho pode apresentar a coloração marrom-alaranjada (Figura 2) (EICKSTEDT, 1981).

As aranhas desta espécie são extremamente agressivas e caçam ativamente suas presas, o sucesso como predadoras ativas está diretamente relacionado à toxicidade do veneno (SOERENSEN, 1990; GOMEZ *et al.*, 2002).



Figura 2: Espécime macho de *Phoneutria nigriventer*. Presença de dilatações nos pedipalpos (a) e do ventre alaranjado (b) - Foto: Rodrigo Teixeira Quadros, FUNED.

O período de acasalamento destas aranhas é de abril a julho (RAMOS *et al.*, 1998) e, ao deixarem os ovos, os espécimes jovens já são capazes de se moverem e capturarem presas. O animal torna-se adulto em seu terceiro ano de vida e pode atingir a idade máxima de seis anos (HERZIG *et al.*, 2004).

1.2 A PEÇONHA DA ARANHA *Phoneutria nigriventer*

A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* possui diversos componentes biologicamente ativos, dentre eles peptídeos e toxinas que se ligam a receptores de membrana e a diversos canais iônicos (de LIMA *et al.*, 2002; 2007; GOMEZ *et al.*, 2002; RICHARDSON *et al.*, 2006; MATAVEL *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2009). O veneno bruto dessa aranha contém potentes neurotoxinas que podem causar sintomas de excitação, salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsão, paralisia flácida e espástica dos membros anteriores e posteriores e morte, quando injetado intracerebralmente, em camundongos (DINIZ, 1963; SCHENBERG & PEREIRA-LIMA, 1971; ENTWHISTLE *et al.*, 1982).

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* foi purificado e dividido, por diversos autores, em cinco frações que posteriormente mostraram atuar em

diferentes alvos tanto em mamíferos quanto em insetos. Rezende e colaboradores (1991) purificaram quatro frações desse veneno, sendo que, três destas (PhTx1, PhTx2 e PhTx3) apresentam toxicidade em camundongos, diferindo na letalidade e nos efeitos comportamentais causados, quando administradas por via intracerebroventricular. A outra fração (M), purificada pelos mesmos autores, não apresenta toxicidade em camundongos, mas é capaz de induzir contrações no músculo liso de cobaias. Uma quinta fração foi, ainda, identificada por Figueiredo e colaboradores (1995) e nomeada PhTx4.

As toxinas purificadas do veneno de *Phoneutria nigriventer* tem sido investigadas por diferentes autores. Tais toxinas são, em sua quase totalidade, polipeptídeos, com massa molecular entre 3500 e 9000 Da. Vários destes polipeptídeos interagem com canais iônicos afetando seu funcionamento sendo eles: canais para sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+), dentre outros (GRISHIN, 1999).

1.2.1 A fração PhTx4 e a toxina PnTx4(6-1)

A fração PhTx4 é extremamente tóxica e letal para insetos, atuando no sistema glutamatérgico tanto de insetos quanto de mamíferos. Estudos anteriores de nosso grupo indicam que essa fração atua no sistema nervoso periférico dos insetos, promovendo a liberação de glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (FIGUEIREDO *et al.*, 1995). Já em sinaptosomas cerebrocorticais de rato, esta fração inibiu a captação de ^3H -glutamato (MAFRA *et al.*, 1999).

Dentre as toxinas purificadas da fração PhTx4, destacam-se PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1). Ambas apresentam alta toxicidade para insetos, na ordem de nanogramas, quando injetadas em mosca (*Musca domestica*) e não apresentam toxicidade aparente, quando altas doses (30 μg) são injetadas intracerebroventricularmente, em camundongos (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; 2001). Destaca-se também a toxina PnTx4-3, purificada posteriormente, que se mostrou tóxica quando injetada em mosca (*Musca domestica*) (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Estes autores testaram ainda o efeito das três toxinas da família PhTx4 na captação de ^3H -glutamato, em sinaptosomas cerebrocorticais de

ratos e observaram uma inibição de 53%, 20% e 20% para as toxinas PnTx4-3, PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1), respectivamente.

A toxina PnTx4(5-5) inibe seletivamente as correntes evocadas pelo receptor de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), em neurônios hipocámpais de ratos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Foi demonstrado por Oliveira (2010) que a toxina PnTx4(5-5) apresenta ação antinociceptiva, quando avaliado seu efeito periférico em ratos.

PnTx4(6-1), alvo do presente estudo, é um polipeptídeo de cadeia única composto por 48 resíduos de aminoácidos, cuja massa, obtida por espectroscopia de massas, é de 5244,6 Da. Tal polipeptídeo foi inicialmente descrito como uma neurotoxina inseticida (FIGUEIREDO *et al.*, 1995), sendo capaz de estimular a liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

Trabalho realizado por De Lima e colaboradores (2002) demonstrou que a toxina PnTx4(6-1) pode se ligar ao sítio 3 dos canais para sódio em sinaptosomas de corda nervosa de barata e também retarda a inativação da corrente de sódio, em axônio isolado desta mesma preparação. Entretanto, demonstrou-se neste mesmo trabalho que, canais para sódio de músculo esquelético (rSKM1 ou Nav_{1.4}) e de cérebro (rBIIA ou Nav_{1.2}), ambos de ratos, não são alvos da toxina PnTx4(6-1).

PnTx4(6-1) apresenta 98 e 37% de identidade com as toxinas PnTx4-3 e PnTx4(5-5), respectivamente. Além disso, o número e distribuição dos resíduos de cisteína nestas toxinas são bem conservados (100%), sendo uma característica notável destas sequências a presença de resíduos de cisteína tanto no amino quanto no carboxi-terminal (Figura 3) (OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Em estudo proteômico realizado por Richardson e colaboradores (2006) foram detectados baixos níveis de formas “cortadas” destas moléculas, nas quais as ligações peptídicas M₄₀-A₄₁ em PnTx4(5-5) e T₄₀-A₄₁ em PnTx4(6-1) e PnTx4-3 foram, provavelmente, hidrolisadas (Ligações em destaque, sublinhadas, na figura 3).

Toxina	Sequência	MS	Seq
PnTx4 (6-1)	<p style="text-align: center;">10 20 30 40</p> <p>CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKREAAIV<u>IY</u>TAPKKKLT<u>C</u></p>	5244,6	5241,1
PnTx4-3	<p style="text-align: center;">10 20 30 40</p> <p>CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSSSCKREAAIV<u>IY</u>TAPKKKLT<u>C</u></p>	5199,5	5200,0
PnTx4 (5-5)	<p style="text-align: center;">10 20 30 40</p> <p>CADINGACKSDCDCCGDSVTCDYWSKSCKRESNFKI<u>GM</u>AIRKKF-C</p>	5170,0	5172,0

Figura 3: Comparação das sequências de três principais toxinas da fração PhTx4. MS – Massa molecular determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF or Q-TOF); Seq – Massa molecular calculada tendo como base a sequência completa de aminoácidos. As ligações peptídicas que possivelmente sofreram hidrólise estão sublinhadas (RICHARDSON, *et al.*, 2006).

1.3 TOXINAS COM AÇÃO ANTINOCICEPTIVA

Dentre as toxinas de artrópodes, várias apresentam ação antinociceptiva. Um exemplo é a toxina GsMTx4, isolada do veneno da aranha tarântula *Grammostola spatulata*, conhecida por bloquear mecanorreceptores e canais iônicos ativados pelo estiramento da membrana plasmática. A administração intraperitoneal dessa toxina foi capaz de reduzir a algesia em ratos nos modelos de dor mecânica, dor neuropática – por constrição do nervo ciático – e dor inflamatória – induzida por carragenina –, sendo este último dose-dependente (PARK *et al.*, 2008).

Estudos recentes demonstraram que toxinas purificadas da fração PhTx3 do veneno de *Phoneutria nigriventer* apresentam atividade antinociceptiva. Dentre elas, encontra-se a toxina PnTx3-3, potente bloqueadora de canais para cálcio dependentes de voltagem, podendo gerar um prolongado efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática desenvolvido em camundongos (DALMOLIN *et al.*, 2011). Outra toxina a PnTx3-6, que também bloqueia canais para cálcio dependentes de voltagem, induziu antinocicepção, no modelo de dor pós-operatória em camundongos, mais duradoura quando comparada à ω -conotoxina MVIIA e à morfina (de SOUZA *et al.*, 2011).

Do veneno da aranha *Agelenopsis aperta* também foram isoladas toxinas antinociceptivas. Uma delas é ω -agarotoxina IVA (ω -Aga-IVA), que apresenta seletividade para canais para cálcio do tipo-P (MINTZ *et al.*, 1992a e b). A outra toxina denominada Joro toxina (JSTX) tem seu efeito antinociceptivo pela inibição do receptor para glutamato NMDA (SORKIN *et al.*, 2001).

Duas toxinas inicialmente descritas como inseto-toxinas, isoladas do veneno do escorpião asiático *Buthus martensi Karsch* (BmK), também apresentam atividade antinociceptiva, sendo elas: BmK AS e BmK IT2.

Estudos revelaram que a BmK AS é responsável pela liberação de noradrenalina em fatias de hipocampo de ratos, através do influxo de sódio (JI *et al.*, 1997). Tan e colaboradores (1999) atribuíram o efeito analgésico dessa toxina à modulação pela mesma, nos canais para sódio dependentes de voltagem, em neurônios de gânglio da raiz dorsal da medula. A injeção intraplantar de BmK AS foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva provocada pela formalina nas duas fases do teste (1^a- dor neurogênica e 2^a - dor inflamatória). Frente à hiperalgesia causada pela carragenina, essa toxina foi capaz de elevar o limiar nociceptivo dos animais, quando administrada por via intraplantar (CHEN *et al.*, 2006). Posteriormente, foi demonstrado que o pré-tratamento com injeção intratecal de BmK AS, também, é capaz de reduzir significativamente a resposta nociceptiva dos ratos nas duas fases do teste de formalina (LIU *et al.*, 2008).

Já a BmK IT2 foi descrita como uma inseto-toxina que se liga especificamente a canais para sódio de insetos (ZHOU *et al.*, 1989). Outros estudos sugerem que esta toxina é um polipeptídeo neurotóxico com potenciais efeitos farmacológicos tanto em mamíferos quanto em insetos. Entretanto, acredita-se que o sítio de ligação dessa toxina nos canais para sódio no cérebro de mamíferos difere do sítio de ligação desta nos canais para sódio de insetos (TAN *et al.*, 2001).

Foi demonstrado, pelos autores supracitados, que a injeção intraplantar de BmK IT2 foi capaz de reduzir, de maneira bifásica (sendo a primeira fase mais inibitória que a segunda), a resposta das fibras C no teste do reflexo de flexão. Ensaios realizados, em neurônios isolados de gânglios da raiz dorsal da medula, sugerem que a inibição bifásica das fibras C pode ser causada pela

cinética de ativação diferencial de BmK IT2 sobre as correntes dos canais para sódio dessas fibras.

A utilização de toxinas animais como modelos para a formulação de novos compostos analgésicos já é uma realidade. O Ziconotide (Prialt®) é uma droga analgésica não opióide derivada de uma versão sintética da ω -conotoxina MVIIA, isolada do veneno do molusco marinho *Conus magus*. Os efeitos farmacológicos do Ziconotide têm sido investigados e o seu mecanismo de ação parece estar relacionado a um potente e seletivo bloqueio dos canais para cálcio do tipo-N, localizados nos neurônios pré-sinápticos da medula espinhal. Evidências sugerem que essa droga apresenta efeito antinociceptivo porque reduz a liberação de neurotransmissores nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal, inibindo, assim, a transmissão do sinal doloroso (McGIVERN, 2007).

1.3 DOR E NOCICEPÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real, potencial ou funcional. Embora a agressão tecidual e a magnitude da percepção da dor estejam frequentemente relacionadas, a dissociação entre elas é um fenômeno comum (LIMA & ALMEIDA, 2002). A dor pode ocorrer de forma independente da presença de dano tecidual, como descrito em situações de ansiedade ou ainda ser referida a áreas amputadas do corpo (MELZACK, 1973).

A experiência dolorosa incorpora componentes sensoriais, com influências pessoais e ambientais importantes. No entanto, em estudos clínicos e experimentais faz-se necessária a distinção entre a dor percebida ou relatada e a simples resposta ao dano tecidual (KANDEL *et al.*, 2003). Assim, o termo nocicepção refere-se somente à percepção do estímulo nociceptivo no sistema nervoso central, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido lesado (FÜRST, 1999). Animais tem capacidade menos ampla de expressar os componentes subjetivos da dor, portanto nesses modelos não é possível aferir a dor e sim, a nocicepção.

Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e os termos nocicepção e antinocicepção para modelos animais (JONES, 1992).

1.3.1 Transmissão ascendente da dor

Há mais de um século Sherrington (1906) propôs a existência dos nociceptores, sendo estes neurônios sensoriais primários que seriam ativados por estímulos capazes de causar dano tecidual.

Em 1967 utilizando-se estudos eletrofisiológicos, foi demonstrado que os neurônios sensoriais primários podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou agentes químicos irritantes, mas não por estímulos inócuos como o aquecimento ou o toque leve (BURGESS & PERL, 1967).

As fibras sensitivas que inervam a região do corpo e da cabeça tem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal dos nervos espinhais e nos gânglios trigeminais, respectivamente. Tais fibras podem ser categorizadas em três principais grupos (Figura 4):

- Fibras A α e A β são fibras de maior calibre, mielinizadas, que conduzem rapidamente o estímulo. São responsáveis principalmente pela detecção de estímulos inócuos e, portanto, acreditava-se que estas não contribuíam para o processo doloroso. Entretanto já foi demonstrado por diversos estudos que as fibras A β , também, apresentam propriedade nociceptiva (LAWSON, 2002);
- Fibras A δ são fibras de pequeno calibre e pouco mielinizadas que detectam estímulos nociceptivos;
- Fibras C são fibras de pequeno calibre e amielinizadas que conduzem de forma mais lenta o estímulo nociceptivo (BASBAUM, 2000). Existem ainda fibras do tipo C que só são sensibilizadas, tornando-se responsivas, quando ocorre uma injúria ao tecido, são as chamadas fibras silenciosas (SCHMIDT *et al.*, 1995).

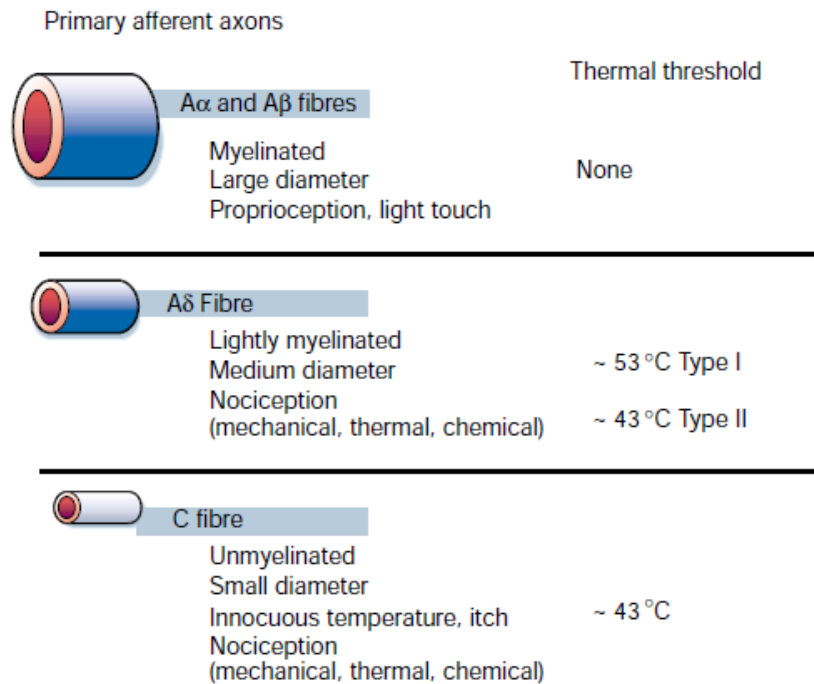


Figura 4: Tipos de fibras sensitivas. A α , β são fibras de largo e médio diâmetro, A δ são fibras de menor diâmetro e a fibra C tem pequeno diâmetro, sendo amielinizada (extraído de JULIUS & BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes nociceptivas, provenientes da pele ou de órgãos internos, dirigem-se ao corno dorsal da medula espinhal, atingindo as lâminas superficiais (I e II), as profundas (IV e V) e a lâmina X. A sinapse entre o neurônio sensorial primário e o neurônio secundário no corno dorsal é mediada pela liberação de neurotransmissores como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), glutamato, entre outros. Os neurônios de segunda ordem são responsáveis pela condução dos estímulos do corno dorsal até o tálamo, principalmente. O tálamo ocupa a mais importante região responsável pela integração dos impulsos dolorosos. Do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem as informações nociceptivas para o córtex cerebral somestésico, onde são processadas e interpretadas ao nível da consciência (FÜRST, 1999).

Segundo Woolf & Scholz (2002) os tipos de dor são resultados de diversos mecanismos e podem ser classificados em três principais tipos: dor nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática, as quais são brevemente descritas a seguir.

1.3.1.1 Dor nociceptiva

Para se proteger contra a lesão do tecido, é imperativo que o corpo esteja consciente de estímulos potencialmente prejudiciais. Este conhecimento é conseguido por um sistema sensorial de detecção de estímulos nocivos. Segundo Millan (1999) a dor nociceptiva apresenta um alto valor adaptativo, pois permite a proteção física através de reflexos de retirada. A função de alerta da dor nociceptiva reflete a ativação de nociceptores por estímulos potencialmente perigosos que excedam o tolerado fisiologicamente.

A dor nociceptiva é um alarme mediado por neurônios sensoriais primários de alto limiar do tipo C ou A δ que levam a informação nociceptiva até o sistema nervoso central (WOOLF & MA, 2007). Esses neurônios nociceptivos expressam transdutores especializados, os canais iônicos, que estão prontos para responder a intensos estímulos térmicos ou mecânicos, bem como a mediadores químicos exógenos e endógenos (DHAKA *et al.*, 2006).

O propósito de aviso da dor é mais evidente no que diz respeito à pele, quando esta é exposta a danos externos. A dor nociceptiva cutânea evoca, portanto, reflexos motores de retirada e/ou reação de fuga, essas respostas são destinadas a interromper a exposição ao estímulo nocivo e, desse modo, interromper a dor (MILLAN, 1999).

A perda de nocicepção, como em doenças hereditárias associadas com insensibilidade congênita à dor (COX *et al.*, 2006), conduz a lesão repetida e auto-mutilação inadvertida, ilustrando a importante função adaptativa da dor nociceptiva. Ainda segundo Cox e colaboradores (2006) mutações no gene que codifica a sub-unidade α dos canais para sódio voltagem dependentes, Nav. 1.7, levam a perda de função deste canal. Uma vez que esses canais são altamente expressos nos neurônios nociceptivos, tal mutação tem como consequência o fenótipo de completa incapacidade de percepção da dor.

1.3.1.2 Dor inflamatória

O processo inflamatório compreende uma complexa série de eventos bioquímicos e celulares, que é ativada em resposta à lesão tecidual. Os principais sinais e sintomas da inflamação são rubor, calor, dor e tumor; e em alguns casos podem acarretar perda de função (ver LEVINE & TAIWO, 1994).

Após injúria tecidual periférica e na presença de mediadores químicos gerados na reação inflamatória (Figura 5), ocorre uma alteração nas propriedades de transdução dos nociceptores que podem, então, ser ativados por estímulos de baixa intensidade. Tal ativação caracteriza o fenômeno da sensibilização do nociceptor (WOOLF, 1991), manifestado por um aumento na atividade espontânea, diminuição do limiar para sua ativação e resposta aumentada a estímulos supra-limiáres (MEYER & CAMPBELL, 1981).

A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração, especialmente, de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são prolongados, estendendo-se de semanas a meses. Durante a inflamação crônica, ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

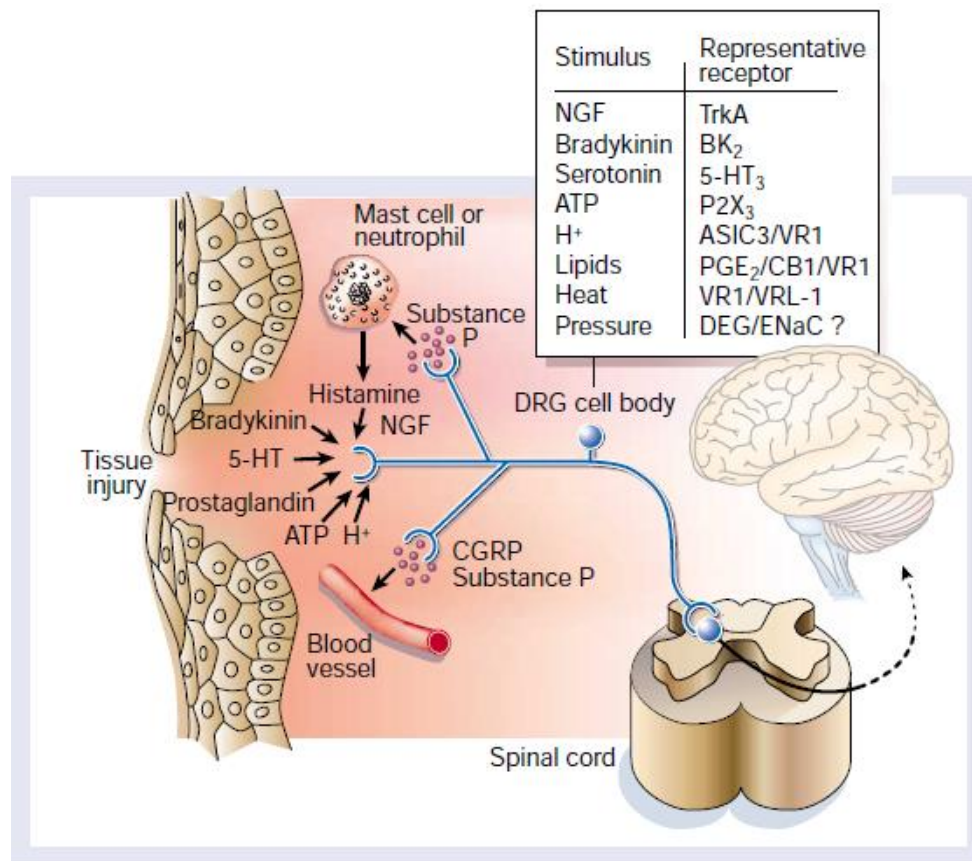


Figura 5: Ação dos mediadores sobre os nociceptores diante da resposta inflamatória. No quadro estão os principais componentes da “sopa” inflamatória e seus respectivos receptores de membranas (JULIUS & BASBAUM, 2001).

1.3.1.3 Dor neuropática

A dor neuropática foi definida em 1994 pela Associação Internacional para Estudos da Dor como dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso. As neuropatias originam-se quando ocorre uma lesão nos nervos ou nas demais estruturas que transmitem a sensação dolorosa e esta pode resultar de trauma mecânico, lesão nervosa (amputação ou compressão), efeitos tóxicos de drogas, doenças como diabetes ou síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) (MENDELL & SAHENK, 2003).

A lesão de nervos periféricos é frequentemente acompanhada de inflamação local transitória, contribuindo para o início da sensação de dor (JI & STRICHARTZ, 2004).

Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não são inteiramente compreendidos. No entanto, MacFarlane e colaboradores (1997) sugerem que o desenvolvimento de dor crônica após lesão de nervos ocorra, através de alterações na medula espinhal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e, eventualmente, mudança no fenótipo. Essas alterações ocorrem principalmente devido a uma estimulação excessiva dos nociceptores, uma vez que estes estão com limiar de ativação mais baixo (hipersensibilidade) (COUTAUX *et al.*, 2005).

1.3.2 Sistemas de modulação endógenos da dor

O primeiro modelo a incorporar processos sensoriais e perceptivos integrativos como a base para a natureza complexa da dor foi proposto em 1965, por Melzack & Wall. Segundo sua teoria, denominada teoria do portão espinhal da dor, a informação nociceptiva que chega ao corno dorsal da medula proveniente da pele, de órgãos viscerais ou de outros tecidos, não é automaticamente transferida ao córtex cerebral.

A hipótese de que um sistema descendente contribuía para a modulação da dor foi fortemente suportada pela descoberta do fenômeno de analgesia produzida por estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (PAG) (REYNOLDS, 1969). Em 1976 foi demonstrado por Basbaum e colaboradores, que lesões no funículo dorso-lateral da medula bloqueavam a inibição das respostas comportamentais a estímulos nocivos, indicando a participação do mesmo na modulação descendente inibitória da dor.

As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas, no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações, em ramos centrais dos neurônios periféricos e em neurônios intrínsecos do corno

dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 2002).

Além da modulação nociceptiva descendente envolver uma série de estruturas cerebrais, os neurotransmissores também participam desta conexão. Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição descendente (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação de neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (FIELDS, 2006).

Atualmente sabe-se que tanto neurônios presentes no corno dorsal da medula quanto as próprias fibras aferentes primárias são capazes de exercer uma forte influencia modulatória sobre a transferência de informações nociceptivas da medula espinhal para o cérebro (MILLAN, 2002).

Recentemente, têm sido descritos sistemas endógenos periféricos de controle de dor nociceptiva e inflamatória (MOTTA *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012).

Novas abordagens, que utilizam toxinas animais para alívio da dor, estão atualmente sob investigação. Tais investigações acerca das propriedades biológicas dessas toxinas e a perspectiva de sua utilização para o tratamento da dor demonstram forte potencial terapêutico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os possíveis efeitos da toxina PnTx4(6-1) no processo de nocicepção, em diferentes modelos de dor experimental *in vivo*: dor nociceptiva, inflamatória e neuropática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o possível efeito da toxina, quando administrada periféricamente, frente à hiperalgesia evocada por carragenina;
- Verificar o possível efeito da toxina, quando administrada centralmente, frente à hiperalgesia evocada por prostaglandina E₂ (PGE₂);
- Verificar o possível efeito da toxina, quando administrada centralmente, frente à hiperalgesia evocada por constrição do nervo ciático;
- Estabelecer parâmetros experimentais, tais como, curvas de tempo e de doses para a toxina PnTx4(6-1), frente aos modelos de dor estudados;
- Estabelecer uma curva comparativa entre PnTx4(6-1) e a toxina PnTx4-3, um análogo estrutural, em relação ao efeito antinociceptivo;
- Estabelecer uma curva comparativa entre PnTx4(6-1) e a ω -conotoxina MVIIA em relação ao efeito antinociceptivo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 180 e 200 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em caixas plásticas, com forragem de cama de maravalha, em uma sala refrigerada, controlada termicamente (22 a 24° C), com ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água. Após os experimentos, todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados (ZIMMERMANN, 1983). Esse projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA, protocolo 102 / 2012).

3.2 OBTENÇÃO DAS TOXINAS E ARMAZENAGEM

A toxina PnTx4(6-1) e a toxina PnTx4-3 provenientes da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, foram purificadas e fornecidas por colaboradores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas II da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A pureza das toxinas foi confirmada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Bruker®, Alemanha) e por determinação da sequência de aminoácidos, realizada por degradação automatizada de Edman (Shimadzu®, Japão). As toxinas foram mantidas liofilizadas e a -20° C, sendo ressuspendidas em salina fisiológica (0,9% NaCl) momentos antes do experimento.

A ω -conotoxina MVIIA foi adquirida da empresa Latoxan (França). Esta toxina foi diluída em água milli-Q, na concentração de 9,47 nmolar e mantida congelada a -20°C em alíquotas de 100 μ L. Para cada experimento descongelava-se uma alíquota que era diluída em salina fisiológica (0,9% NaCl) e utilizada a seguir.

3.3 AGENTES HIPERALGÉSICOS

A Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Enzo, Life Sciences, USA) foi administrada por via subcutânea, na superfície plantar da pata posterior dos ratos. PGE₂ foi mantida a -20°C, em solução estoque (1 µg/µL), dissolvida em etanol 100%. Anteriormente ao experimento a PGE₂ era diluída em salina fisiológica (0,9% de NaCl) e mantida em gelo até o momento das injeções (2 µg/100 µL/pata). Dessa forma a solução final de veículo da PGE₂ foi de etanol 2%.

A carragenina (Sigma, USA) foi pesada e diluída em salina fisiológica (0,9% NaCl) previamente à realização das injeções intraplantares, que ocorreram na dose 250 µg/100 µL/pata.

3.4 DROGAS

Prostaglandina E₂ - Enzo, Life Sciences[®], USA;

Carragenina Lambda – Sigma[®], USA;

Isoflurano - BioChimico[®], Brasil;

Xilazina – Vetbrands[®], Brasil;

Ketamina - Vetbrands[®], Brasil;

ω-conotoxina MVIIA – Latoxan, França.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS TOXINAS E DOS AGENTES HIPERALGÉSICOS

3.5.1. Administração Intraplantar

Os agentes hiperalgésicos foram administrados por injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior do rato (via intraplantar, ipl.), no volume de 100 µL para PGE₂ e carragenina. PnTx4(6-1) foi veiculada em salina e administrada em um volume de 50 µL. Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, que foram utilizadas ambas as patas.

3.5.2. Administração Intratecal

A via intratecal foi utilizada com o objetivo de avaliar o possível efeito de PnTx4(6-1) em nível medular. Previamente à administração das drogas, os ratos eram tricotomizados na região dorsal (lombar) facilitando, desse modo, a palpação dos espaços intervertebrais. Após a sedação dos animais por inalação de isoflurano (3,5%) (BioChimico[®], Brasil) a injeção foi realizada, utilizando-se agulha 13 x 0,3 mm acoplada à seringa hipodérmica (BD[®], Brasil), diretamente no espaço subaracnóide, entre a quinta e a sexta vértebras lombares (MESTRE *et al.*, 1994). O volume administrado era o mesmo (20 µL), tanto para as toxinas, quanto para seus respectivos veículos diluentes (controles).

3.6 TESTE NOCICEPTIVO

Para a avaliação do limiar nociceptivo, foi utilizado o método de retirada da pata, submetida à compressão (Randall & Selitto, 1957). Para tanto, foi utilizado o aparelho algosimétrico da Ugo Basile (Itália) (Figura 6).

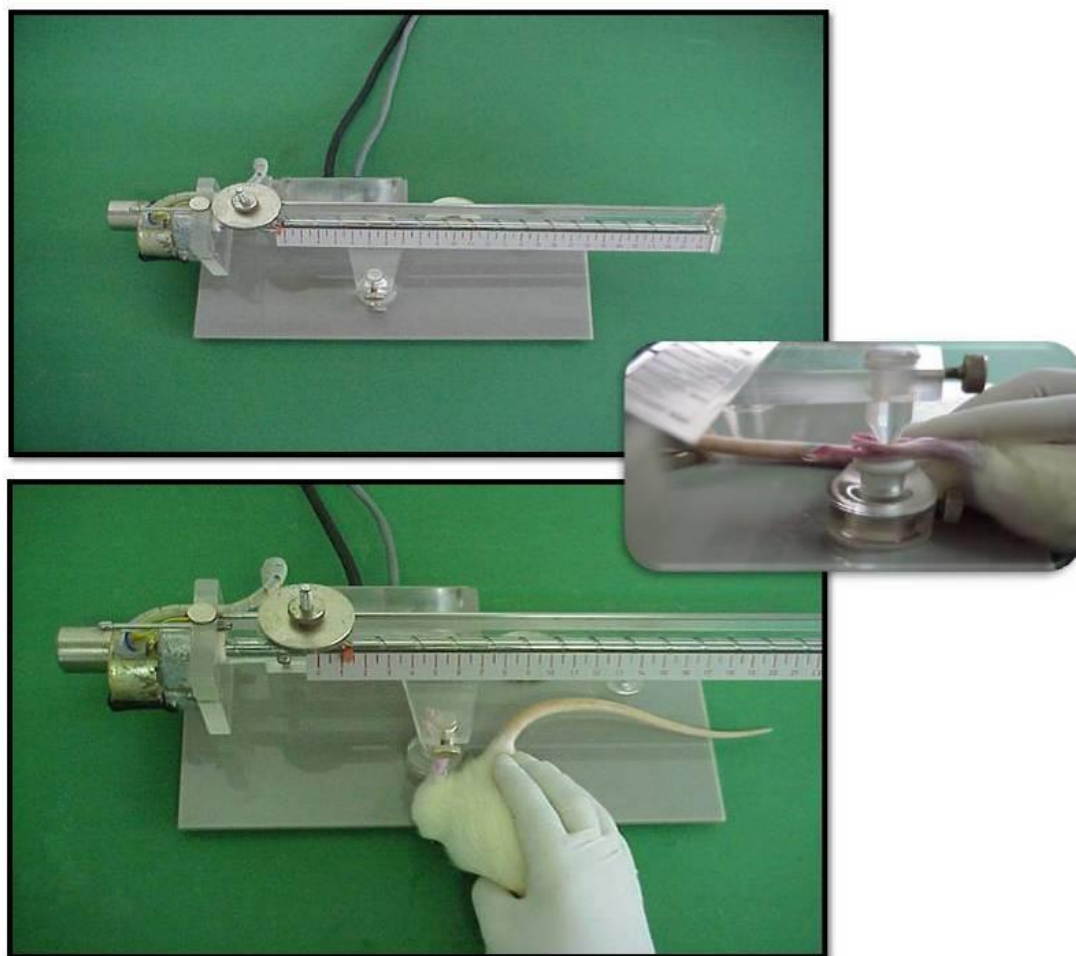


Figura 6: Aparelho algesimétrico (Ugo Basile, Itália). Utilizado para aferir o limiar nociceptivo dos animais. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.

Para a aplicação do método, o animal era mantido cuidadosamente em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste era apresentada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho. Esta consiste de duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se apoia a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar do rato. A intensidade dessa pressão aumenta a uma taxa constante de 32 g/s, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador desaciona o pedal. Interrompe-se, assim, o aumento da pressão imposta à pata, sendo o último valor registrado correspondente ao limiar nociceptivo. Este fica indicado na escala do aparelho e é expresso em gramas.

O aprendizado para a medida do limiar mecânico de nocicepção na pata do rato consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo como doloroso e desenvolve uma reação. Observa-se, nesse momento, um reflexo de retirada da pata. O instante inicial dessa reação é considerado como resposta nociceptiva.

No dia anterior à realização dos experimentos, os ratos eram levados à sala de experimentação para ambientalização. Esse local é controlado termicamente (22 a 24° C) e possui ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados nessa sala entre 8:00 e 17:00 horas, no período da fase clara.

É importante ressaltar que o animal é, também, ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. Para tanto, a pata do animal é apresentada ao aparelho várias vezes, até que este não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é muito importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal durante o experimento, já que diminui o estresse do mesmo frente a essa situação aversiva. Todos os experimentos foram realizados conforme as normas técnicas e éticas para o estudo da dor (Le BARS *et al.*, 2001).

A hiperalgesia foi considerada como a diminuição do limiar nociceptivo, e sua intensidade foi avaliada, em um experimento específico, pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo mensurado no momento do pico da hiperalgesia provocada pela prostaglandina E₂ (terceira hora), em relação ao valor obtido no início do experimento (limiar basal), antes da injeção de qualquer substância (tempo zero).

Para todos os experimentos foram estabelecidos grupos controle para os veículos de administração das toxinas, no caso, salina fisiológica (0,9% NaCl).

3.7 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Para o desenvolvimento do modelo de dor neuropática, foi utilizado o método de constrição do nervo ciático descrito por Bennett & Xie (1988). Como

medida profilática contra contaminação, todo o material cirúrgico e a pele do animal no local da incisão foram desinfetados com álcool iodado. O animal foi anestesiado com uma associação de xilazina (9 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), por administração intramuscular. O estado de anestesia do animal era verificado pela ausência de resposta, por parte deste, à compressão das membranas interdigitais. Uma vez que o animal se apresentava anestesiado, foi realizada a exposição do nervo ciático, através de uma incisão. Após a exposição do nervo, o mesmo foi isolado e sofreu quatro amarrações distintas, com fio de algodão encerado. A distância entre as amarrações foi de aproximadamente 1 mm. Após a realização das constrições, os tecidos eram acomodados e a síntese realizada, com fio e agulha de sutura odontológica (Figura 7). Foram realizados controles tanto com animais naive (que não sofreram nenhum procedimento cirúrgico) tanto com animais sham (sofreram o procedimento cirúrgico, entretanto as amarrações não foram realizadas).

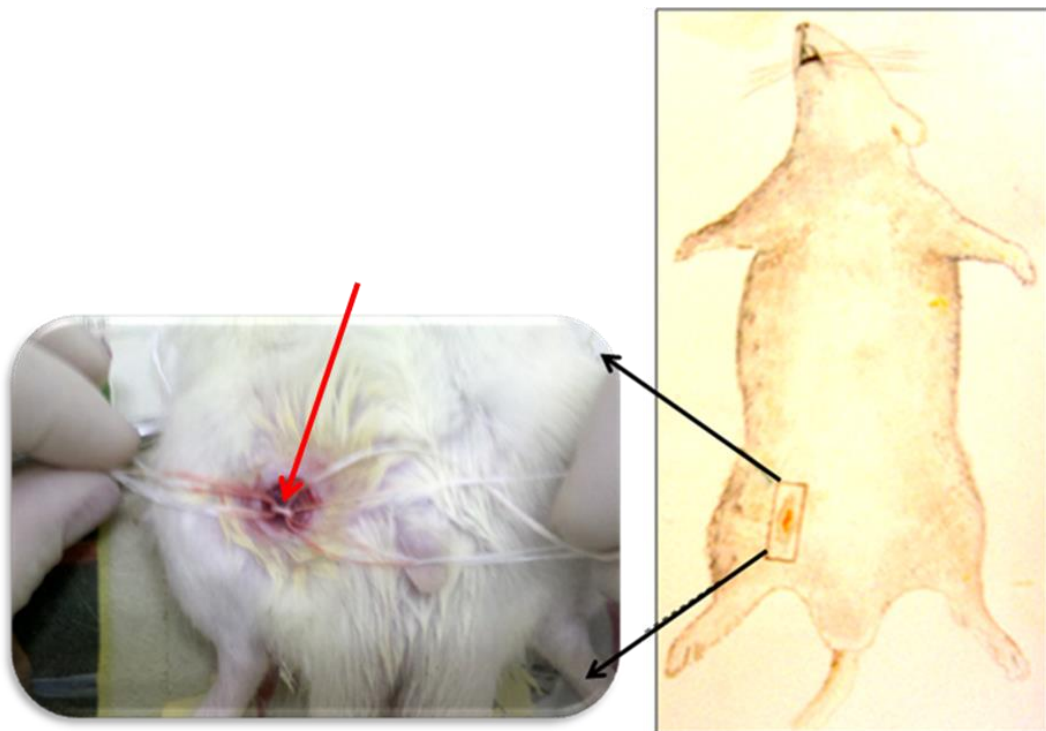


Figura 7: Procedimento cirúrgico realizado para constrição do nervo ciático e desenvolvimento do modelo de dor neuropática. Em destaque o nervo ciático exposto antes de sofrer as amarrações (seta vermelha). Foto: David Israel, UFMG.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas do limiar nociceptivo foram realizadas em triplicata e a média das medidas foi utilizada. Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM da intensidade de hiperalgesia e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, foram utilizados para verificar a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de P fossem menores que 0,05. Para a construção dos gráficos e aplicação das análises estatísticas foi utilizado o programa Prisma 5.0.

Fixando-se a confiabilidade do estudo em 90% e considerando-se um erro absoluto de 10,4 g (variação do limiar nociceptivo observada em relação à média), foi possível realizar o cálculo do N amostral que foi definido em quatro animais para cada grupo experimental.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA

4.1.1 Avaliação do efeito da administração intraplantar de diferentes doses de Carragenina (Cg)

Na figura 8 observa-se que a administração intraplantar (ipl.) de carragenina (Cg 62,5; 125; 250 e 500 µg) induziu diminuição dose-dependente do limiar nociceptivo em relação ao grupo controle (salina). Esse efeito hiperalgésico foi detectado a partir da segunda hora nas doses de 125, 250 e 500 µg, com intensidade máxima na terceira hora após sua administração. Das doses utilizadas a dose de 250 µg foi a menor dose de carragenina capaz de produzir maior efeito hiperalgésico, tendo sido escolhida para utilização nos experimentos subseqüentes.

4.1.2 Avaliação da atividade de PnTx4(6-1) frente à hiperalgesia evocada por carragenina

Com o objetivo de avaliar a atividade da toxina frente à hiperalgesia, em um modelo de dor inflamatória, foi realizada a curva de tempo de PnTx4(6-1), por administração intraplantar, na dose de 5 µg, frente ao efeito hiperalgésico da carragenina (Cg 250µg/pata) (Figura 9). Observa-se que PnTx4(6-1), quando administrada 150 minutos após a administração da carragenina, reverteu a hiperalgesia, entretanto injeções realizadas aos 30 e 90 minutos não alteraram o limiar hiperalgésico dos animais.

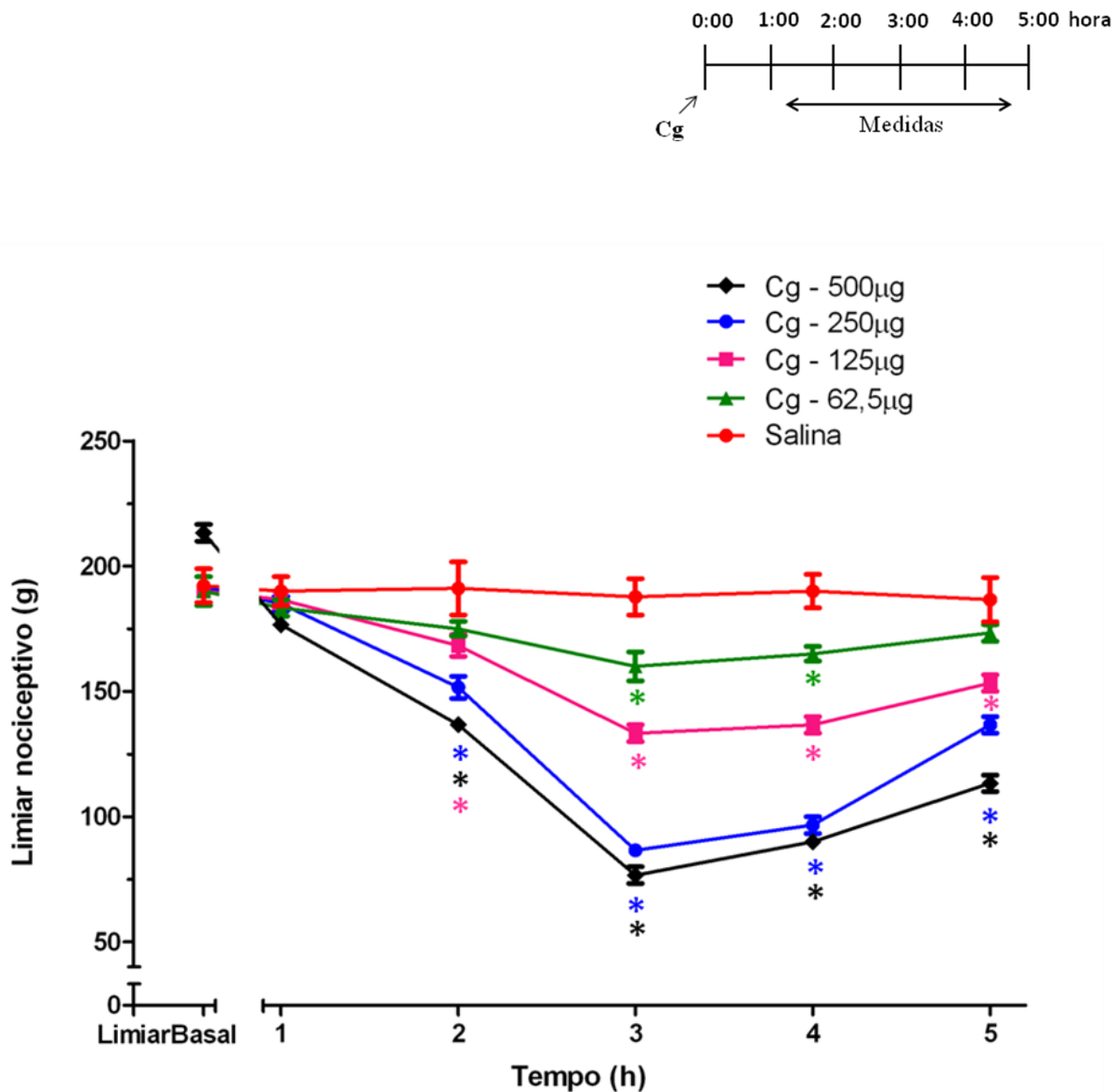


Figura 8: Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de carragenina (Cg). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina.

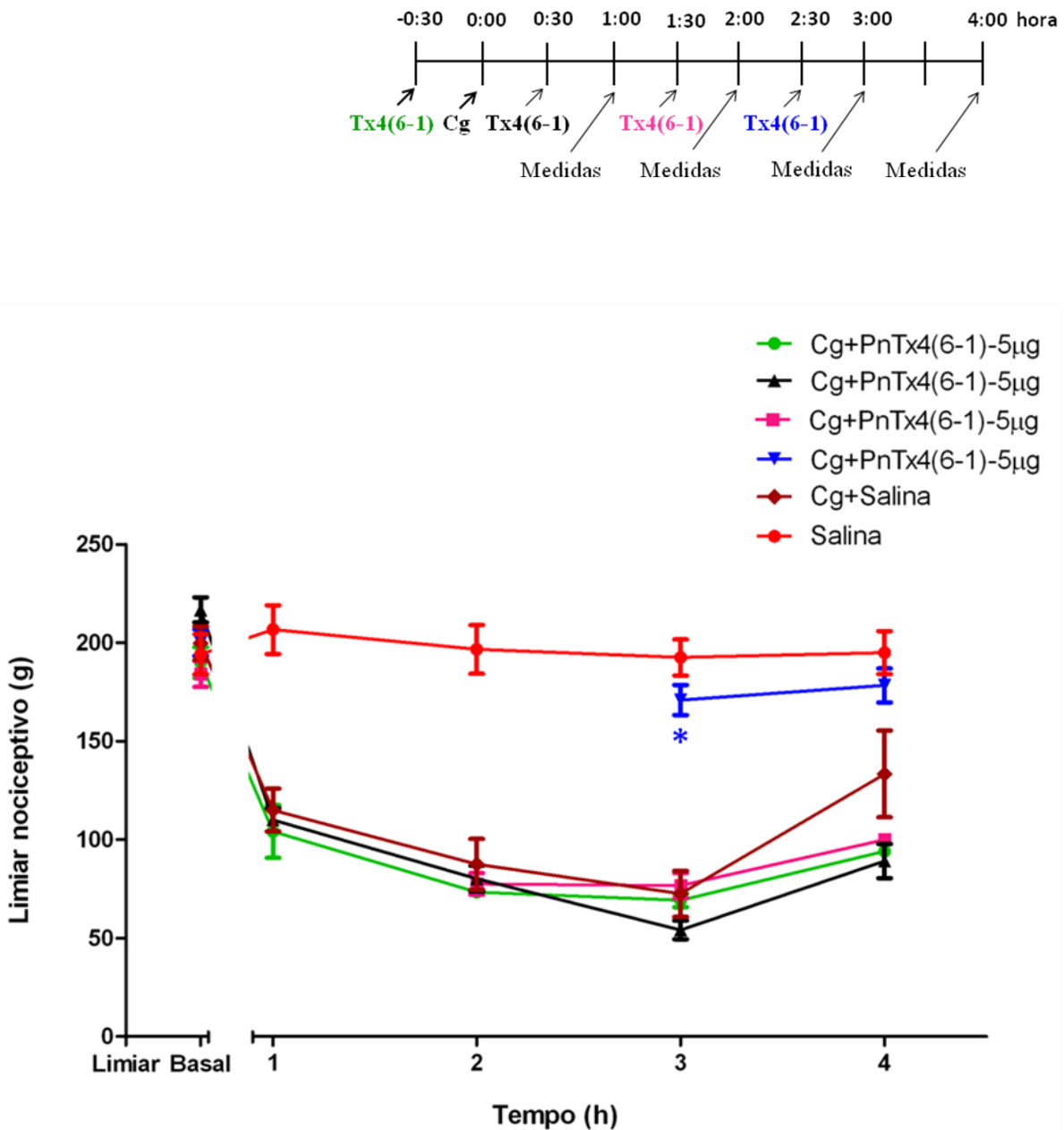


Figura 9: Efeito induzido pela administração intraplantar de 5 µg (1000 pmoles) da toxina PnTx4(6-1) em diferentes tempos, sobre a hiperalgisia induzida pela carragenina (Cg, 250 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo Cg+Salina.

4.2 MODELO DE DOR NOCICEPTIVA

4.2.1 Avaliação do efeito da administração intraplantar de diferentes doses de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

A administração intraplantar de prostaglandina E₂ (PGE₂, 0,5; 1 e 2 µg) induziu diminuição dose-dependente do limiar nociceptivo dos animais em relação ao grupo controle (veículo: etanol 2%), como pode ser observado na figura 10. Esse efeito hiperalgésico foi detectado para todas as doses utilizadas, apenas a partir da segunda hora, com intensidade máxima na terceira hora após a injeção de PGE₂. A dose de 2 µg foi capaz de produzir hiperalgesia de maior intensidade, tendo sido escolhida para os experimentos subsequentes.

4.2.2 Efeito induzido pela administração intratecal da PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

A administração central de PnTx4(6-1), por injeção intratecal, causou efeito antinociceptivo dose-tempo-dependente sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. A dose de 100 pmoles foi capaz de elevar o limiar nociceptivo da pata dos ratos e as doses de 200 e 400 pmoles reverteram totalmente o efeito hiperalgésico evocado por PGE₂, tendo duração de 30 minutos (400 pmoles). A menor dose utilizada (50 pmoles) não foi capaz de alterar de forma significativa, o efeito hiperalgésico induzido por PGE₂ (Figura 11). A administração intratecal de PnTx4(6-1) possibilitou a avaliação do efeito da toxina sobre o sistema nervoso central e devido a mudança na via de administração o tempo de administração, também, sofreu alteração, sendo de cinco minutos antes ao pico de hiperalgesia de PGE₂ (terceira hora).

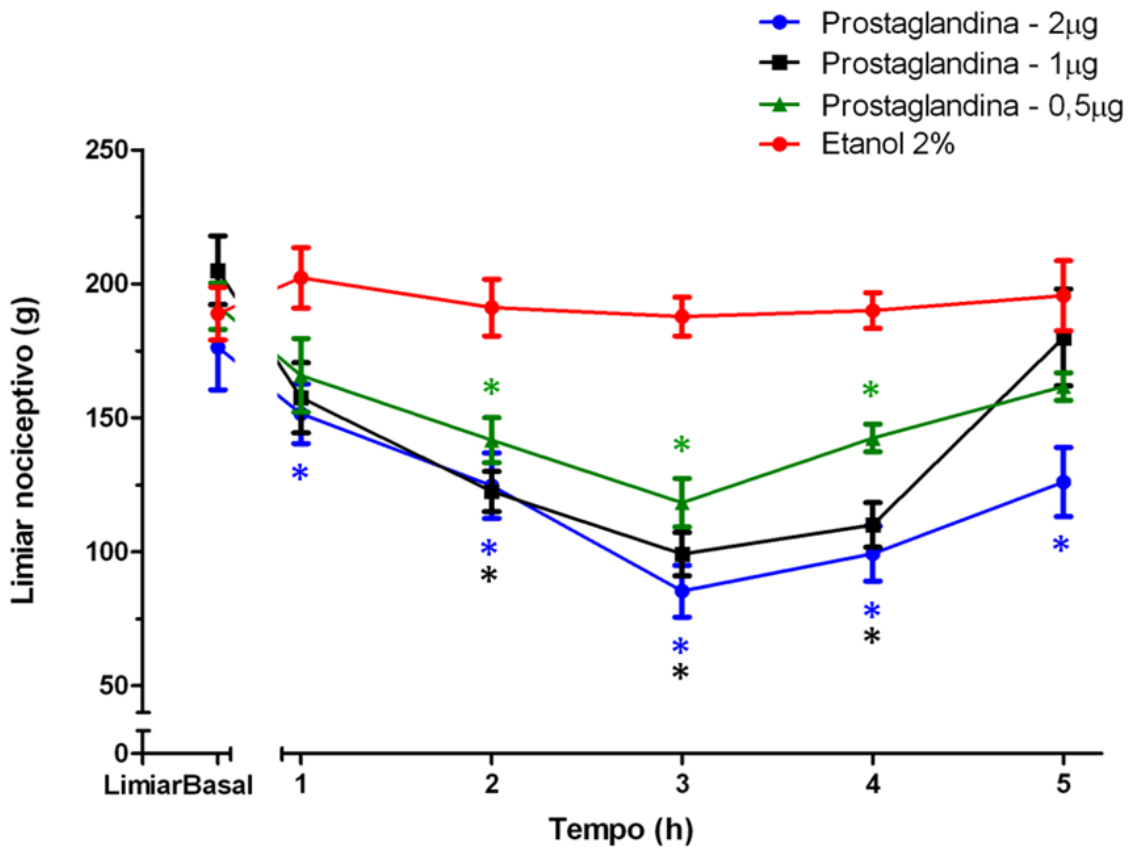
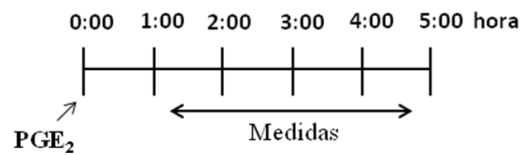


Figura 10: Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de prostaglandina E_2 (PGE_2). PGE_2 foi administrada no tempo 0. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle veículo (etanol 2% em salina).

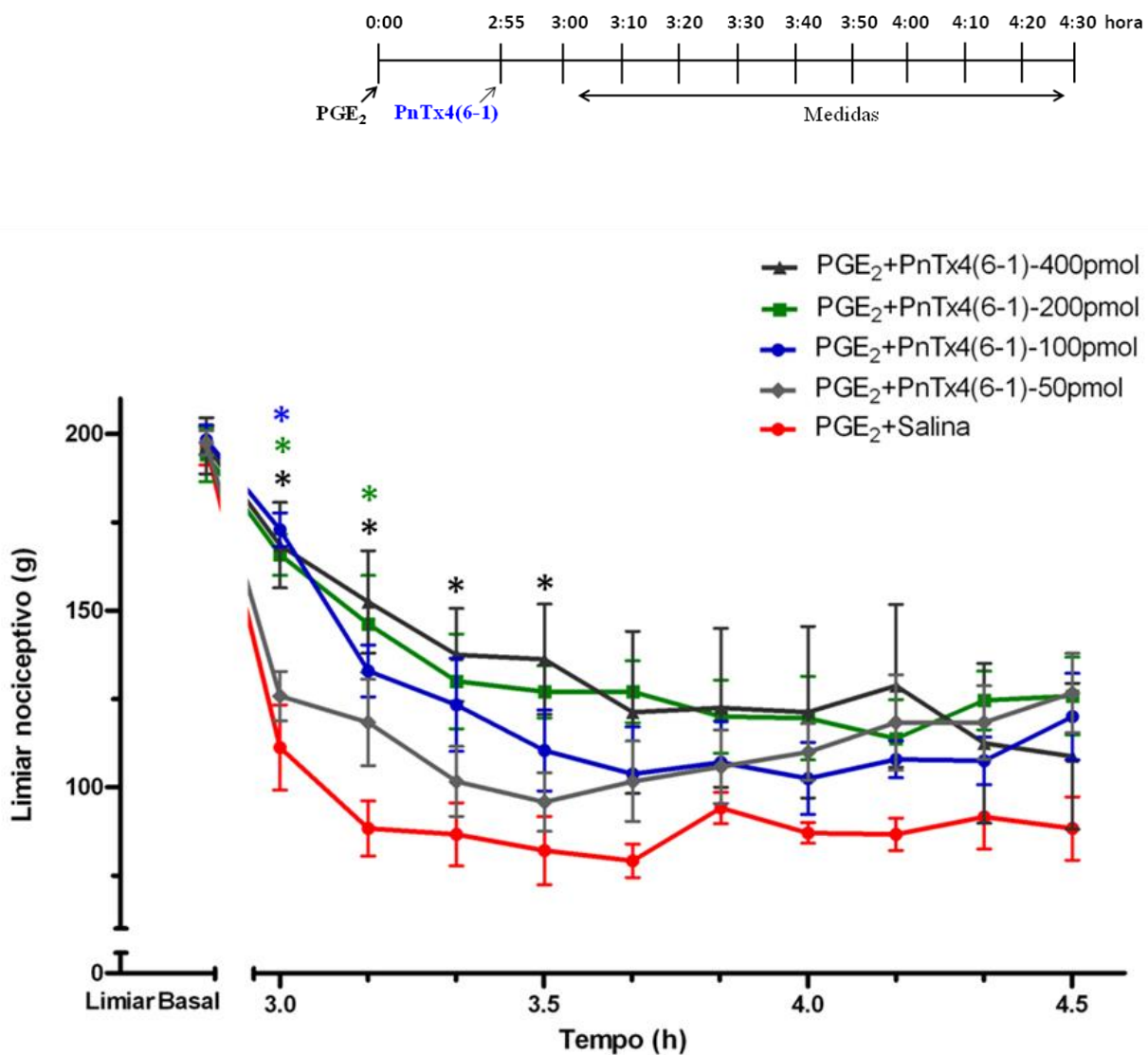


Figura 11: Efeito da administração intratecal de diferentes doses da toxina PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. A toxina foi administrada duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.2.3 Exclusão do efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1) na pata não tratada

Como demonstrado anteriormente a dose de 400 pmoles de PnTx4(6-1) foi capaz de reverter completamente o efeito hiperalgésico de PGE₂, na terceira hora. Para verificar o efeito da toxina no local não tratado (pata esquerda – PE), ambas as patas posteriores do animal foram medidas na terceira hora de ação da PGE₂. Esses resultados foram apresentados como a diferença (Δ) do limiar nociceptivo mensurado no momento do pico da hiperalgesia provocada pela prostaglandina E₂ (terceira hora), em relação ao valor obtido no início do experimento (limiar basal), antes da injeção de qualquer substância (tempo zero). Observou-se que PnTx4(6-1) na dose de 800 pmoles, administrada pela via intratecal, não alterou o limiar nociceptivo da pata não tratada (esquerda) do animal (Figura 12). Não se observou significância estatística entre as patas contralaterais quando administrada salina ou toxina.

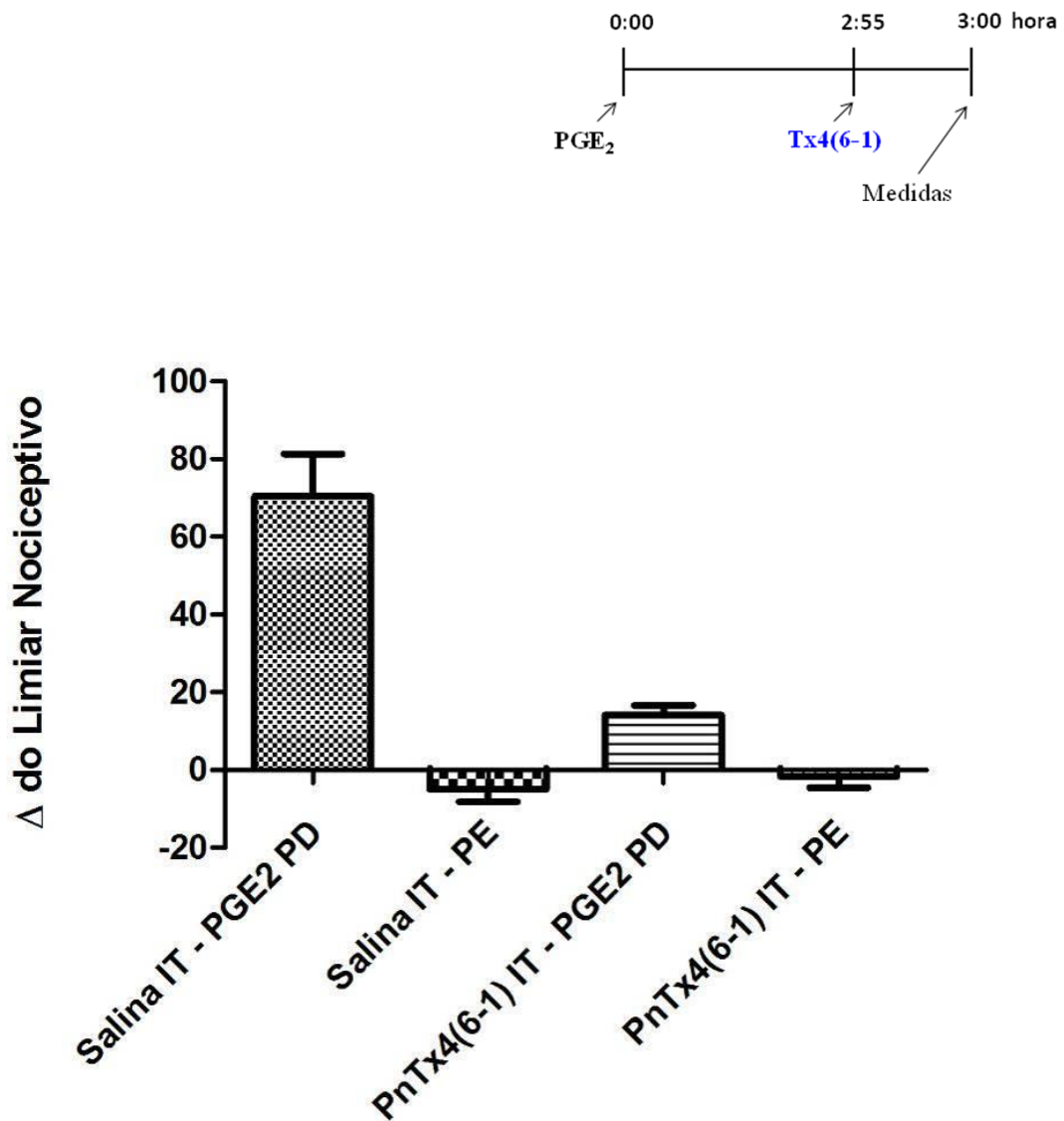


Figura 12: PnTx4(6-1) quando administrada centralmente não afeta a pata contralateral/não tratada. PnTx4(6-1) foi administrada na dose de 800 pmoles por injeção intratecal (IT). PD: pata direita, PE: pata esquerda. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. Não houve diferença significativa entre as patas contralaterais quando tratadas com salina ou com toxina.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TOXINAS – MODELO DE DOR NOCICEPTIVA

4.3.1 Comparação do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e PnTx4-3 frente a hiperalgesia evocada por PGE₂

As toxinas presentes na fração PhTx4 tendem a sofrer quebras em suas moléculas, devido provavelmente, à hidrólise de ligações peptídicas (RICHARDSON *et al.*, 2006). Durante a purificação das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 foram obtidas moléculas que apresentaram massas de 5094,3 e 5053,6 Da, respectivamente, valor abaixo do descrito para as toxinas originalmente obtidas de 5244,6 e 5199,5 Da (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Acredita-se que esta variação de massas ocorra devido à perda de aminoácidos por hidrólise. Foram essas moléculas “clivadas” (com as massas inferiores às originalmente purificadas) utilizadas no presente trabalho. Não sendo possível a comparação do efeito antinociceptivo destas com as toxinas originalmente obtidas.

A única variação existente entre as duas moléculas utilizadas neste experimento, é um resíduo de lisina na posição 27 da toxina PnTx4(6-1) e um resíduo de serina, na posição correspondente, da toxina PnTx4-3.

Com o objetivo de avaliar o possível significado destas variações na atividade antinociceptiva de PnTx4(6-1) e de PnTx4-3, foi realizada a curva de tempo do efeito dessas toxinas frente à hiperalgesia evocada por PGE₂.

Na figura 13 observamos o efeito antinociceptivo da administração intratecal de 100 pmoles das toxinas. Esse efeito manteve-se durante 20 minutos, apresentando uma queda nos tempos posteriores, sendo, portanto tempo dependente. Observamos ainda que não existem diferenças significativas entre a antihiperlgesia evocada por ambas as toxinas tanto no que tange a potência quanto no que tange ao tempo de ação.

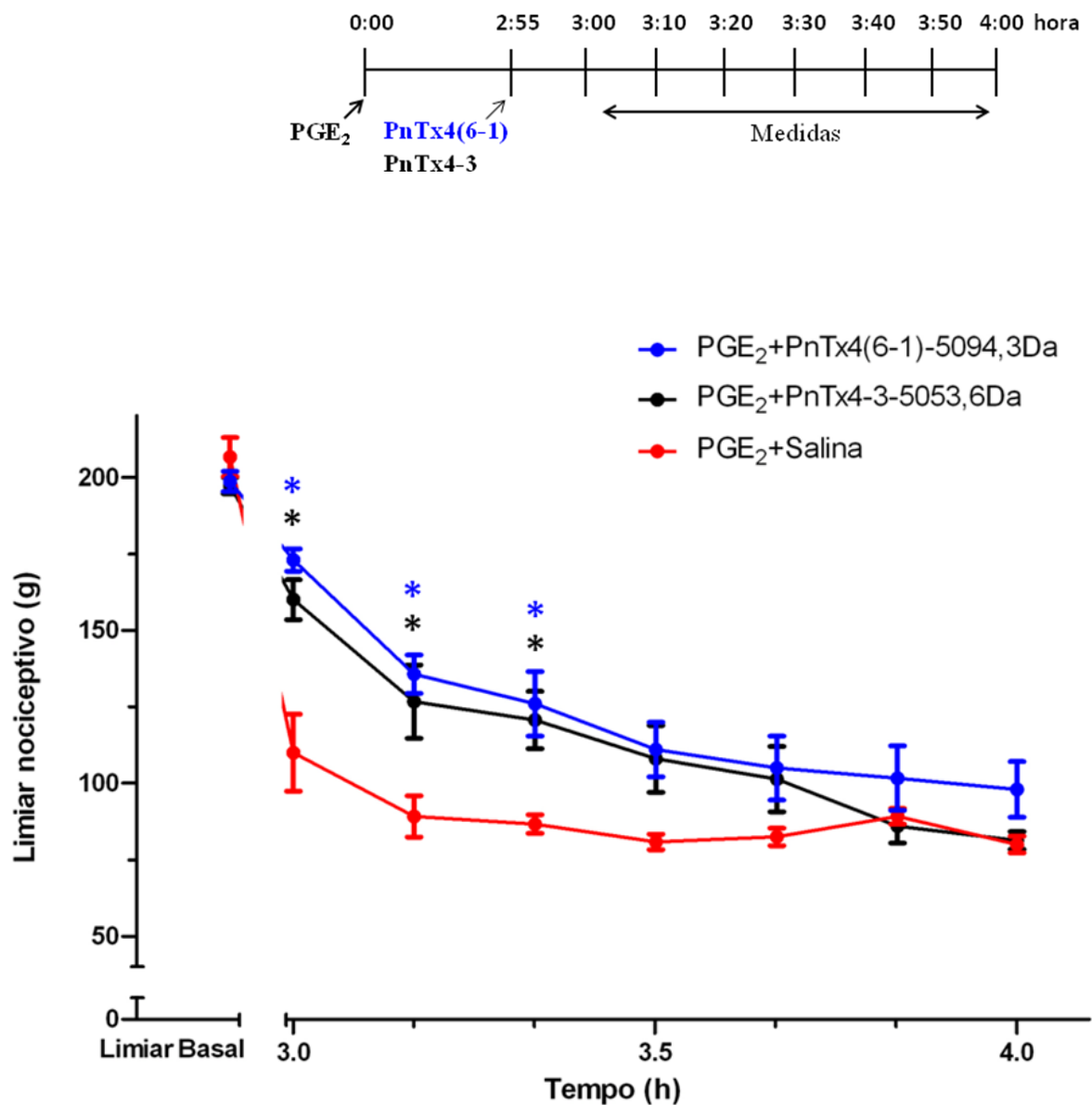


Figura 13: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 de massas 5094,3 e 5053,6 Da, respectivamente, sobre a hiperalgisia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). As toxinas foram administradas duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.3.2 Comparação do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e ω -conotoxina MVIIA (ω MVIIA)

Com o objetivo de comparar a atividade antinociceptiva de PnTx4(6-1) com uma toxina já utilizada como modelo de analgésico, foi realizada a curva de tempo de PnTx4(6-1) e ω MVIIA frente à hiperalgesia evocada por PGE₂ (Figura 14). As toxinas foram administradas por via intratecal na dose de 100 pmoles. As doses foram selecionadas de modo a permitir a comparação da potência das toxinas quando administradas na mesma concentração molar.

Não foram observadas diferenças significativas entre as duas toxinas em nenhum dos tempos aferidos, entretanto ω MVIIA apresentou tendência a um efeito antinociceptivo mais prolongado.

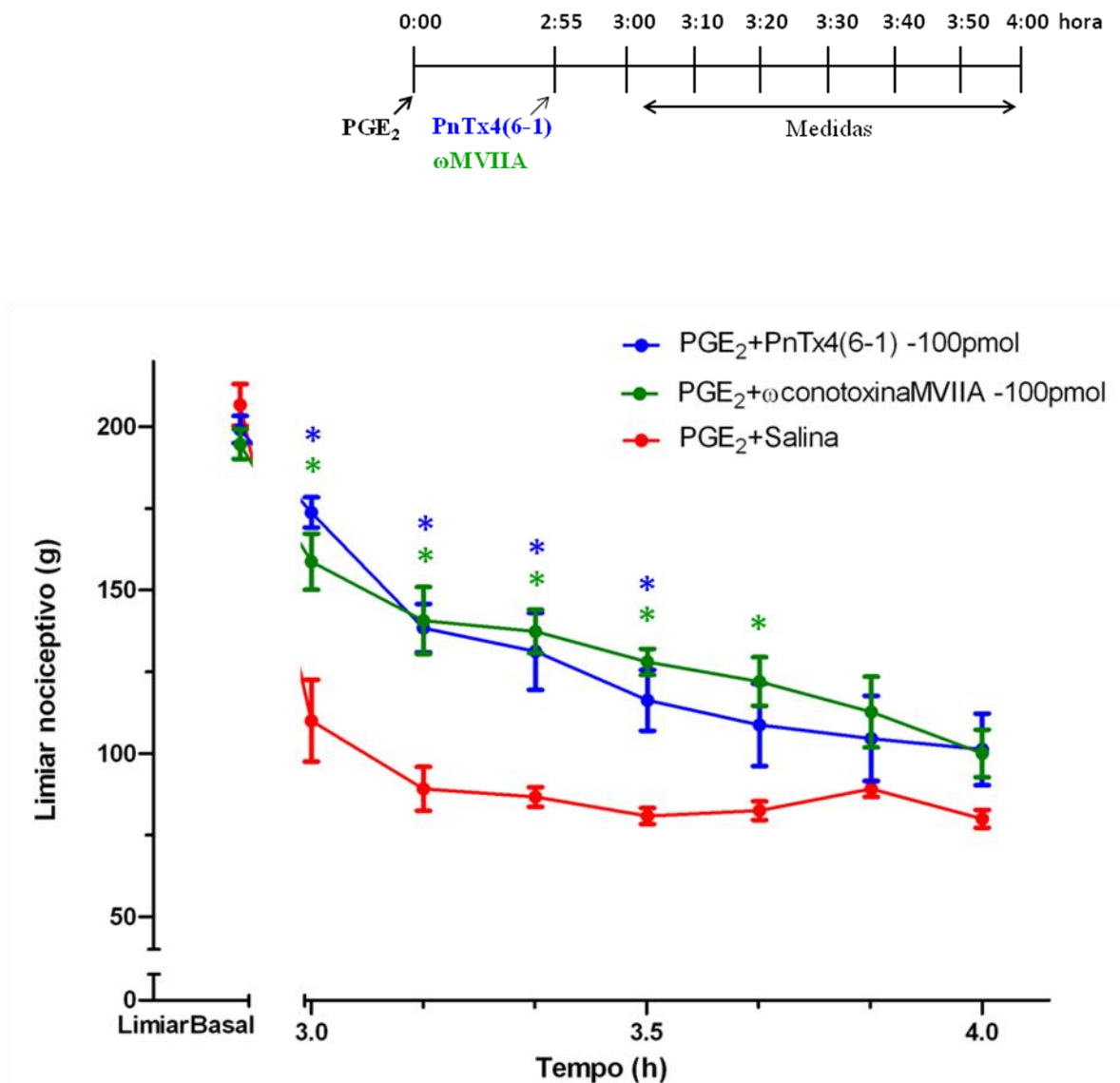


Figura 14: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles das toxinas PnTx4(6-1) e ω-conotoxina MVIIA sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 μg/pata ou 5,67x10⁻⁶ mol/pata). As toxinas foram administradas duas horas e cinquenta e cinco minutos após a PGE₂. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.4 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

4.4.1 Estabelecimento do modelo de dor neuropática

Com a realização do procedimento cirúrgico de amarração do nervo ciático foi possível estabelecer um modelo de dor neuropática. Na figura 15 observa-se que no grupo operado ocorreu uma acentuada queda do limiar, quando comparado ao controle (*naive*), a partir do décimo - primeiro dia após a lesão. Observa-se ainda que, no grupo submetido ao procedimento cirúrgico, em que não foram realizadas as amarrações (*sham*), não ocorreu diferença significativa do limiar nociceptivo se comparado ao grupo controle (*naive*). Demonstramos, assim que o desenvolvimento da dor neuropática deve-se às constrições realizadas no nervo ciático e que o procedimento cirúrgico em si não altera o limiar nociceptivo dos animais. Uma vez que a partir do décimo-quarto dia as medidas do limiar nociceptivo dos animais operados se estabilizaram, não apresentando variações significativas, esse dia foi selecionado para a realização dos experimentos posteriores.

4.4.2 Efeito de PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia evocada por constrição do nervo ciático

Uma vez estabelecido o modelo de dor neuropática foi possível testar a atividade central de PnTx4(6-1). Para isso a toxina foi administrada por via intratecal na dose de 100 pmoles, no décimo quarto dia após a constrição. Na figura 16 observa-se que a toxina foi capaz de reverter o limiar hiperalgésico cinco minutos após sua administração e que seu efeito se manteve durante 10 minutos.

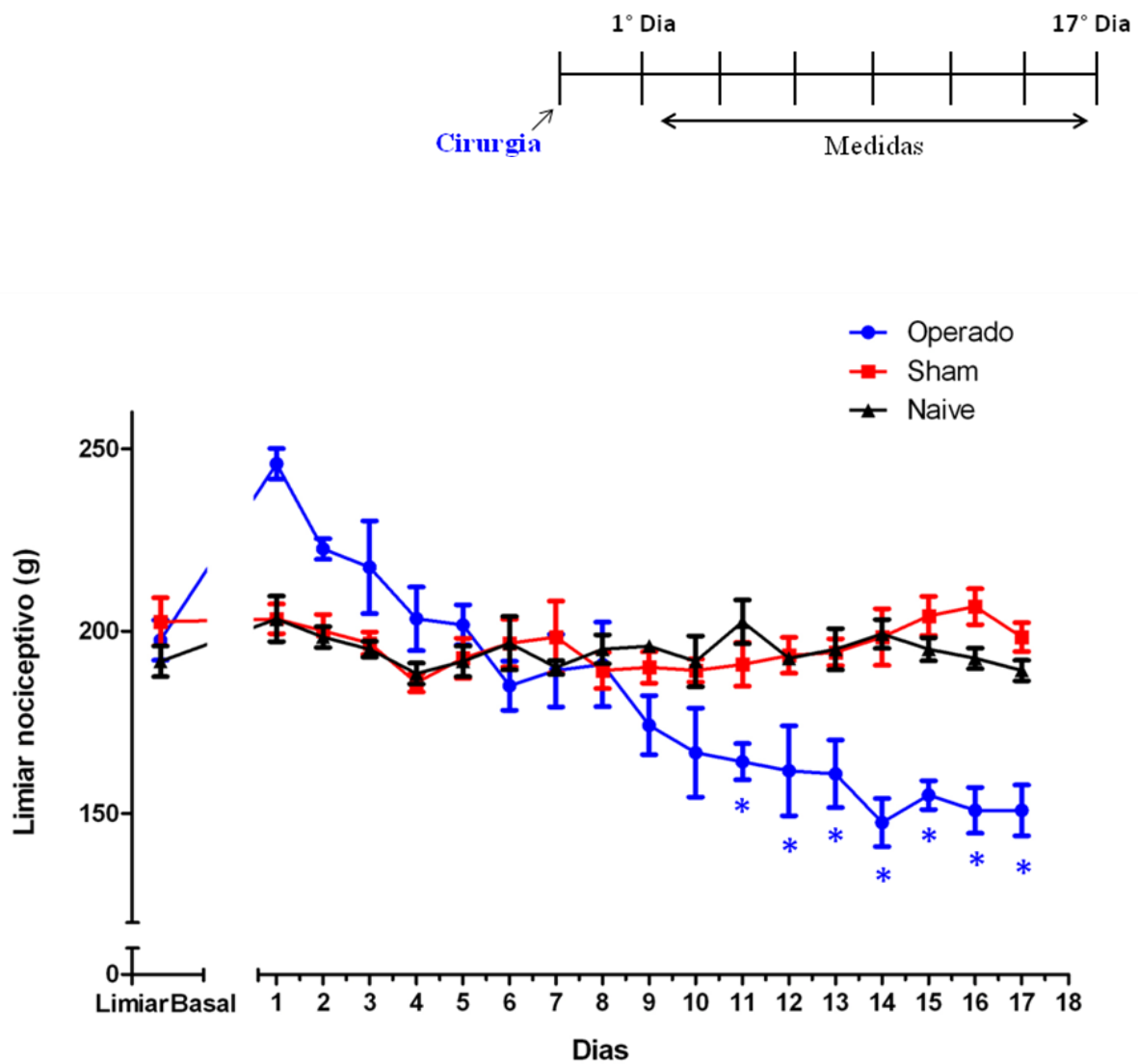


Figura 15: Desenvolvimento temporal do efeito hiperálgico induzido pela constrição do nervo ciático. O momento da cirurgia está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle *Naive*.

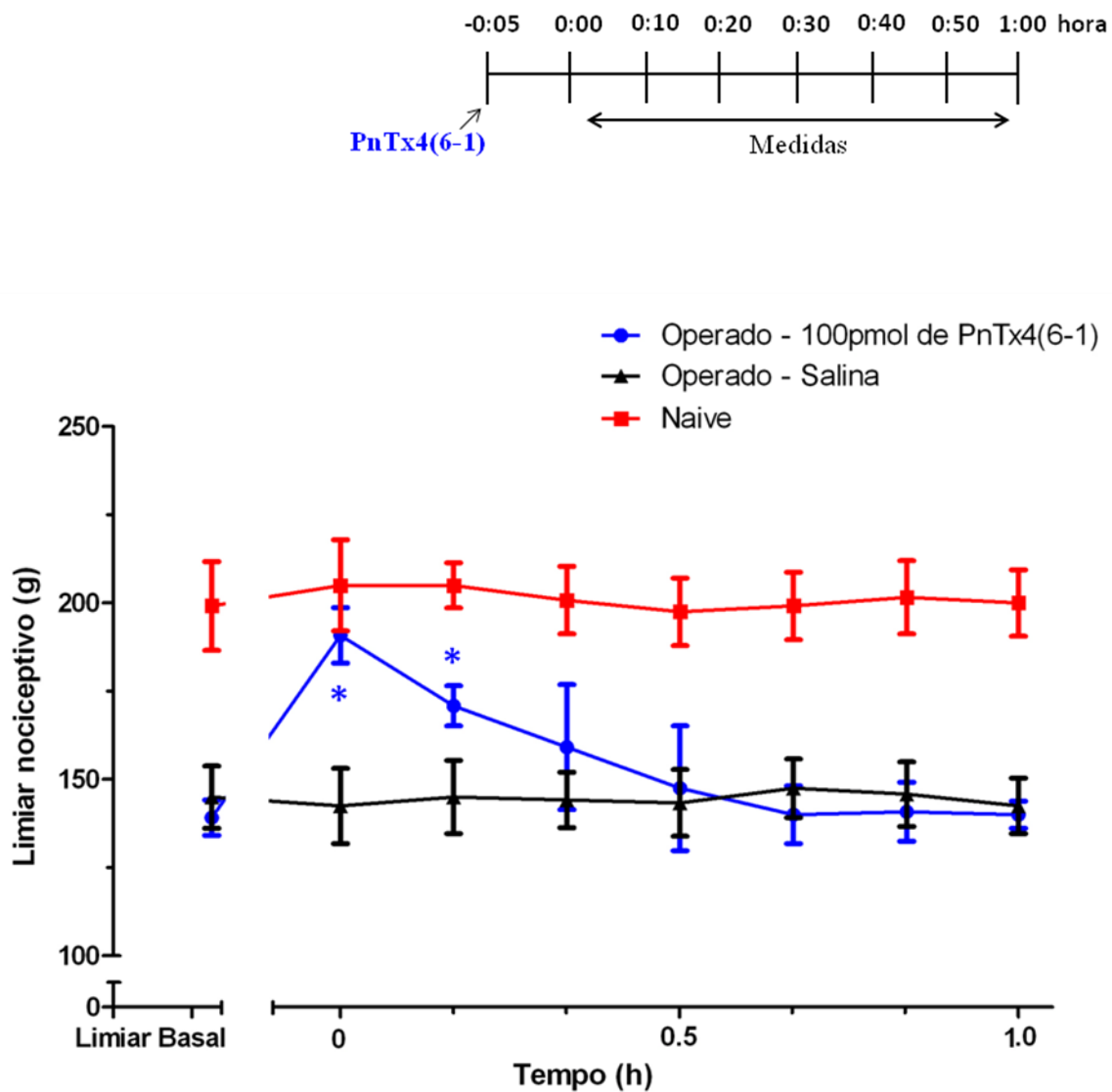


Figura 16: Efeito da administração intratecal de 100 pmoles de PnTx4(6-1) sobre a hiperalgesia induzida por constrição do nervo ciático. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g), referente ao N de 4 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Operado - Salina

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A dor tem sido uma das grandes preocupações da humanidade desde os tempos antigos, e continua sendo um dos temas mais importantes para todos os profissionais das áreas da saúde (KITAHATA, 1993). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil é um dos países que mais consomem analgésicos no mundo. Em 2010 foram gastos cerca de 1,5 bilhões de reais na compra desses medicamentos. Além dos altos custos, as terapias convencionais induzem um índice expressivo de efeitos colaterais (HALL *et al.*, 2000; ASHTON, 2001; PACHER *et al.*, 2006).

Dessa forma, a dor tem sido alvo de muitas pesquisas, que buscam melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos em seu estabelecimento, transmissão e percepção, visando o incremento de recursos terapêuticos.

O estudo de venenos, peçonhas e toxinas de artrópodes tem alimentado os laboratórios de bioquímica, fisiologia e farmacologia com uma fonte de moléculas que constituem ferramentas de grande valia para melhor compreensão de diversos processos envolvidos na regulação da homeostase. A maioria das moléculas ativas, presentes nesses venenos, como as encontradas na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, são neurotoxinas, que possuem variados efeitos, muitas delas agem em diferentes canais iônicos e alteram a dinâmica de captação/liberação de neurotransmissores (para revisão ver CORDEIRO *et al.*, 1993; GOMEZ *et al.*, 2002; DE LIMA *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2009).

A fração PhTx4 isolada da peçonha da aranha *P. nigriventer* foi descrita inicialmente como insetotóxica atuando no sistema glutamatérgico periférico de insetos (FIGUEIREDO *et al.*, 1995). Estudos posteriores revelaram que esta fração, bem como toxinas purificadas da mesma, eram capazes de inibir a captação de ³Hglutamato, fazendo com que esse neurotransmissor permanecesse mais tempo na fenda sináptica (MAFRA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, participando de diversas funções cerebrais, como cognição, aprendizado, memória e plasticidade neural (COLLINGRIDGE &

LESTER, 1989; OZAWA, 1998; DANBOLT, 2001). Esse neurotransmissor também está envolvido na neurotransmissão da dor periférica e, antagonicamente, pode exercer efeito analgésico no sistema nervoso central (FUNDYTUS, 2001; DOLAN, 2011). No presente trabalho observou-se que a toxina PnTx4(6-1), isolada da fração PhTx4, quando administrada por via central, apresenta ação antinociceptiva nos modelos de dor nociceptiva e de dor neuropática.

Demonstrou-se ainda, nesse trabalho, que a toxina PnTx4(6-1) reverteu o limiar nociceptivo dos animais quando administrada pela via intraplantar, duas horas e trinta minutos após a indução do modelo de dor inflamatória por carragenina. Desde 1962, quando foi introduzida por Winter e colaboradores, a injeção de carragenina na pata de ratos tem sido amplamente utilizada como um modelo para o estudo da inflamação e da dor inflamatória. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondrus crispus* e pode ser separada em três frações quimicamente distintas: kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ). A fração lambda é constituída quase inteiramente por D-galactose sulfatada e é a mais ativa em induzir resposta inflamatória aguda e crônica (DI ROSA, 1972). A administração intraplantar de carragenina causa edema e exacerba a sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, fenômeno denominado hiperalgesia (NANTEL *et al.*, 1999). Sabe-se que o modelo experimental de inflamação aguda induzido por carragenina envolve diferentes fases (VINEGAR *et al.*, 1969). Primeiramente a carragenina estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a liberação de serotonina e de histamina nos primeiros 90 minutos, e de cininas numa fase intermediária (90-150 minutos) (RONALD & CHRISTOPHER, 1990; FERREIRA *et al.*, 1993). A partir deste momento ocorre principalmente a produção de prostaglandinas (DI ROSA & SORRENTINO, 1968; DI ROSA *et al.*, 1971; DI ROSA & WILLOGHBY, 1971; DI ROSA, 1972). Essa cinética diferenciada de liberação dos mediadores inflamatórios pode explicar os efeitos observados pela administração de PnTx4(6-1) em diferentes tempos. Foi demonstrado, neste trabalho, que injeções intraplantares realizadas antes da segunda hora de curso da inflamação não apresentaram efeito antinociceptivo, apenas a injeção realizada duas horas e meia após o início do processo inflamatório foi

capaz de reverter o limiar nociceptivo (Figura 9). Esse dado pode indicar que o efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) ocorre em algum passo tardio, nos mecanismos finais, do processo hiperalgésico gerado pela injeção de carragenina. Evidência favorável a esta indicação é o fato de a toxina exibir antinociceção contra o efeito hiperalgésico da prostaglandina E₂ (Figura 10). Como citado anteriormente, prostaglandinas parecem ser liberadas mais tardiamente (2:30 a 6 horas) quando o agente desencadeante da hiperalgesia é a carragenina (DI ROSA & SORRENTINO, 1970). Entretanto, o presente trabalho ainda não permite concluir se as demais fases decorrentes da ação da carragenina são ou não afetadas pela toxina. Estudo sobre a liberação de citocinas e outros ensaios imunológicos poderão ajudar no esclarecimento do mecanismo de ação de PnTx4(6-1).

Trabalho realizado, pelo nosso grupo, com uma toxina obtida da mesma fração (PhTx4), que mostra 70% de similaridade com PnTx4(6-1), apresentou resultado similar. Neste, a administração intraplantar de 5 µg da toxina PnTx4(5-5), duas horas e trinta minutos após a injeção de carragenina, foi capaz de induzir um aumento bastante significativo do limiar nociceptivo dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Dados similares foram encontrados por Chen e colaboradores (2006), em que a toxina BmK AS, isolada do veneno do escorpião *Buthus martensi* Karsch, quando injetada três horas após a administração de carragenina foi capaz de aumentar significativamente o limiar nociceptivo. Na dose de 1 µg o efeito foi observado vinte minutos após a injeção e se manteve por quarenta minutos. Estudos eletrofisiológicos revelaram que BmK AS é capaz de reduzir o número de potenciais de ação contribuindo para a redução da hipersensibilidade das fibras aferentes primárias. Os autores sugerem ainda que o efeito antinociceptivo dessa toxina se deve à inibição parcial dos canais para sódio dependentes de voltagem, em neurônios de gânglio da raiz dorsal da medula.

A toxina PnTx4(6-1) apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente sobre a hiperalgesia evocada por PGE₂, quando administrada centralmente, no tempo de duas horas e cinquenta e cinco minutos, ou seja cinco minutos antes do pico de hiperalgesia de PGE₂ (terceira hora). Observou-se que a atividade antinociceptiva desta toxina decai no decorrer do tempo. As maiores doses

testadas (400 e 200 pmoles) apresentaram acentuada queda em seu efeito após 35 minutos de sua administração, portanto o efeito antinociceptivo provocado pela toxina é reversível (Figura 11). A realização de medidas na pata esquerda, não tratada, não revelaram nenhuma atividade de PnTx4(6-1), o que corrobora a idéia de que a toxina tem sua ação quando o processo hiperálgico está em curso (Figura 12).

Sabe-se que o glutamato é o principal neurotransmissor presente nas sinapses entre as fibras aferentes primárias (LI & ZHUO, 1998). Em algumas sinapses que responde a estímulos de baixo limiar sensorial, apenas os receptores pós-sinápticos NMDA (N-metil-D-Aspartato) são encontrados. Em sinapses que reconhecem estímulos sensoriais de baixa ou moderada intensidade apenas receptores de AMPA (ácido α -amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) são detectados, enquanto que em sinapses que recebem estímulos de alto limiar, tanto receptores glutamatérgicos AMPA e KA (Kainato) são relatados (LI, *et al.*, 1999; ZHUO, 2000; WANG & ZHUO, 2002).

Figueiredo e colaboradores (2001) mostraram que a toxina PnTx4(5-5) inibe seletivamente as correntes evocadas pelo receptor de glutamato NMDA, em neurônios hipocámpais de ratos. Como citado anteriormente, PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1) estão contidas na mesma fração semipurificada (PhTx4) do veneno, e apresentam alta similaridade entre si (70%). Além disto, a posição dos resíduos de cisteína é 100% conservada entre as duas toxinas, o que sugere uma estrutura terciária similar. Posteriormente foi verificada ação antinociceptiva para a toxina PnTx4(5-5), contra a hiperálgia evocada por carragenina, PGE₂ e glutamato. O autor sugere que esta toxina poderia atuar bloqueando receptores NMDA de glutamato, em nível de sistema nervoso periférico (OLIVEIRA, 2010). Acreditamos que o mecanismo de ação dessas toxinas seja similar, pois tratam-se de moléculas estruturalmente muito próximas.

Foi observado ainda por De Lima e colaboradores (2002) que PnTx4(6-1), caracterizada como uma toxina com ação inseticida, é capaz de retardar a inativação da corrente de Na⁺ em axônio isolado de inseto e que, a mesma toxina, não apresenta atividade sobre canais para sódio de músculo esquelético (rSKM1 ou Nav_{1.4}) e de cérebro (rBIIA ou Nav_{1.2}), ambos de ratos.

Entretanto, no trabalho supracitado somente um sub-tipo de canal para sódio de SNC e um sub-tipo de canal para sódio de músculo, ambos de mamíferos, foram testados. É possível que a toxina possa atuar em outros sub-tipos de canais para sódio, incluindo aqueles envolvidos no processo da dor, como por exemplo Nav_{1.3}, Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9}. Sabe-se que Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9} são tipicamente distribuídos no sistema nervoso periférico, enquanto Nav_{1.3} é principalmente, distribuído no sistema nervoso central (BOSMANS *et al.*, 2009). Ensaio envolvendo tais sub-tipos de canais para sódio isolados, poderão ajudar a esclarecer a possível ação de PnTx4(6-1) nesses canais. Experimentos de nosso grupo, em canais para sódio, transfectados em ovócitos de *Xenopus*, mostraram que a toxina PnTx4(5-5) retarda a inativação de canais para sódio dos sub-tipos Nav_{1.2}, Nav_{1.3} e Nav_{1.6}, característicos de mamífero, além de agir em canais para sódio de insetos. Os sub-tipos Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9} ainda não foram testados (CASSOLI, *et al.*, resultados não publicados). Estes resultados mostram que a toxina tem ampla ação nos diferentes subtipos de canais para sódio e que, no estágio atual do estudo, não é possível estabelecer uma correlação direta entre estes efeitos e a ação antinociceptiva de PnTx4(5-5). Uma correlação indireta do efeito de PnTx4(6-1) nestes canais, seria precipitada.

Como observado por Richardson e colaboradores (2006) as toxinas presentes na fração PhTx4 tendem a sofrer quebras em suas moléculas, devido provavelmente, à hidrólise de ligações peptídicas. Durante a purificação das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 foram obtidas moléculas que apresentaram massas de 5094,3 e 5053,6 Da, respectivamente, valor abaixo do descrito para as toxinas originalmente obtidas de 5244,6 e 5199,5 Da (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Através de cálculos, levando-se em consideração a massa dos resíduos de aminoácidos, acredita-se que durante o processo de clivagem espontânea, por hidrólise, dessas toxinas, os aminoácidos alanina e prolina tenham sido perdidos (Figura 17).

Toxina	Sequência	MS	Seq
PnTx4 (6-1)	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKCREAAIVYTA <u>PKK</u> KLTC	5244,6	5241,1
PnTx4-3	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWS <u>SS</u> SKCREAAIVYTA <u>PKK</u> KLTC	5199,5	5200,0

Figura 17: Comparação entre as toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3. A seta vermelha indica a única diferença no resíduo 27 dessas moléculas, onde uma lisina é substituída por uma serina. Os sublinhados em vermelho indicam os resíduos (alanina e prolina) que possivelmente foram perdidos durante a clivagem espontânea das duas moléculas.

Para avaliar a importância das variações dos resíduos de aminoácidos na atividade antinociceptiva dessas toxinas, PnTx4(6-1) e PnTx4-3 foram administradas centralmente na dose de 100 pmoles e suas atividades foram avaliadas frente à hiperalgesia evocada por PGE₂. Nenhuma diferença significativa nas atividades das duas toxinas foi observada, isso indica que essas pequenas modificações nas moléculas, possivelmente não alteraram a conformação necessária para sua atividade. Esse dado é promissor, pois nos permite pensar em modificações maiores para a toxina alvo do trabalho e até mesmo sua minimização, procurando não afetar a sua atividade antinociceptiva e obter uma molécula com sequência menor, de mais baixo custo, por exemplo por síntese química, e provavelmente mais adequada como possível modelo de fármaco.

Com o objetivo de comparar a atividade de PnTx4(6-1) com uma toxina já utilizada como analgésico utilizamos a toxina comercial ω MVIA. As toxinas foram administradas na mesma dose (100 pmoles) por injeção intratecal e seus efeitos foram avaliados frente a hiperalgesia evocada por PGE₂. Para ambas as toxinas foi possível a detecção do efeito antinociceptivo cinco minutos após a administração e ω MVIA apresentou um efeito antinociceptivo mais prolongado. A ω MVIA é uma potente toxina seletiva bloqueadora de canais para cálcio do tipo-N e seu efeito antinociceptivo parece estar relacionado à redução da liberação de neurotransmissores nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal (McGIVERN, 2007).

É interessante observar que a toxina PnTx4(6-1) apresentou potência semelhante a ω MVIA, uma toxina já utilizada na clínica para o tratamento da dor, nos Estados Unidos e em outros países.

Em um processo de dor neuropática ocorrem mudanças no sistema nervoso que, possivelmente, levam a uma hiperatividade do sistema de percepção da dor e/ou a um desequilíbrio entre os componentes inibitórios e facilitatórios de modulação da dor. Tanto os mecanismos periféricos quanto os centrais podem contribuir para a geração de déficits sensoriais (KATZ & ROTHENBERG, 2005). Os mecanismos periféricos incluem a sensibilização das fibras A δ e C, alterações fenotípicas nas fibras A β e a ativação dos nociceptores ditos silenciosos. Os mecanismos centrais incluem sensibilização de neurônios de segunda e de terceira ordem, assim como reorganização do circuito cortical (McGIVERN, 2007).

Em danos causados a um nervo relativamente pequeno, tal como o nervo íleo inguinal, durante procedimentos cirúrgicos, o risco de dor persistente (por mais de dois anos) é da ordem de aproximadamente 5% (KALLIOMÄKI *et al.*, 2008), ao passo que o corte de um grande nervo, como o nervo ciático, produz sustentada dor neuropática em 30 - 60% dos pacientes (MAGUIRE *et al.*, 2006; KETZ, 2008).

Entender por que um indivíduo desenvolve uma dor crônica e outro com uma lesão efetivamente idêntica é poupado é, obviamente, crucial para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento de neuropatias. Lesão, como a avulsão do plexo braquial durante o parto, comumente, não produz dor em recém-nascidos (ANAND & BIRCH, 2002), enquanto aproximadamente 40% dos adultos desenvolvem dor crônica severa quando submetido à mesma lesão (HTUT *et al.*, 2006), indicando que a dor neuropática depende de alguma forma da maturidade do sistema nervoso (MOSS *et al.*, 2007).

A maioria dos medicamentos, aprovados para o tratamento da dor neuropática parece atuar através da inibição não seletiva da atividade de canais para sódio e para cálcio, voltagem-dependentes, neuronais. No entanto, estas drogas normalmente requerem doses elevadas, tem uma incidência elevada de não responsividade e apresentam baixa eficácia (McGIVERN, 2007).

O estabelecimento deste modelo experimental, de natureza tão complexa, e a busca por novas moléculas capazes de elevar o limiar nociceptivo neste modelo é de extrema importância para a clínica médica, uma vez que, dores neuropáticas crônicas são de difícil tratamento.

Neste trabalho foi demonstrado o estabelecimento do modelo de dor neuropática, no qual o limiar nociceptivo dos animais variou de maneira similar ao observado em modelos, também, obtidos após a constrição do nervo ciático (BENNETT & XIE, 1988). Os animais apresentaram uma hipoalgesia no primeiro dia após a intervenção e a partir deste dia o limiar sofreu progressiva redução, atingindo seu menor valor a partir do décimo quarto dia.

Foi demonstrado, ainda, que a toxina PnTx4(6-1), quando administrada centralmente, na dose de 100 pmoles foi capaz de reverter a hiperalgesia evocada pela lesão no nervo ciático. Resultados similares foram observados por Dalmolin e colaboradores em 2011, nos quais a toxina PnTx3-3, que bloqueia preferencialmente subtipos de canais para cálcio dependentes de voltagem P/Q e R, apresentou efeito antinociceptivo frente ao modelo de constrição do nervo ciático em camundongos. Quando administrada via intratecal, na dose de 30 pmoles, esta toxina teve seu efeito antinociceptivo detectado trinta minutos após injeção, tendo este efeito persistido por mais noventa minutos. PnTx3-3 foi ainda capaz de reverter a hiperalgesia no modelo de dor nociceptiva, entretanto não apresentou efeito frente ao modelo de dor inflamatória (DALMOLIN *et al.*, 2011).

É interessante ressaltar que o efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) já pode ser observado cinco minutos após sua administração central tanto no modelo de dor nociceptiva quanto no modelo de dor neuropática. E que essa toxina apresentou efeito antinociceptivo em todos os três modelos testados. No entanto, pouco se sabe sobre a resposta antinociceptiva induzida por PnTx4(6-1), o mecanismo através do qual esta afeta a transmissão sensorial nociceptiva ainda precisa ser esclarecido. Estudos farmacológicos e bioquímicos devem ser realizados para o esclarecimento do mecanismo de ação desta toxina no processo da nocicepção. Por exemplo, a relação estrutura-função desta molécula, envolvendo peptídeos derivados da mesma; o estudo em canais iônicos, como canais para sódio; a melhor compreensão de sua ação no

sistema glutamatérgico dentre outros. Tais estudos poderiam contribuir não apenas para a compreensão da ação farmacológica de PnTx4(6-1) mas também para aumentar o potencial desta molécula como modelo para possíveis terapias na dor.

Ainda é escasso o conhecimento sobre a neurotoxicidade das toxinas inseticidas sobre o sistema nervoso central de mamíferos. De acordo com Landrigan (1992) o SNC tem como peculiaridade sua baixa capacidade regenerativa. A toxicidade sobre o SNC merece então, grande atenção devido à sua irreversibilidade no que se refere à lesão celular. A avaliação de atividades sobre o SNC ou neurocomportamentais *in vivo* podem ser realizadas principalmente ao nível de atividades motora, cognitiva e sensorial, e constituem ferramentas relevantes, que em conjunto podem indicar a toxicidade de uma substância sobre o SNC.

Em trabalho realizado por Souza e colaboradores, em 2008, foi demonstrado que a administração intratecal de Ph α 1 β , toxina sintetizada a partir de PnTx3-6, em ratos produziu efeitos adversos de maneira significativa nas doses de 600 e 1000 pmoles/sítio. Esses efeitos foram caracterizados pelo aparecimento de alodinia, serpenteamento de cauda e tremores. Esses efeitos adversos foram atribuídos à capacidade da toxina de bloquear canais para cálcio do tipo-N que em grandes doses, no SNC, pode provocar disfunções motoras graves.

Não são conhecidos ainda, os efeitos da toxina alvo deste estudo, PnTx4(6-1), sobre o sistema imunológico nem sobre sistemas fisiológicos importantes como cardíaco e excretor. Neste contexto é imperativa a realização de experimentos capazes de detectar possíveis reações adversas causadas pela administração de PnTx4(6-1) tanto periféricas quanto centrais. É importante ressaltar que, em estudos anteriores de nosso grupo, verificou-se que PnTx4(6-1), quando administrada centralmente, em altas doses (até 30 μ g) em camundongos, não mostrou toxicidade aparente. Entretanto, estes testes por si só, são insuficientes para avaliar a extensão de possíveis efeitos tóxicos desta molécula.

Na busca por tratamentos alternativos para distúrbios relacionados à dor, encontra-se uma extensa investigação sobre ação antinociceptiva das toxinas

inseticidas. Entretanto, os estudos para o melhor entendimento da ação destas toxinas têm como limitação a quantidade dos peptídeos nativos produzidos nas glândulas dos animais peçonhentos, como artrópodes, por exemplo. A disponibilização de quantidades maiores dessas moléculas poderá viabilizar a realização de estudos da estrutura tridimensional destas toxinas, bem como complementar os estudos farmacológicos. Essas duas abordagens são essenciais para o perfeito entendimento das relações estrutura-função destas toxinas com seus alvos farmacológicos.

A utilização de metodologias como expressão de toxinas recombinantes ou mesmo a síntese de peptídeos derivados dessas moléculas proporcionará a obtenção de maiores quantidades da molécula para a continuação dos estudos físi-farmacológicos e de relação estrutura-função, como também para a obtenção de outros derivados ativos com a expectativa do uso destas moléculas como possíveis modelos de fármacos, em formulações terapêuticas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- PnTx4(6-1), quando administrada perifericamente, reverteu o efeito hiperalgésico evocado pela carragenina;
- A toxina, quando administrada centralmente, foi capaz de reverter a hiperalgesia evocada tanto por PGE₂, quanto por constrição do nervo ciático;
- O efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) frente à PGE₂ foi dose e tempo dependente;
- O efeito antinociceptivo provocado pela toxina PnTx4(6-1) é reversível;
- A toxina análoga, PnTx4-3, apresenta atividade antinociceptiva similar a PnTx4(6-1) no modelo de hiperalgesia induzido por PGE₂;
- Na hiperalgesia induzida por PGE₂ PnTx4(6-1) apresentou uma atividade similar à ωconotoxina MVIIA, apesar desta última apresentar uma tendência a um efeito ligeiramente mais prolongado.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Considerando-se o pioneirismo deste trabalho ao estudar a ação analgésica da toxina PnTx4(6-1) admite-se que ainda há muito a ser investigado a respeito dessa molécula. A realização de outros estudos faz-se necessária para o esclarecimento do modo de ação da toxina tanto em nível periférico quanto em nível central. Portanto as principais perspectivas deste trabalho são:

- Investigar o mecanismo de ação de PnTx4(6-1) utilizando-se ferramentas farmacológicas nos modelos de dor *in vivo*;
- Realizar o estudos eletrofisiológicos com a toxina verificando sua possível ação em diferentes sub-tipos de canais para sódio, cálcio e TRPs implicados no processo de dor e antinocicepção;
- Realizar estudos de bioinformática a fim de propor um peptídeo, com estrutura minimizada, capaz de reproduzir os efeitos analgésicos de PnTx4(6-1);
- Promover a síntese deste peptídeo e testá-lo nos modelos de dor *in vivo*.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ALVES, D. P.; DA MOTTA, P. G.; LIMA, P. P.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; CALIARI, M. V.; PACHECO, D. F.; PACHECO, C. F.; FRANCISCHI, J. N.; DUARTE, I. D. Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: the role of endogenous opioid peptides. **Pharmacology**. 89:22-28, 2012.

ANAND, P.; BIRCH, R. Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates. **Brain** 125:113–22, 2002.

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **Br J Psychiatry**. 178:101-6, 2001.

BASBAUM, A. I. & JESSELL, T. M. in Principles of Neuroscience (eds Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M.) McGraw-Hill, New York, 472–491, 2000.

BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H.; FIELDS, H. L. Opiate and stimulus produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. **PNAS**. vol. 73 no.12, 1976.

BENNETT, G.J.; XIE, Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**. 33, 87-107, 1988.

BORGES, M.H.; de LIMA, M.E.; STANKIEWISZ, M.; PELHATE, M.; CORDEIRO, M.N; BEIRAO, P.S.L. Structural and functional diversity in the venom of spiders of the genus Phoneutria. In: De LIMA, M.E.; PIMENTA, A.M.C.; & ROCHAT, H. (Org.). **Animal Toxins: State of the Art. Perspectives on Health and Biotechnology**. 01 ed. UFMG, v. 01, p. 291-312, 2009.

BOSMANS, F.; ESCOUBAS, F.; NICHOLSON, G. M. Spider venom peptides as leads for drug and insecticide desing. In: De Lima, M.E. (editor-in-chief); Pimenta, A.M.C; Martin-Euclaire, M.F.; Zingali, R.B. (editors); Rochat, H. (editor consultant). **Animals Toxins: state of the art – perspectives in health and biotechnology**. Belo Horizonte-MG. Editora UFMG. 269-290p, 2009.

BURGESS, P. R. & PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**. 190, 541–562, 1967.

CAPOCASALE, R. Las arañas peligrosas del Uruguay. **Aracnología**. Suplemento 1:1-24, 1984.

CHEN, J.; FENG, X.H.; SHI, J.; TAN, Z.Y.; BAI, Z.T.; LIU, T.; JI, Y.H. The anti-nociceptive effect of BmK AS, a scorpion active polypeptide, and the possible mechanism on specifically modulating voltage-gated Na⁺ currents in primary afferent neurons. **Peptides**. 27, 2182–2192, 2006.

COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER R. A. J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacology Review**. 41, 143-210, 1989.

CORDEIRO, M. N., FIGUEIREDO, S. G., VALENTIM, A. C., DINIZ, C. R., VON EICKSTEDT, R. D., GILROY, J., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of six TX3 type neurotoxins from the venom of Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer* (Keys.). **Toxicon**. 31,35-42,1993.

COSTA, A. C.; BECKER, L. K.; MORAES, E. R.; ROMERO, T. R.; GUZZO, L.; SANTOS, R. A.; DUARTE, I. D. Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. **Pharmacology**. 89:137-144, 2012.

COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J. C., LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**. 72:359 – 371, 2005.

COX, J. J.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; THORNTON, G.; ROBERTS, E.; SPRINGELL, K.; KARBANI, G.; JAFRI, H.; MANNAN, J.; RAASHID, Y.; AL-GAZALI, L.; HAMAMY, H.; VALENTE, E. M.; GORMAN, S.; WILLIAMS, R.; MCHALE, D. P.; WOOD, J. N.; GRIBBLE, F. M.; WOODS, C. G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**. 444:894–98, 2006.

DALMOLIN, G.D.; SILVA, C.R.; RIGO, F.K.; GOMES, G.M.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; SILVA, M.A.R.; PRADO, M.A.M.; GOMEZ, M.V.; FERREIRA, J. Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. **Pain**. 2011.

DANBOLT, N. C. *Glutamate uptake*. **Progress in Neurobiology**. 65:1-105, 2001.

De LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G.; PIMENTA, A.M.; SANTOS, D.M.; BORGES, M.H.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L.C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 146(1-2):264-79, 2007.

De LIMA, M.E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; FIGUEIREDO, S.G.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MARTIN-EAUCLAIRE, M-F.; PELHATE, M.; The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁺ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. **Journal of Insect Physiology**. 48:53–61, 2002.

De SOUZA, A.H.; LIMA, M.C.; DREWES, C.C.; DA SILVA, J.F.; TORRES, K.C. L.; PEREIRA, E.M.R.; de CASTRO JUNIOR, C.J.; VIEIRA, L.B.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; GOMEZ, R.S.; ROMANO-SILVA, M.A.; FERREIRA, J.; GOMEZ, M.V. Antiallodynic effect and side effects of Pha1b, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*. Comparison with u-conotoxin MVIIA and morphine. **Toxicon**. 58, 626–633, 2011.

DHAKA, A.,VISWANATH, V., PATAPOUTIAN, A. TRPion channels and temperature sensation. **Annu. Rev. Neurosci**. 29:135–61, 2006.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol**. 24(2), 89-102, 1972.

DI ROSA, M. SORRENTINO, L. Some Pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. **Br. J. Pharmac**. 38, 214-220, 1970.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal of Pathology**. 104, 15–29. 1971.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. **European Journal of Pharmacology**. 4, 340–342. 1968.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.** 23:297–298. 1971.

DINIZ, C.E. Separação de proteínas e caracterização de substâncias ativas em venenos de aranhas do Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 35, 283-291, 1963.

DOLAN, S.; GUNN M. G.; CROSSAN, C.; NOLAN, A. M. Activation of metabotropic glutamate receptor 7 in spinal cord inhibits pain and hyperalgesia in a novel formalin model in sheep. **Behavioural Pharmacology**. 22, 582-588, 2011.

EICKSTEDT, V. R. D. von. Estudo sistemático de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e *Phoneutria keyserlingi* (Pickard-Cambridge, 1897) (Araneae; Labidognatha; Ctenisae). **Memórias do Instituto Butantan**. 42/43:95-126, 1981.

ENTWHISTLE, I.D.; JOHNSTONE, R.A.W.; MEDZIHRADSKY, D.; MAY, T.E. Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. **Toxicon**. Elmsford, v.20, p.1059-1067, 1982.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** 110(3), 1127-31. 1993.

FIELDS, H. L., BASBAUM, A. I., HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M. (eds). Walls

and Melzack's: Textbook of Pain 5 th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone cap 7:125- 42, 2006.

FIGUEIREDO, S.G.; de LIMA, M.E.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; PATTEND, D.; HALLIWELLD, R.F.; GILROYD, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. **Toxicon**. 39, 309-317, 2001.

FIGUEIREDO, S.G.; GARCIA, M.E.L.-P.; 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**. Vol. 33. p. 83-93, 1995.

FIGUEIREDO, S.G.; MAFRA, R.A.; PIMENTA, A.M.C.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; de LIMA, M.E. Purification and pharmacological activity of two potent insecticidal neurotoxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom. **J. Venom. Anim. Toxins**. Vol.3, No.1, p.231, 1997.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**. 15 (1), 29-58, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull**, 48:129-141, 1999.

GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. M. *Phoneutria nigriventer* Venom: A Cocktail of Toxins that affect Ion Channels. **Cellular and Molecular Neurobiology**. 22:579-588, 2002.

GRISHIN, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. **Eur. J. Biochem**. 264:276-280, 1999.

HALL, J. E.; UHRICH, T. D.; BARNEY, J. A.; ARAIN, S. E.; EBERT, T. J. Sedative, amnestic, and properties of small-dose dexmedetomidine infusions. **Anesth. Analg**. 90:699-705, 2000.

HERZIG,V.; WARD, R. J.; SANTOS, W. F. Ontogenetic changes in *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) spider venom. **Toxicon**. 44: 635-640, 2004.

HTUT, M.; MISRA, P.; ANAND, P.; BIRCH, R.; CARLSTEDT, T. Pain phenomena and sensory recovery following brachial plexus avulsion injury and surgical repairs. **J. Hand. Surg**. 31:596–605, 2006.

JI, R. R., STRICHARSTZ, G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. **Science**. 252:1-19, 2004.

JI, Y.H.; HUANG, H.Y.; ZHOU, C.W.; LIU, Y.; HOSHINO, M.; MOCHIZUKI, T.; YANAIHARA, N. BmK AS, an active scorpion polypeptide, enhances [3H]-noradrenaline release from rat hippocampal slices. **Biomedical Research**. 18, 257–260, 1997.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra R. S, Hord, A. H, Ginsberg B, Preble L. Acute Pain: Mechanisms & Management. St. Louis: Mosby–Year Book, 1992.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413, 2001.

KALLIOMAKI, M. L.; MEYERSON, J.; GUNNARSSON, U.; GORDH, T.; SANDBLOM, G. Long-term pain after inguinal hernia repair in a population-based cohort; risk factors and interference with daily activities. **Eur. J. Pain**. 12:214–25, 2008.

KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSEL, T. M. **Princípios da Neurosciência**. São Paulo: Manole. p. 73-491, 2003.

KATZ, W. A.; ROTHENBERG, R. Section 3: The nature of pain:pathophysiology. **J Clin Rheumatol**. 11:11-15, 2005.

KETZ, A. K. The experience of phantom limb pain in patients with combat-related traumatic amputations. **Arch. Phys. Med. Rehabil**. 89:1127–32, 2008.

KEYSERLING, E. Die Spinnen Amerikas. Brasilianische Spinnen, 3. Bauer U Raspe, Nürnberg, 1–278, 1891.

KITAHATA, L. M. Pain Pathways and Transmission. **Yale Journal of Biology and Medicine**. 66, 437-442, 1993.

LANDRIGAN, P. J. Environmental Toxicology/ Committee on Neurotoxicology and Models of Assessing Risk, Board on Environmental Studies and Toxology, Commission on Life Science, National Research Council. In: **Introduction: Defining the problem of neurotoxicity**. National Academic Press, Washington D.C., pp. 9–19, 1992.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C, A δ or A α/β fibres. **Experimental Physiology**. 87.2, 239-244, 2002.

Le BARS, B.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**. 53, 597-652, 2001.

LEVINE, J. D., TAIWO, Y. O. Inflammatory pain. In: Waal, D.; Melzack, R. (Ed.) **Text Book of Pain**. 3ed. London: Churchill-Livingstone, Cap. 2, p. 45-56, 1994.

LI, P.; KERCHNER, G. A.; SALA, C.; WEI, F.; HUETTNER, J. E.; SHENG, M.; ZHUO, M. AMPA receptor PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. **Nat Neurosci**. 2(11):972-977, 1999.

LI, P.; ZHUO, M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. **Nature**. 393 : 695-698, 1998.

LIMA, D.; ALMEIRDA, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive center of the pain control system. **Prog. Neurobiol**. 66(2), 81-108, 2002.

LIU, T.; PANG, X-Y.; JIANG, F.; BAI, Z-T.; JI, Y-H. Anti-nociceptive effects induced by intrathecal injection of BmK AS, a polypeptide from the venom of Chinese-scorpion *Buthus martensi* Karsch, in rat formalin test. **Journal of Ethnopharmacology**. 117, 332–338, 2008.

MACFARLANE, B. V., WRIGHT, A., O'CALLAGHAN, J., BENSON, H. A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.** 75:1-19, 1997.

MAFRA, R. A.; FIGUEIREDO, S. G.; DINIZ, C. R.; CORTDEIRO, M. N.; CRUZ, J. S.; de LIMA, M. E. PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. **Brain Res.** in press, 1999.

MAGUIRE, M. F.; RAVENSCROFT, A.; BEGGS, D.; DUFFY, J. P. A questionnaire study investigating the prevalence of the neuropathic component of chronic pain after thoracic surgery. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.** 29:800–5, 2006.

MARTINS, R.; BERTANI, R. The non-Amazonian species of the Brazilian wandering spiders of the genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae: Ctenidae), with the description of a new species. **Zootaxa.** 1526:1-36, 2007.

MATAVEL, A.C.; FLEURY, C.; OLIVEIRA, L.C.; MOLINA, F.; de LIMA, M.E.; CRUZ, J.S.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; RAMOS, C.; BEIRÃO, P. S. L. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. **Biochemistry.** (Easton), v. 48, p. 3078-3088, 2009.

MCGIVERN, J.G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment.** 3(1) 69–85, 2007.

MELZACK, R. The puzzle of pain. **New York: Basic Books.** 1973.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science.** 150(3699):971–979, 1965.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N Eng J Med.** 348:1243–55, 2003.

MESTRE, C.; PELISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**. 32:197-200, 1994.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural coding of pain sensation. Johns Hopkins APL Technical Digest 2, 164-171, 1981.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66:3474-555, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. Vol. 57, pp. 1 to 164, 1999.

Ministério da Saúde. Acidentes por Aranhas, 2012. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/5819/783/acidentes-por-aranhas.html>

MINTZ, I. M.; ADAMS, M. E.; BEAN, B. P. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. **Neuron**. 9, 85-95, 1992a.

MINTZ, I. M.; VENEMA, V. J.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; BEAN, B. P.; ADAMS, M.E. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -aga-IVA. **Nature**. 355(6363), 827-829, 1992b.

MOSS, A.; BEGGS, S.; VEGA-AVELAIRA, D.; COSTIGAN, M.; HATHWAY, G. J. Spinal microglia and neuropathic pain in young rats. **Pain**. 128:215–24, 2007.

MOTTA, P. G.; PEREZ, A. C.; ALVES, D. P.; DUARTE, I. D. Modulation of peripheral inflammatory pain thresholds by M(1) and nicotinic receptor antagonists. **Pharmacology**. 88:309-315, 2011.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carragenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**. 128, 853-859, 1999.

OLIVEIRA, C. F. B.; Estudo da ação antinociceptiva da toxina PnTx4(5-5) do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1981). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

OLIVEIRA, L. C., De LIMA, M. E., PIMENTA, A. M. C., MANSUELLE, P., ROCHAT, H., CORDEIRO, M. N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S. G. PnTx4-3, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. **Toxicon**. 42, 793–800, 2003.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**. 54(5), 581-618, 1998.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacol. Ver.** 58:389-462, 2006.

PARK, S.P.; KIM, B.M.; KOO, J.Y.; CHO, H.; LEE, C.H.; KIM, M.; NA, H.S.; OH, U. A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain. **Pain**. 137, 208–217, 2008.

PICKARD-CAMBRIDGE, F. O. On cteniform spiders from the lower Amazons and other regions of North and South America. **The Annals and Magazine of Natural History**. 19:52–106, 1897.

RAMOS, E. F.; ALMEIDA, C. E.; GOUVEA, E.; CARMO-SILVA, M. D. Considerações sobre atividade de locomoção, preferência por ecótopos e aspectos territoriais de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), (Araneae, Ctenidae). **Revista Brasileira de Biologia**. 58:71-78, 1998.

RANDALL, L.O. & SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesid activity on inflamed tissues. **Arch. Int. Pharmacody**. 111:409-419, 1957.

RESENDE JR, L.; CORDEIRO, M. N.; OLIVEIRA, E. B., DINIZ, C. R. Isolation Of Neurotoxic Peptides from the Venom of the Armed Spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**. Grã-Bretanha, v. 29, n. 10, p. 1225-1233, 1991.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**. 164(3878):444-445, 1969.

RICHARDSON, M, PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; BEIRÃO, P.S.L.; de LIMA, M E.; FIGUEIREDO, S.G.; BLOCH, C.J.; VASCONCELOS, E.; CAMPOS, F.; CORDEIRO, M.N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 142, n. Part C, p. 173-187, 2006.

RONALD, M. B.; CHRISTOPHER, D. H. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Arch. Pharmacol**. 342, 189–193. 1990.

SCHMIDT, R.; SCHMELZ, M.; FORSTER, C.; RINGKAMP, M.; TOREBJÖRK, E.; HANDWERKER, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **Journal of Neuroscience**. 15, 333–341, 1995.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. Suppl:1062-7, 2002.

SHENBERG, S.; PEREIRA-LIMA, F. A. *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and Biochemistry of its componensts. **Venomous Animals and their Venoms**. Vol. 3, 279-297, 1971.

SHERRINGTON, C. S. The Integrative Action of the Nervous System. Scribner, New York, 1906.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. Best Pract. Res. **Clin. Anaesthesiol**. 18:385 – 405, 2004.

SIMÓ, M.; BRESCOVIT, A. D. Revision and cladistic analysis of the Neotropical spider genus *Phoneutria* Perty, 1833 (Araneae, Ctenidae), with notes on related Cteninae. **Bulletin of the British arachnological Society**. 12:67-82, 2001.

SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos**. Editora Livraria Atheneu, p. 50-53, São Paulo, 1990.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L.; DOOM, C. M. Pain models display differential sensitivity to Ca²⁺-permeable non-NMDA glutamate receptor antagonists. **Anesthesiology**. 95(4), 965-975, 2001.

SOUZA, A. H. Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal da toxina pha1 β isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* em roedores. Tese apresentada ao Curso de Pósgraduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

TAN, Z.Y.; MAO, X.; XIAO, H.; ZHAO, Z-Q.; JI, Y.H. Analgetic effect of BmKAS-1, a new scorpion active polypeptide possible by a pathway of regulating voltage-gated sodium channels in rat DRG neurons. Abstract of the 5th Asia-Pacific Congress on Animal Plant and Microbial Toxins. Pattaya, Thailand. p 78, 1999.

TAN, Z-Y.; XIAO, H.; MAO, X.; WANG, C-Y.; ZHAO, Z-Q.; JI, Y-H. The inhibitory effects of BmK IT2, a scorpion neurotoxin on rat nociceptive flexion reflex and a possible mechanism for modulating voltage-gated Na⁺ channels. **Neuropharmacology**. 40, 352–357, 2001.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research**. Rev. 46:295 – 309, 2004.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 166, 96–103. 1969.

WANG, G. D.; ZHUO, M. Synergistic enhancement of glutamate-mediated responses by serotonin and forskolin in adult mouse spinal dorsal horn neurons. **J Neurophysiol**. 87(2):732-739, 2002.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 111, 544-547, 1962.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors noxious stimulus detectors. **Neuron.** 55:353–64, 2007.

WOOLF, N. J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. **Progress in Neurobiology.** 37, 475-524, 1991.

ZHOU, X. H.; YANG, D.; ZHANG, J. H.; LIU, C. M.; LEI, K. J. Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Biochemical Journal.** 257, 509–517, 1989.

ZHUO, M. Silent glutamatergic synapses and long-term facilitation in spinal dorsal horn neurons. **Prog Brain Res.** 129:101-113, 2000.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain.** Amsterdam, v.16. n.2. p. 109-110, 1983.