

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

Síntese e estudo da atividade antinociceptiva de Pep13, peptídeo
derivado de PnTx4(6-1), uma toxina da peçonha da aranha
Phoneutria nigriventer.

Bruna Luiza Emerich Magalhães

Belo Horizonte
Maio - 2017

Bruna Luiza Emerich Magalhães

Síntese e estudo da atividade antinociceptiva de Pep13, peptídeo derivado de PnTx4(6-1), uma toxina da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

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

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

Dr^a. Marie France Martin-Eauclaire

Belo Horizonte

Maio - 2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA), do Departamento de Bioquímica e Imunologia, no Laboratório de Dor e Analgesia (LDA) do Departamento de Farmacologia, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A síntese do peptídeo foi realizada no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos (LASEP) e no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Os experimentos relativos ao estágio sanduiche foram realizados no Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Nord, Marseille, France.

Órgãos financiadores: CNPq, CAPES, FAPEMIG.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família que com toda a paciência e amor me deram apoio e são sempre, a base para todo o meu desenvolvimento.

Aos amigos e colegas de “Bases” que estiveram comigo durante essa longa, porém rápida, caminhada e não mediram esforços para me ajudar e me fazer feliz!

Aos alunos e à equipe do LVTA – Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, pela presença e pela enorme disponibilidade para nos socorrer sempre que precisamos!

Aos alunos e à equipe do Laboratório de Dor e Analgesia por todas as técnicas e conceitos transmitidos e todos os experimentos compartilhados.

À equipe do Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Nord, por me acolher e fazer de Marseille, também, minha casa. Pierre, Brigitte, Maya, Géraldine, Christian et Marie France, merci beaucoup!

À equipe do Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos, especialmente ao Felipe, Karla e Virgílio, por me auxiliarem na síntese do peptídeo.

À equipe do Cebio e à equipe dos Biotérios do ICB, por cuidarem da nossa matéria prima e serem sempre tão solícitos.

À querida Dr^a Marta do Nascimento Cordeiro pelo início desta caminhada!

À minha orientadora, Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia, por me receber no LVTA e por acreditar no meu potencial!

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

À minha co-orientadora Dr^a Marie France Martin-Eauclaire, por me estimular a conhecer um novo mundo e uma nova forma de fazer ciência!

Aos Profs. Adriano Pimenta, Thiago Romero, Jader Cruz e Dawidson Gomes pelas contribuições científicas.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Jamil, Alexandre e Orlando, muito obrigada!

Aos meus Anjos da Guarda Franceses, Géraldine et Nicolas, merci!

Aos amigos que me cercam de amor!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécimes de <i>Phoneutria nigriventer</i>	12
Figura 2: Organograma dos estágios de purificação da peçonha bruta da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> e as principais toxinas obtidas.	13
Figura 3: Tipos de fibras sensitivas.....	19
Figura 4: Estrutura dos canais para sódio sensíveis a voltagem.	21
Figura 5: Representações da estrutura do domínio S1-S4 de KvAP. com “ <i>paddle motif</i> ”.....	22
Figura 6: Esquema da integração entre as estruturas cerebrais envolvidas na inibição e modulação das vias de controle descendente da informação nociceptiva.	24
Figura 7: Resumo da sinalização do receptor opióide.....	28
Figura 8: Administração intraplantar em ratos.	45
Figura 9: Administração intratecal em ratos.....	46
Figura 10 - Aparelho algosimétrico (Ugo Basile, Itália).	47
Figura 11: Teste de retirada da cauda mediante ao estímulo térmico.	50
Figura 12 - Ensaio de toxicidade em mosca (<i>Musca domestica</i>).....	52
Figura 13: Representação esquemática de um sensor utilizado na técnica de ressonância plasmônica de superfície..	53
Figura 14 - Comparação das sequências de aminoácidos de três toxinas com propriedades antinociceptivas, da fração PhTx4.	57
Figura 15 - Representação gráfica da predição de acessibilidade à superfície da toxina PnTx4(6-1).....	58
Figura 16 - Predição para a formação de pontes de dissulfeto em PnTx4(6-1).....	59
Figura 17 - Perfil cromatográfico da purificação de Pep13, a partir dos produtos obtidos após a síntese.....	60
Figura 18 - Perfil da espectrometria de massa de Pep13.....	62
Figura 19: Perfil de fragmentação de Pep13 gerado por espectrometria de massa.....	63
Figura 20: Efeito da administração intratecal de diferentes doses do peptídeo Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	65
Figura 21: Efeito do antagonista não específico de receptores opióides, naloxona, na antinocicepção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	67
Figura 22: Efeito do antagonista do receptor CB ₁ , AM251, na antinocicepção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia evocada por PGE ₂	68

Figura 23: Efeito do antagonista do receptor CB ₂ , AM630, na antinocicepção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia evocada por PGE ₂ .	69
Figura 24: Efeito da administração intraplantar de diferentes doses do peptídeo Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ (2 µg/pata).	71
Figura 25: Teste de exclusão do efeito sistêmico de Pep13 na dose de 20 µg.	73
Figura 26: Efeito do antagonista não específico dos receptores opídeos, naloxona, na antinocicepção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ .	75
Figura 27: Efeito do antagonista do receptor CB ₁ , AM251, na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ .	76
Figura 28: Efeito do antagonista do receptor CB ₂ , AM630, na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ .	78
Figura 29: Efeito da ação de MAFP na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ .	79
Figura 30: Efeito da ação de VDM11 na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂ .	80
Figura 31: Efeito de administração intratecal de Pep13 mediante ao estímulo térmico.	82
Figura 32: Ensaio de ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3, Pep13 e KTX ao peptídeo <i>paddle</i> Na _v 1.2 DIV	84
Figura 33: Sensorgrama mostrando o ensaio da ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3, ao peptídeo <i>paddle</i> Na _v 1.2 DIV	85
Figura 34: Sensorgrama mostrando o ensaio de ligação das toxinas AaHII e Pep13 ao peptídeo <i>paddle</i> Na _v 1.2 DIV	86
Figura 35: Ensaio de ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3 e Pep13 ao peptídeo <i>paddle</i> Na _v 1.7 DIV	88
Figura 36: Lista de possíveis alvos moleculares preditos pelo programa SEA, para o peptídeo Pep13	101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comparação das sequências de três principais toxinas da fração PhTx4. MS – Massa molecular determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF ou Q-TOF); Nova nomenclatura proposta por King e colaboradores (2008). As ligações peptídicas que possivelmente sofreram hidrólise estão sublinhadas (RICHARDSON et al., 2006). 15
- Tabela 2 – Resultado do teste de toxicidade em moscas (*Musca domestica*). Esses são os principais sinais observados em caso de toxicidade.89
- Tabela 3 - Comparação entre dose e duração do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e Pep13. O efeito antinociceptivo foi considerado significativo quando comparado ao controle hiperalgésico.92

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A ARANHA <i>Phoneutria nigriventer</i> E SUA PEÇONHA.....	11
1.1.1 A fração PhTx4 e a toxina PnTx4(6-1).....	14
1.2 DOR E NOCICEPÇÃO	18
1.2.1 Transmissão ascendente da dor.....	18
1.2.2 Sistemas de modulação endógenos da dor	23
1.2.2.1 Via dos opioides.....	26
1.2.2.2 Via dos canabinoides.....	29
1.3 TOXINAS COM AÇÃO ANTINOCICEPTIVA.....	32
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 PROPOSIÇÃO E SÍNTESE DO PEPTÍDEO A SER AVALIADO NOS TESTES NOCICEPTIVOS	40
4.2 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO.....	41
4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	42
4.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR.....	43
4.5 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	43
4.6 DROGAS E REAGENTES	43
4.7 ADMINISTRAÇÕES DAS DROGAS.....	45
4.7.1. Intraplantar.....	45
4.7.2. Intratecal	45
4.8 TESTES NOCICEPTIVOS.....	46
4.8.1 Teste de retirada de pata submetida a estímulo mecânico	46
4.8.2 Teste de retirada da cauda mediante ao estímulo térmico	49
4.9 TESTE DE TOXICIDADE EM INSETOS	51
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54

5 RESULTADOS	57
5.1 PROPOSIÇÃO E SÍNTESE DO PEPTÍDEO.....	57
5.2 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO.....	59
5.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	61
5.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR.....	64
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEP13	64
5.5.1 Avaliação do efeito central de Pep13	64
5.5.1.1 Efeito induzido pela administração intratecal de Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	64
5.5.1.2 Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intratecal de Pep13.....	66
5.5.1.3 Envolvimento do sistema canabinoide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intratecal de Pep13	66
5.5.2 Avaliação do efeito periférico de Pep13.....	70
5.5.2.1 Efeito induzido pela administração intraplantar do peptídeo sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	70
5.5.2.2 Avaliação do possível efeito sistêmico de Pep13 na dose de 20 µg	72
5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PEP13 COM PADDLES DE NA_v.....	83
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE PEP13	89
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO.....	104
8 PERSPECTIVAS	106
9 REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO A – Artigo PnTx4(6-1) – Resultados de mestrado finalizados e publicados durante o doutorado.	122
ANEXO B – Artigo <i>Buthus occitanus</i> – Trabalho realizado durante o estágio sanduiche e submetido à publicação.....	123
ANEXO C – Capítulo de livro – Publicado durante o doutorado.....	124
ANEXO D – Trabalho de Mestrado apresentado oralmente no Congresso Internacional da Sociedade de Toxinologia em 2013.	125
ANEXO E – Trabalho de Mestrado apresentado em forma de Poster no Congresso Mundial de Dor em 2014.....	126
ANEXO F – Manuscrito do trabalho de Doutorado.....	1263

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

5-HT - serotoninérgico

ACN - acetonitrila

AM251 - (1-(2,4-diclorofenil)-5-(iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazol-3-carboxamida)

AM630 - ([6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4etoxifenil) metanona)

AMPc - 3'5'adenosina-monofosfato cíclico

BSA - albumina de soro bovino

CAMP - adenosina monofosfato cíclica

CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB₁ – receptores canabinoides do tipo 1

CB₂ - receptores canabinoides do tipo 2

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAG - diacilglicerol

DCM - diclorometano

DIC - 1,3-diisopropilcarbodimida

DMF – dimetilformamida

DRG - gânglio da raiz dorsal

EDT - etanoditiol

FAAH - amida hidrolase de ácidos graxos

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

HOBt - 1H-hidroxibenzotriazola

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

IC₅₀ - dose necessária para atingir 50 % de inibição

IEDB - *Immune Epitope Database*

IPA - isopropanol

LASEP - Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos

LD₅₀ - dose necessária para atingir 50 % de letalidade

LDA - Laboratório de Dor e Analgesia

LVTA - Laboratório de Venenos e Toxinas Animais

MAFP - (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil-fosfonofluorídrico metil ester)

MAP - cinases ativadas por mitógenos

MRV - medula rostroventromedial

NA - noradrenérgico

NAPE - fosfatidiletanolamina

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMR - núcleo magno da rafe

NP - neurônios de projeção

P - fosforilação

PAG - substância cinzenta periaquedutal

PGE₂ - prostaglandina E₂

PTX - toxina pertussis

RU - unidades de ressonância

SEA - *similarity ensemble approach*

SPR - ressonância plasmônica de superfície

TFA - ácido trifluoroacético

THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

TIS - tri-isopropil-silano

VDM11 - [(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida]

VGSCs - canais para sódio sensíveis à voltagem

RESUMO

A peçonha da aranha "armadeira" *Phoneutria nigriventer* possui diversos componentes biologicamente ativos, dentre eles a toxina PnTx4(6-1), um peptídeo composto por 48 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 5,2 kDa. PnTx4(6-1), também denominada δ -ctenitoxin-Pn1a, foi inicialmente descrita como uma neurotoxina inseticida que se liga ao sítio 3 de canais para sódio em sinaptossomas de corda nervosa de barata. Quando injetada por via intracerebroventricular em camundongos (30 μ g), PnTx4(6-1) não provocou toxicidade aparente, além disso, esta toxina não apresentou efeito em canais para sódio de músculo esquelético (rSKM1) e de cérebro (rBIIA) de ratos. Posteriormente demonstramos que PnTx4(6-1) possui efeito antinociceptivo frente a três modelos de dor: i) inflamatório, evocado por carragenina; ii) nociceptivo, evocado por prostaglandina E₂ e iii) neuropático, evocado por constrição do nervo ciático. Utilizando-se antagonistas verificamos que o sistema canabinoide, via receptor CB₁, e o sistema opioide, via receptores μ e δ , estão envolvidos no efeito antinociceptivo evocado por PnTx4(6-1). No presente trabalho baseado na sequência de aminoácidos de PnTx4(6-1), propusemos e sintetizamos um peptídeo linear, de 13 resíduos de aminoácidos denominado Pep13, na tentativa de reproduzir ou aumentar os efeitos antinociceptivos da toxina nativa. Verificamos que, assim como a toxina nativa, Pep13 apresenta ação antinociceptiva quando administrado por via intratecal e este efeito, também, relaciona-se aos sistemas canabinoide e opioide. Além disto, quando o efeito periférico foi avaliado, por administração intraplantar, Pep13 foi capaz de reverter o limiar hiperalgésico evocado por prostaglandina E₂. Relacionada, ainda, ao efeito antinociceptivo periférico foi observada a participação do sistema opioide, uma vez que o antagonista não específico (naloxona) foi capaz de prevenir parcialmente o efeito de Pep13. Com relação ao sistema canabinoide, com a utilização de antagonistas específicos, observou-se a participação dos receptores CB₁. Diferentemente da inseto-toxina nativa, Pep13 não causou nenhum efeito aparente quando administrado em moscas. Em conclusão, o peptídeo sintético Pep13, cuja sequência possui 35 resíduos de aminoácidos a menos que a toxina nativa PnTx4(6-1), reproduz os efeitos antinociceptivos apresentados pela mesma, sem entretanto, apresentar toxicidade para insetos e podendo assim, se tornar um bom modelo para novos analgésicos.

Palavras Chaves: *Phoneutria nigriventer*, PnTx4(6-1), Antinocicepção, Pep13

ABSTRACT

The venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer* has several biologically active peptides, one of them the toxin PnTx4(6-1) is a peptide composed of 48 amino acid residues and molecular mass of 5.2 kDa. PnTx4(6-1), also named δ -ctenitoxin-Pn1a, was initially described as an insecticidal neurotoxin, that binds to site 3 of sodium channels, in nerve cord synaptosomes of cockroach. When intracerebrally injected in (30 μ g) in mice, PnTx4(6-1) caused no apparent toxicity, moreover this toxin did not affect sodium channels of skeletal muscle (rSKM1) and brain (rBIIa), both of rats. Subsequently, we demonstrated that PnTx4(6-1) has antinociceptive effect in three pain models: i) inflammatory, evoked by carrageenan; ii) nociceptive, evoked by prostaglandin E₂ and iii) neuropathic, evoked by constriction of the sciatic nerve. Using diverse receptors antagonists, we verified that the cannabinoid system, via the CB₁ receptor, and the opioid system, through the μ and δ receptors, are both involved in the antinociceptive effect of PnTx4(6-1). In the present work, based on PnTx4(6-1) amino acid sequence we proposed and synthesized a linear peptide, with 13 amino acid residues named Pep13, based on the amino acid sequence of PnTx4(6-1) in order to try to reproduce or increase the analgesic effect of the toxin, with a simpler molecule. We verified, similarly to the toxin, the peptide has antinociceptive activity, when intrathecally administered, and this effect is also related to the cannabinoid and opioid systems. In addition, when the peripheral effect was evaluated, by intraplantar administration, Pep13 was able to reverse the hyperalgesic threshold evoked by prostaglandin E₂. Still related to the peripheral antinociceptive effect, the participation of the opioid system was observed, since the nonspecific antagonist (naloxone) was able to partially prevent the effect of Pep13. Regarding the cannabinoid system, by using specific antagonists, the participation of CB₁ receptors was observed. Differently from the native toxin, which has a high toxicity to insects, the peptide caused no apparent effect when administered in flies. In conclusion, the synthetic peptide Pep13, which has 35 amino acid residues less than the native toxin PnTx4(6-1), reproduces the antinociceptive effects presented therein, without presenting however insect toxicity and may become a good model for new analgesics.

Key Words: *Phoneutria nigriventer*, PnTx4(6-1), Antinociception, Pep13

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ARANHA *Phoneutria nigriventer* E SUA PEÇONHA

Espécies do gênero *Phoneutria*, pertencentes à família Ctenidae, são conhecidas como aranhas armadeiras, devido à posição que assumem quando são ameaçadas, e sendo 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. reidy* 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).

As aranhas da espécie *Phoneutria nigriventer* (Figura 1), descritas por Keyserling em 1891, 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). Os exemplares da espécie apresentam as quelíceras com coloração marrom escura e presença de cerdas avermelhadas. Já a região ventral apresenta coloração uniforme que pode variar do preto ao marrom escuro e em alguns casos, o macho pode apresentar a coloração marrom-alaranjada (Figura 1) (EICKSTEDT, 1981).

As aranhas desta espécie são extremamente agressivas e caçam ativamente suas presas e seu sucesso como predadoras, está diretamente relacionado à toxicidade da sua peçonha (SOERENSEN, 1990; GOMEZ et al., 2002).



Figura 1: Espécimes de *Phoneutria nigriventer*. Espécime fêmea em posição de defesa (esquerda) - Espécime macho (direita) onde nota-se a presença de dilatações nos pedipalpos (a) e do ventre alaranjado (b). Fotos: Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* possui diversos componentes biologicamente ativos, dentre eles, toxinas que se ligam a receptores de membrana e a diversos canais iônicos (de LIMA et al., 2002; 2007; 2015; GOMEZ et al., 2002; RICHARDSON et al., 2006; MATAVEL et al., 2009; BORGES et al., 2009). A peçonha bruta dessa aranha contém potentes neurotoxinas que podem causar sinais como excitação, salivação, lacrimejamento, priapismo, convulsão, paralisia flácida e espástica dos membros anteriores/posteriores e morte, quando injetado por via intracerebroventricular, em camundongos (DINIZ, 1963; SCHENBERG & PEREIRA-LIMA, 1971; ENTWHISTLE et al., 1982).

A peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* foi semi-purificada e dividida em cinco frações que, posteriormente, mostraram atuar em diferentes alvos, tanto em mamíferos quanto em insetos (Figura 2). Rezende e colaboradores (1991) purificaram quatro frações dessa peçonha, sendo três destas (PhTx1, PhTx2 e PhTx3) tóxicas para 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 do íleo de cobaias. Uma quinta fração foi ainda, identificada por Figueiredo e colaboradores (1995) e nomeada PhTx4.

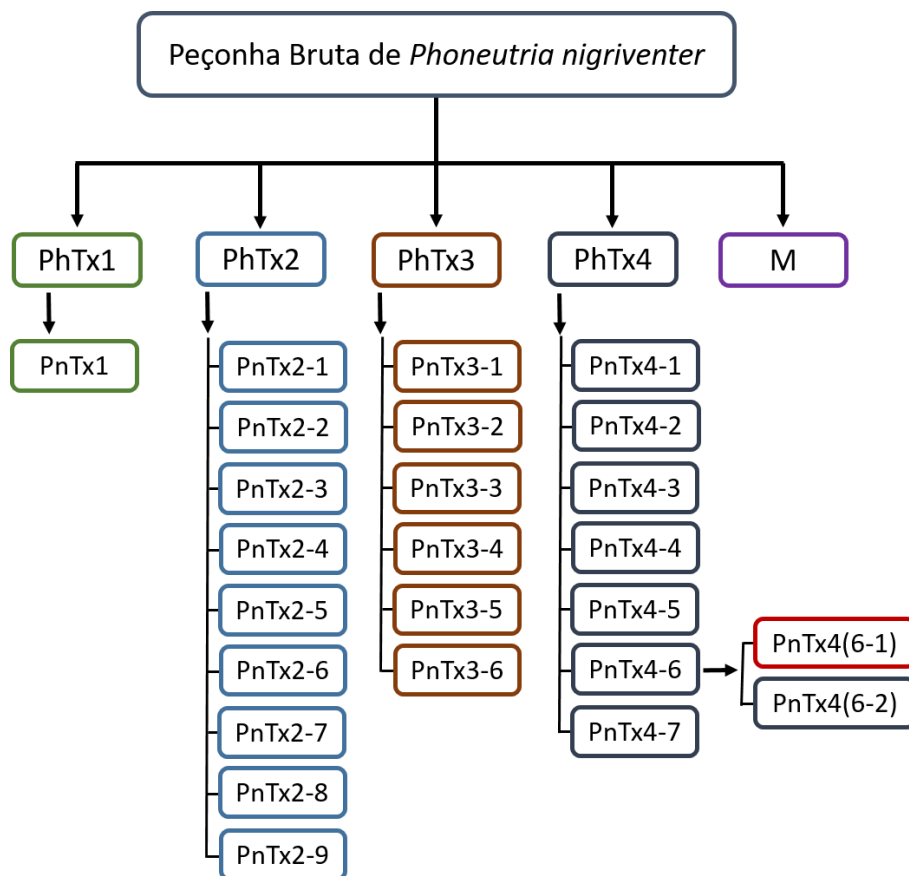


Figura 2: Organograma dos estágios de purificação da peçonha bruta da aranha *Phoneutria nigriventer* e as principais toxinas obtidas. Destaque em vermelho para a toxina PnTx4(6-1).

Toxinas purificadas da peçonha de *Phoneutria nigriventer* têm sido investigadas por diferentes autores. Tais toxinas são, majoritariamente, polipeptídeos com massa molecular entre 3,5 e 9 kDa. Vários destes polipeptídeos interagem com canais iônicos, como, canais para sódio (Na_v), cálcio (Ca_v), potássio (K_{av}), dentre outros, afetando seu funcionamento (para revisão ver: GOMEZ et al., 2002, De Lima et al., 2015).

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

A fração PhTx4, difere das outras frações purificadas da peçonha de *P. nigriventer*, por apresentar maior toxicidade para insetos que para mamíferos, sendo extremamente tóxica e letal para os primeiros, e parece atuar no sistema glutamatérgico dos mesmos. Quanto administrada em moscas (*Musca domestica*) esta fração apresentou LD₅₀ de 6,8 ng/20 mg, entretanto quando administrada intracerebroventricularmente em camundongos PhTx4 apresentou LD₅₀ de 9,5 x 10³ ng/20 g (FIGUEIREDO et al., 1995). Estudos anteriores do nosso grupo indicaram 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., 1997). Já em sinaptosomas cerebrocorticais de rato, esta fração inibiu a captação de ³H-glutamato com IC₅₀ de 2,35 ± 0,9 µg/mL (MAFRA et al., 1999). Dentre as toxinas purificadas da fração PhTx4, destacam-se PnTx4-3, PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1). Recentemente, uma nova nomenclatura foi proposta por King e colaboradores (2008), nessa as toxinas são nomeadas com base na espécie animal que produziu a peçonha, da qual foram isoladas, e na ação destas toxinas em canais iônicos e receptores de membrana. Assim as três toxinas citadas anteriormente seriam nomeadas δ-ctenitoxin-Pn1b, Γ-ctenitoxin-Pn1a e δ-ctenitoxin-Pn1a, respectivamente. Essas três toxinas apresentam alta identidade, além disso, o número e a distribuição dos resíduos de cisteína são 100 % conservados. Uma característica notável destas sequências é a presença de resíduos de cisteína tanto no grupo amino quanto no carboxi-terminal (Tabela 1) (OLIVEIRA, et al., 2003). Em estudo proteômico realizado por Richardson e colaboradores (2006) foram detectados baixos níveis de formas “clivadas” destas moléculas na peçonha de *P. nigriventer*, 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 tabela 1). Os autores não sugerem nenhuma explicação para essa hidrólise, mas podemos sugerir que essa clivagem se deva a proteólise

causada por enzimas proteolíticas da própria peçonha ou que ocorra durante as várias etapas de purificação.

Tabela 1 - Comparação das sequências de três principais toxinas da fração PhTx4. MS – Massa molecular determinada por espectrometria de massa (MALDI-TOF ou Q-TOF); Nova nomenclatura proposta por King e colaboradores (2008). As ligações peptídicas que possivelmente sofreram hidrólise estão sublinhadas (RICHARDSON et al., 2006).

Toxina	Sequência	MS	Nova nomenclatura
PnTx4 (6-1)	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKREAAIV <u>IYTA</u> PKKLTTC	5199,5	δ-ctenitoxin-Pn1a
PnTx4-3	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSSSKKREAAIV <u>IYTA</u> PKKLTTC	5244,6	δ-ctenitoxin-Pn1b
PnTx4 (5-5)	CADIN <u>GA</u> CKSDCDCCGDSVTCDCYWSKSCKRESNFK <u>IGMA</u> IRK <u>KF</u> -C	5170,0	Γ-ctenitoxin-Pn1a

A toxina PnTx4-3, purificada em 2003, induziu efeitos excitatórios imediatos quando injetada, por via intratorácica, em moscas. Quando 30 µg desta toxina foram administrados intracerebroventricular em camundongos, não foram observados sinais aparentes de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2003). Adicionalmente, estes autores testaram 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), também apresenta alta toxicidade para insetos, nas doses de 50, 250 e 150 ng/g, esta causou efeitos neurotóxicos imediatos quando administrada em moscas, baratas e grilos, respectivamente. PnTx4(5-5) não apresentou toxicidade aparente, quando 30 µg foram administradas intracerebroventricularmente em camundongos (FIGUEIREDO et al., 2001). Neste mesmo trabalho observou-se que a toxina PnTx4(5-5) inibe, seletivamente, as correntes

evocadas pelo receptor de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), em neurônios hipocâmpais de ratos. Dados corroborados pelo trabalho de Silva e colaboradores (2016), no qual PnTx4(5-5) reduziu as correntes pós-sinápticas evocada pelos receptores NMDA em fatias de hipocampo de camundongos. Os autores associam, ainda, essa atividade à redução de morte celular observada em dois importantes modelos de doenças neurodegenerativas. PnTx4(5-5) apresentou efeito neuroprotetor em neurônios corticoestriatais de camundongos no modelo da Doença de Huntington e em neurônios desafiados com A β , o principal componente das placas amiloides, observadas na Doença de Alzheimer (SILVA et al., 2016).

Recentemente PnTx4(5-5) foi clonada em sistema heterólogo em *Escherichia coli* e a toxina recombinante foi testada em canais para sódio transfetados em ovócitos de rãs (*Xenopus laevis*). Foi demonstrado que a toxina recombinante retarda a inativação de canais para sódio de barata, *Blattella germanica* (Na_vBg), resultando no aumento da condutância do sódio. Contrariamente, quando testada em canais para sódio humanos (Na_v1.2 à Na_v1.6), PnTx4(5-5) recombinante inibiu o pico de amplitude das correntes, sendo a maior inibição observada para o sub-tipo Na_v1.3, de 38,4 % (PAIVA et al., 2016).

Em trabalho, realizado em nosso laboratório, foi demonstrado que PnTx4(5-5) apresenta ação antinociceptiva. Quando administrada por via subcutânea, no dorso de ratos, a toxina (2,5 mg/Kg) foi capaz de reverter a hiperalgesia, evocada por prostaglandina E₂ (PGE₂), na pata dos animais. Quando avaliados os efeitos periféricos, observou-se que PnTx4(5-5) foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida por carragenina em todas as doses testadas (2,5; 5 e 10 μ g/pata). As mesmas doses da toxina apresentaram efeito antinociceptivo periférico frente a hiperalgesia evocada por PGE₂. PnTx4(5-5) na dose de 5 μ g/pata foi capaz de reverter a hiperalgesia evocada pela administração intraplantar de L-glutamato (1 μ g/pata) (OLIVEIRA, 2010).

Também pertencente à família PhTx4, a toxina PnTx4(6-1) é um polipeptídeo de cadeia única composto por 48 resíduos de aminoácidos, e massa molecular de 5244,6 Da. Tal polipeptídeo foi inicialmente descrito como uma neurotoxina inseticida (FIGUEIREDO et al., 1995), capaz de estimular a liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (FIGUEIREDO et al., 1997). Posteriormente, trabalho realizado por De Lima e colaboradores (2002) demonstrou que a toxina PnTx4(6-1) liga-se ao sítio 3 dos canais para sódio em sinaptosomas de corda nervosa de barata (*Periplaneta americana*) e retarda a inativação da corrente de sódio, em axônio isolado do mesmo inseto. Demonstrou-se neste trabalho que, canais para sódio de músculo esquelético (rSKM1 ou Na_v1.4) e de cérebro (rBIIA ou Na_v1.2), ambos de ratos, não são alvos da toxina PnTx4(6-1).

Em meu trabalho de mestrado mostramos que a toxina PnTx4(6-1) apresenta atividade antinociceptiva nos modelos de dor neuropática, induzida por constrição do nervo ciático, dor inflamatória, evocada por carragenina e dor nociceptiva, induzida pela administração de prostaglandina E₂. O efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) no modelo de dor nociceptiva, avaliado por administração intratecal da toxina, parece envolver os sistemas opioide, via receptores μ e δ , e canabinoide, via receptores do tipo CB₁, uma vez que o efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) foi reduzido pela administração de antagonistas destes receptores. Em experimento comparativo, utilizando-se doses equimolares de PnTx4(6-1) e de ω -conotoxina MVIIA, observou-se que o efeito antinociceptivo foi similar para ambos os peptídeos (EMERICH et al., 2016). Diante do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) nos três modelos nociceptivos é interessante considerar esta toxina como bioinspiradora para o desenvolvimento de moléculas, capazes de tratar a dor.

1.2 DOR E NOCICEPÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1994), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos”. Desta maneira, a experiência de dor incorpora componentes sensoriais, com importantes influências pessoais, emocionais e ambientais. Em estudos clínicos e experimentais faz-se necessária, portanto, a distinção entre a dor percebida ou relatada e a simples resposta ao dano tecidual (KANDEL et al., 2003). Ainda segundo a IASP (1994) o termo nocicepção se refere somente ao “processo neural de codificação de estímulos nocivos”, ou seja, à percepção do estímulo nociceptivo no sistema nervoso central, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido lesado. Assim, termos como dor e analgesia são adotados para humanos e os termos nocicepção e antinocicepção, para modelos animais (JONES, 1992).

1.2.1 Transmissão ascendente da dor

De maneira geral, o mecanismo de transmissão ascendente da dor compreende quatro fases: transdução, transmissão, percepção e modulação (PORTO, 2004). A transdução corresponde à ativação dos nociceptores, sendo estes neurônios sensoriais primários ativados por estímulos capazes de causar dano tecidual (SHERRINGTON, 1906). Em 1967, 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 moderado ou o toque leve (BURGESS & PERL, 1967).

As fibras sensitivas que inervam a região do corpo e da cabeça têm seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios trigeminiais, respectivamente. Tais fibras podem ser categorizadas em três principais grupos (Figura 3):

- Fibras $A\alpha$ e $A\beta$ 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 $A\beta$, também, apresentam propriedade nociceptiva (LAWSON, 2002);
- Fibras $A\delta$ 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 lenta o estímulo nociceptivo (BASBAUM & JESSELL, 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).

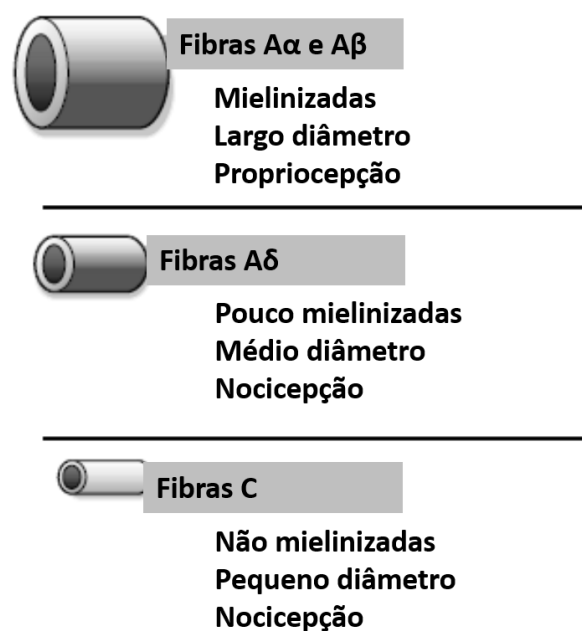


Figura 3: Tipos de fibras sensitivas. $A\alpha$, β são fibras mielínicas de largo e médio diâmetro, $A\delta$ são fibras mielínicas de pequeno diâmetro e a fibra C tem pequeno diâmetro, sendo amielinizada (modificado de JULIUS & BASBAUM, 2001).

A transmissão nociceptiva compreende uma série de eventos que possibilitam a chegada do potencial de ação gerado no nociceptor ao sistema nervoso central (KANDEL, 2000). Assim, as fibras aferentes nociceptivas primárias, provenientes da pele ou de órgãos internos, dirigem-se ao corno dorsal da medula espinhal, atingindo as lâminas superficiais (I e II) e as profundas (IV e V). 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 constitui a mais importante região responsável pela integração e modulação 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).

A perda de nocicepção, como em doenças hereditárias associadas com insensibilidade congênita à dor (COX et al., 2006), conduz à lesão repetida e auto-mutilação inadvertida, ilustrando a importante função adaptativa da dor nociceptiva. Segundo Cox e colaboradores (2006), mutações no gene que codifica a sub-unidade α dos canais para sódio voltagem dependentes, $Na_v1.7$, levam à 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 inabilidade de percepção da dor.

Os canais para sódio sensíveis à voltagem (VGSCs) são os pivôs da eletro-excitabilidade celular, pois eles promovem a entrada rápida das correntes transientes de sódio (Na^+) durante a fase de despolarização do potencial de ação. Os canais para Na^+ são glicoproteínas complexas que consistem de uma subunidade α , de 220-260 kDa, associada a uma ou duas subunidades β auxiliares de 30-40 kDa ($\beta 1$ - $\beta 4$) (Figura 4). As subunidades β são compostas de um único

segmento transmembrana, uma porção C-terminal intracelular de cadeia curta e uma porção N-terminal extracelular de cadeia longa a qual é estruturalmente similar às cadeias variáveis das imunoglobulinas (CATTERALL, 2012). Os canais para sódio dos subtipos $Na_v1.1$, 1.2, 1.3 e 1.6 são principalmente encontrados no sistema nervoso central. $Na_v1.7$, 1.8 e 1.9 são os canais para sódio primários no sistema nervoso central. $Na_v1.4$ é o canal para sódio primário no músculo esquelético, enquanto $Na_v1.5$ é o primário do coração. Muitos desses canais possuem também níveis de expressão significativos fora dos seus tecidos primários (CATTERALL, 2012).

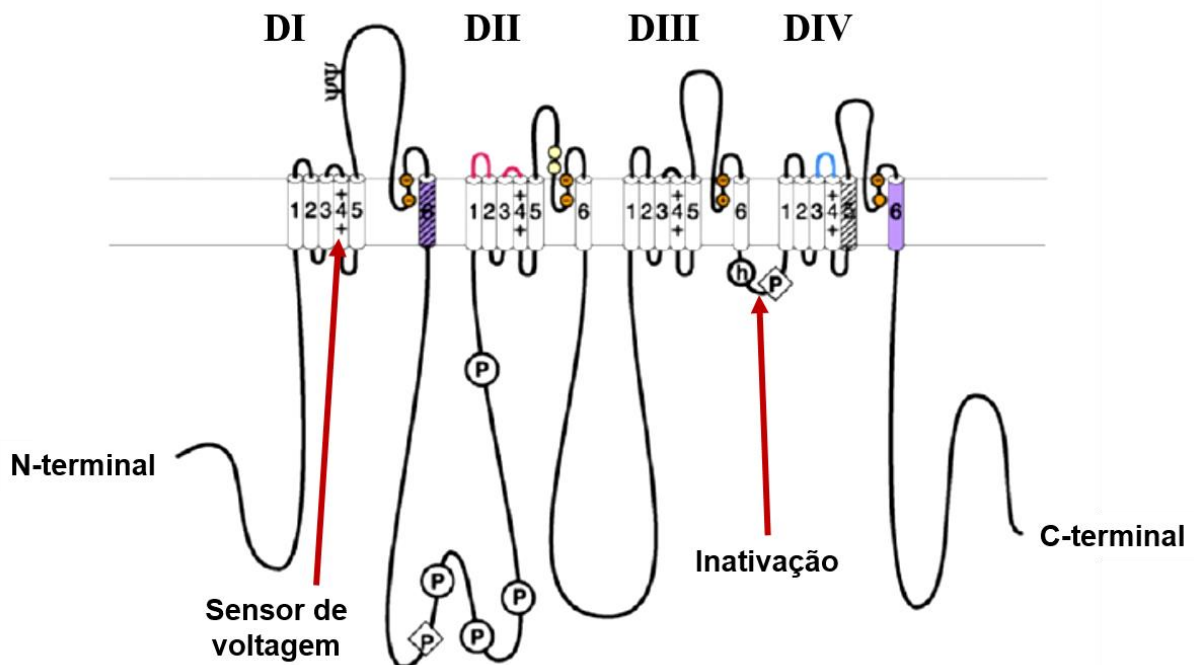


Figura 4: Estrutura dos canais para sódio sensíveis a voltagem. Representação esquemática da subunidade α do canal. Os algarismos romanos indicam os domínios homólogos (DI – DIV). Destaca-se as cargas positivas dos segmentos S4 e a comporta de inativação do canal (modificado de CATTERALL, 2007).

A subunidade α é composta por quatro repetições homólogas (não idênticas), os domínios DI – DIV, conectadas por três grandes alças citoplasmáticas. As quatro repetições estruturam-se no sentido horário, no qual os domínios DI e DIV são posicionados em proximidade de maneira

a circundar a via de condução do íon Na^+ . Cada uma das quatro repetições consiste em 6 segmentos putativos de α -hélicos transmembranares (S1-S6). Os quatro primeiros segmentos (S1-S4) compreendem o domínio do sensor de voltagem; com aminoácidos carregados positivamente (Arg ou Lys) altamente conservados, posicionados a cada terceira posição do segmento S4, sendo fundamentais para a funcionalidade do canal (Figura 4) (CATTERALL, 2012). Foi recentemente demonstrado que os quatro motivos S3b e S4 (*paddle motif*) são “módulos portáteis” que podem ser inseridos em canais para potássio ($\text{K}_v2.1$) (Figura 5), mantendo sua funcionalidade (BOSMANS, MARTIN-EAUCCLAIRE et al., 2008; SWARTZ, 2008; BOSMANS & SWARTZ, 2010). Os resultados revelaram que cada motivo S3b pode interagir com toxinas advindas de peçonhas de aranhas e escorpiões, estabilizando os sensores de voltagem em conformações específicas. Entretanto, também se admite que essas toxinas possam interagir com regiões como os *loops* entre S1-S2 ou entre S5-S6.



Figura 5: Representações da estrutura do domínio S1-S4 de KvAP. com “*paddle motif*”, formado pelos segmentos S3b e S4, representado em vermelho (Protein Data Bank - código de acesso: 1ORS, modificado em PyMOL).

Posteriormente, foi demonstrado que peptídeos desenvolvidos a partir da sequência de aminoácidos constituinte dos motivos *paddle* do sensor de voltagem do domínio IV de rNav1.2 eram capazes de se ligarem à α toxina clássica, AaHII, mantendo assim sua funcionalidade, mesmo dissociado do canal (MARTIN-EUCLAIRE et al., 2015).

Diante da importância dos canais para sódio na transmissão nervosa, incluindo nos processos dolorosos, e da necessidade de se buscar moléculas capazes de se ligarem seletivamente à esses canais, a possibilidade de testar toxinas e outras moléculas em peptídeos que mimetizem o motivo *paddle* em sistema de ressonância plasmônica de superfície (SPR) se torna extremamente relevante. Pode-se, por exemplo, buscar entender melhor a interação destes ligantes com os canais para sódio, bem como seus mecanismos de ação, se detectada alguma interação com estes motivos moleculares.

1.2.2 Sistemas de modulação endógenos da dor

A existência de um sistema específico para modulação da dor foi pela primeira vez proposta por Melzack & Wall (1965) na “teoria do portão espinhal da dor” que sugeriu que o impulso aferente sofre atuação de sistemas moduladores antes que a percepção dolorosa seja evocada. Segundo essa teoria, a região da medula inervada pelas fibras aferentes contém interneurônios inibitórios, que são ativados pelas fibras motoras A β (inibindo a transmissão do impulso nociceptivo) e inibidos pelas fibras nociceptivas A δ e C (facilitando a transmissão do impulso nervoso que chega até a medula).

Além da modulação medular da via nociceptiva, em 1969, Reynolds descreveu a realização de intervenções cirúrgicas em ratos, nas quais a analgesia era obtida por estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP). Assim, iniciou-se a descrição das influências supra-espinais no controle da dor, a via descendente. Partindo de estruturas supra-espinais para a

medula, esta via pode suprimir (inibição descendente) ou facilitar (facilitação descendente) a condução do estímulo nocivo (MILLAN, 2002). As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (MRV), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas, no corno dorsal da medula espinhal (Figura 6) (MILLAN, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

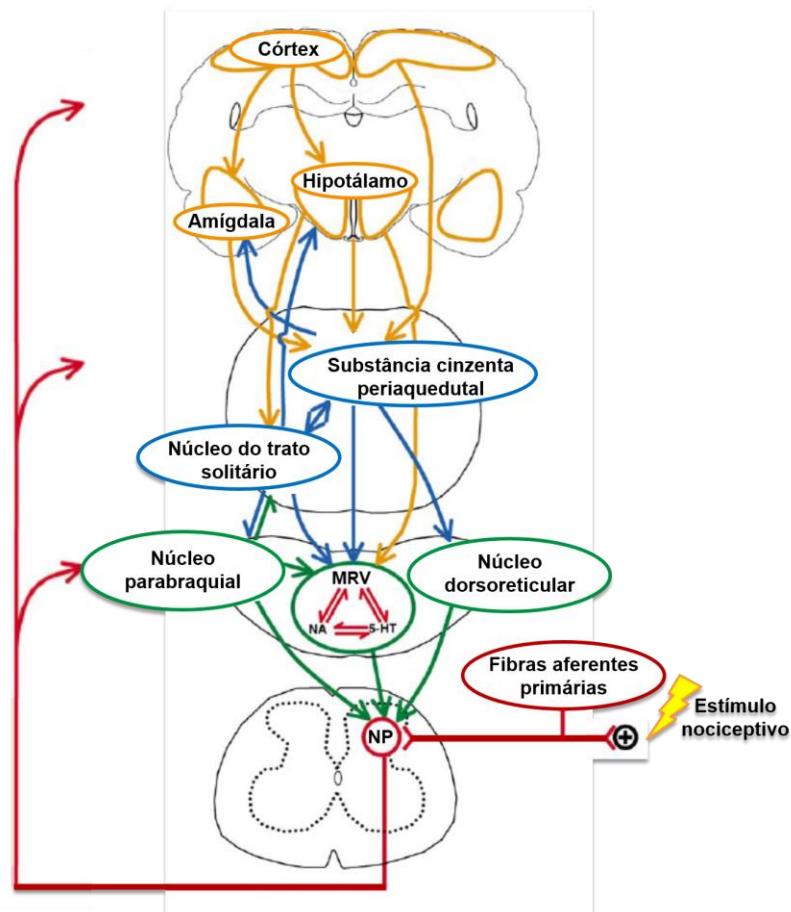


Figura 6: Esquema da integração entre as estruturas cerebrais envolvidas na inibição e modulação das vias de controle descendente da informação nociceptiva. Observe a localização estratégica da substância cinzenta periaquedutal e a natureza recíproca de varias vias interconectadas. MRV medula rostroventral; NA: noradrenérgicos; 5-HT: serotoninérgico; NP: neurônios de projeção (modificado de MILLAN, 2002).

Além dos sistemas centrais de modulação da dor, sistemas endógenos periféricos têm sido descritos. Demonstrou-se, por exemplo, que a administração periférica do inibidor de óxido nítrico sintase (NG-Nitro-L-arginine) é capaz de potencializar de maneira dose dependente a hiperalgesia evocada por carragenina (ALVES et al., 2013). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a administração intraplantar de azul de metileno, um inibidor da guanilil ciclase solúvel, é capaz de reduzir ainda mais o limiar nociceptivo dos animais na hiperalgesia induzida por carragenina, mostrando que via L-arginina/NO/cGMP funciona como um modulador endógeno da hiperalgesia inflamatória. Também já foi demonstrada a participação do sistema colinérgico na analgesia periférica, uma vez que o antagonismo do sistema colinérgico ocasionou uma redução ainda maior no limiar hiperalgésico induzido pela carragenina (MOTTA et al., 2011).

Além das vias colinérgicas e vias que envolvem o óxido nítrico (NO), as vias opioidérgicas e canabioideérgicas estão intimamente envolvidas na modulação periférica da dor. Pacheco e colaboradores (2005) observaram que o agonismo dos receptores δ opioide, na pata dos ratos, era capaz de elevar o limiar nociceptivo dos animais hiperalgésicos pela administração intraplantar de PGE₂. Em elegante trabalho, Zambelli e colaboradores demonstraram o aumento dos níveis de expressão dos receptores μ e κ opioides nos gânglios da raiz dorsal (DRGs) e no tecido plantar dos ratos, após a administração intraplantar de PGE₂ (ZAMBELLI et al., 2014), evidenciando a participação do sistema opioide na modulação periférica. A inter-relação existente entre o sistema opioide e canabinoide tem sido elucidada. A utilização dos antagonistas canabinoideérgicos AM251 e AM630 provocou a redução da antinocicepção evocada pela morfina, evidenciando o envolvimento de endocanabinóides, na antinocicepção periférica induzida pelo agonista μ opioide (PACHECO et al. 2008). Diante da complexidade que envolve a modulação endógena da dor, tanto centralmente quanto periféricamente, é de extrema

relevância aprofundar as pesquisas sobre os mecanismos de ação de moléculas analgésicas, sem deixar de considerar o envolvimento e inter-relação das diversas vias.

1.2.2.1 Via dos opioides

O termo opióide foi inicialmente proposto por Acheson, para designar as drogas com ação semelhante à da morfina, porém com estrutura química diferente. Atualmente o termo opioide refere-se a substâncias naturais, semi-sintéticas, sintéticas ou endógenas que atuam diretamente nos receptores opioides, podendo ser tanto agonistas quanto antagonistas (MARTIN, 1983). Apesar dos estudos relativamente recentes, a utilização de opioides remonta à períodos históricos muito antigos. Registros Egípcios, datados de 1552 a.C., descrevem uma mistura de substâncias, entre essas o ópio, que era utilizada com eficiência para a sedação de crianças (COHEN, 1969). O ópio é um opioide natural, extraído da papoula (*Papaver somniferum*), e dessa substância se originou a denominação da classe farmacológica dos opioides. Atualmente são caracterizados diversos opioides endógenos, sendo os principais: encefalinas, β -endorfinas, dinorfinas, endomorfina (WALDHOER et al., 2004) e as orfaninas FQ, também conhecidas como nociceptinas (MEUNIER et al., 1995).

Opioides endógenos podem se originar da mesma ou de diferentes proteínas precursoras. Todos os peptídeos opióides de mamíferos são derivados de três precursores, pro-opiomelanocortina, pro-encefalina e pro-dinorfina, que são traduzidos de diferentes genes (HÖLLT, 1992). No que concerne à afinidade deste endo-opioides pelos receptores temos: β -endorfina, com maior afinidade pelos receptores μ e δ -opioides; encefalina, com maior afinidade pelos receptores δ -opioides; endomorfina, com maior afinidade pelos receptores μ -opioides; dinorfinas, com afinidade por receptores κ -opioides; e orfanina FQ, com maior afinidade pelos receptores de nociceptina (GOLDSTEIN & NAIDU, 1989; ZAVERI et al., 2001).

Os receptores opioides apresentam em sua estrutura sete domínios transmembrana, sendo a porção N-terminal extracelular, com múltiplos pontos de glicosilação, já a porção C-terminal é intracelular (LAW et al., 2000). Os principais subtipos de receptores opioides são: μ , δ , κ e o receptor de nociceptina, também conhecido como receptor para orfanina FQ (WALDHOER et al., 2004). Resultados dos estudos de ligação aos receptores farmacológicos, fisiológicos e opióides indicam a presença de receptores ϵ -opióides, sendo esses distintos dos receptores μ -, δ - ou κ . Este receptor é estimulado na região supra-espinhal pelo peptídeo opióide endógeno β -endorfina (TSENG, 2001). Utilizando o método de retirada da cauda submetida a estímulo térmico, observou-se que a antinocicepção induzida pela β -endorfina, administrada intracerebroventricularmente (i.c.v.) em camundongos, não foi bloqueada pelo pré-tratamento com os antagonistas dos receptores μ -, δ - e κ -opióides (TSENG, 1995). Estudos de ligação ao receptor empregando $[3H]$ β -endorfina e $[3H]$ etilcetociclazocina fornecem evidências bioquímicas que suportam a presença de receptores ϵ -opióides no cérebro (NOCK, 1995). Apesar dos achados farmacológicos a caracterização do receptor ϵ , ainda, permanece controversa.

Os receptores opioides pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G, e são correspondentes aos receptores da subfamília Gi/Go. Como outros receptores que utilizam os membros da subfamília Gi para transdução do sinal, os receptores opioides inibem a atividade da adenilato ciclase (SHARMA et al., 1977), diminuindo os níveis de 3'5'adenosina-monofosfato cíclico (AMPC), e conseqüentemente, diminuindo a ativação da proteína cinase A (Figura 7).

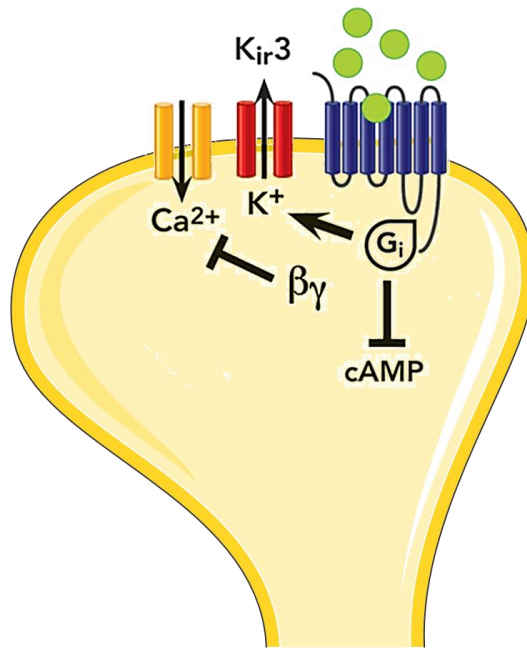


Figura 7: Resumo da sinalização do receptor opióide. A Figura ilustra a transdução do receptor opióide. Em geral, todos os quatro subtipos de receptores opióides partilham estas vias comuns. As setas referem-se a etapas de ativação; as linhas T referem-se ao bloqueio ou inibição da função. $\beta\gamma$: Subunidade $\beta - \gamma$ da proteína G; cAMP: adenosina monofosfato cíclica (modificado de HASANI, et al., 2011).

A ativação destes receptores leva à modulação dos canais para cálcio pré- e pós-sinápticos, suprimindo o influxo de cálcio extracelular, pela inibição das correntes dos canais para cálcio voltagem dependentes, dos tipos N e P/Q (HESCHELER et al., 1987; RHIM & MILLER, 1994). Nesse processo ocorre, também, a estimulação para abertura dos canais para potássio (NORTH et al., 1987). A ativação dos receptores opioides também provoca inibição de canais para sódio (GOLD & LEVINE, 1996), canais para cátion dependentes de voltagem (INGRAM & WILLIAMS, 1994), canais iônicos receptores de potenciais transitórios vanilóides-1 (TRPV1) (ENDRES-BECKER et al., 2007) e canais iônicos dependentes de ácido (ASICs) em neurônios DRG (CAI et al., 2014). Todos estes sinais juntos levam à diminuição da excitabilidade celular e por consequência, diminuição da liberação de neurotransmissores. Esse mecanismo está intimamente associado à indução de analgesia.

Após a identificação das propriedades únicas dos opióides, especialmente a sua eficácia na produção de analgesia, muitos opióides exógenos foram sinteticamente desenvolvidos para melhorar suas propriedades, são exemplos: Metadona, Morfina e Fentanil (FENG et al., 2012).

1.2.2.2 Via dos canabinoides

A pesquisa envolvendo canabinoides teve início com os estudos sobre os efeitos terapêuticos da *Cannabis sativa*, planta cujas propriedades medicinais já eram descritas na farmacopeia Chinesa, desde os anos 200 (RUSSO, 2005). Apesar de sua utilização milenar, o valor terapêutico da cannabis foi avaliado, cientificamente, pela primeira vez pelos trabalhos de Sir William B. O'Shaughnessy, um médico irlandês que trabalhava em Calcutá. Seu trabalho demonstrou a aparente utilidade clínica da cannabis em vários distúrbios, incluindo cólera, doenças reumáticas e convulsões infantis (O'SHAUGHNESSY, 1840).

Os estudos recentes sobre canabinoides partiram da purificação e caracterização dos princípios ativos da cannabis. Em um trabalho pioneiro, Thomas Wood e colaboradores isolaram o Cannabinol, e Robert Cahn elucidou a maior parte de sua estrutura (JACOB & TODD, 1940). Esta descoberta abriu o caminho para o isolamento, caracterização e síntese química completa de importantes membros desta família. Dentre estes o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o principal composto psicoativo da cannabis (GAONI & MECHOULAM, 1964) e o Canabidiol que, terapêuticamente, pode ser ainda mais promissor do que THC (PERTWEE, 2004).

A primeira evidência da existência de receptores canabinoides ocorreu através da utilização de um agonista canabinoide sintético radiomarcado. Assim, foi possível observar que este agonista se ligava em pontos específicos da membrana citoplasmática do cérebro de ratos, o que se correlacionava com a inibição *in vitro*, da adenilato ciclase e o efeito analgésico do composto, observado nos ensaios *in vivo* (DEVANE et al., 1988).

Acreditando que esses receptores eram ativados por agonistas endógenos Raphael Mechoulam e seu grupo, buscaram isolar e caracterizar esses endocanabinoides. Posteriormente foi purificado o primeiro ligante endógeno, o endocanabinoide N-araquidonoil etanolamina, nomeado anandamida (DEVANE et al., 1992), essa causava os mesmos efeitos que o THC, quando injetada em ratos. A anandamida é capaz de se ligar aos receptores CB₁ e CB₂ (GLASS E NORTHUP, 1999), tendo uma afinidade quatro vezes maior pelo primeiro (FELDER et al., 1995). O segundo endocanabinoide identificado foi o 2-araquidonoil glicerol (2-AG), esse foi descoberto independentemente, em 1995, por dois grupos de pesquisa distintos (MECHOULAM et al., 1995; SUGIURA et al., 1995). Os efeitos do 2-AG se relacionam à função imune, proliferação celular, desenvolvimento embrionário, neuroproteção e neuromodulação, função cardiovascular e respostas inflamatórias (SUGIURA E WAKU, 2000). A partir do isolamento deste dois endocanabinoides vários outros compostos que atuam sobre receptores canabinoides foram descobertos (HANUS et al., 2001; PORTER et al., 2002; HUANG et al., 2002).

A biossíntese da anandamida ocorre pela hidrólise do precursor lipídico N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE), gerado a partir do ácido araquidônico encontrado na membrana plasmática, sendo sua hidrólise catalisada pela enzima fosfolipase D (SCHMID et al., 1983; DI MARZO et al., 1994; CADAS et al., 1997). A síntese do endocanabinoide 2-AG se dá pela clivagem do diacilglicerol (DAG) catalisada pela enzima diacilglicerol lipase (BISOGLNO et al., 2005). Os endocanabinoides são sintetizados mediante demanda, em resposta à despolarização induzida pelo aumento da concentração de cálcio intracelular ou ativação de receptores metabotrópicos (VARMA et al., 2001; KIM et al., 2002; WITTING et al., 2004; DI et al., 2005).

Os dois tipos de receptores canabinoides identificados até o momento são o CB₁ (MATSUDA et al., 1990) e o CB₂ (MUNRO et al., 1993). O receptor do primeiro tipo, CB₁, é o mais expresso em todo o corpo, sendo possivelmente o receptor metabotrópico mais abundante

no cérebro de mamíferos (HERKENHAM et al., 1990; HOHMANN et al., 1999) e se encontra, também, expresso no sistema nervoso periférico (FOX et al., 2001). Já foram encontradas duas variantes deste receptor, CB_{1A} (SHIRE et al., 1995) e CB_{1B} (RYBERG et al., 2005), ambas com alterações na porção N-terminal de suas cadeias polipeptídicas. Os receptores CB₁, predominantemente pré-sinápticos, são os principais alvos para o controle da dor via endocanabinoides e canabinoides exógenos (AGARWAL et al., 2007). Os receptores do tipo CB₂ são mais comumente encontrados em tecidos linfóides e células do sistema imune, sendo importantes para a supressão da dor e a mediação de processos inflamatórios (MACKIE, 2006).

Assim como os receptores opioides, os receptores CB₁ e CB₂ são acoplados à proteína Gi/o (LUTZ, 2002). Sua ativação, de maneira geral, leva à inativação da atividade da adenilato ciclase, embora também, já tenha sido descrito que os canabinoides são capazes de estimular as isoformas 2, 4 ou 7 desta mesma enzima (RHEE et al., 1998). A ativação da via dos canabinoides também pode levar à inibição de diferentes tipos de canais para cálcio (MACKIE & HILLE, 1992; GEBREMEDHIN et al., 1999), ativação de determinados canais para potássio (MACKIE et al., 1995), bem como interferir na cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAP) (WARTMANN et al., 1995) e ativar a via da 3-fosfatidilinositol cinase (GÓMEZ DEL PULGAR et al., 2002). De maneira geral, os sinais gerados levam à diminuição da excitabilidade celular e ao bloqueio da transmissão do estímulo nociceptivo.

Os medicamentos canabinoides atualmente utilizados para o controle da dor são ainda, baseados nos princípios ativos da *Cannabis sativa*, como o Cannador® e o Sativex® (RUSSO, 2008).

1.3 TOXINAS COM AÇÃO ANTINOCICEPTIVA

A utilização de toxinas animais como modelos para a formulação de novos compostos analgésicos é uma realidade. O Ziconotide (Prialt®) é um fármaco analgésico sintético, não opióide, derivado da ω -conotoxina MVIIA, um peptídeo isolado da peçonha do molusco marinho *Conus magus*. Os efeitos farmacológicos do Ziconotide e o seu mecanismo de ação parecem estar relacionados 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). Nos EUA, a administração intratecal de ziconotide foi aprovada para o tratamento de dor crônica severa, em pacientes para os quais a terapia intratecal é recomendável e para pacientes intolerantes ou refratários a outros tratamentos, como analgésicos sistêmicos, terapias adjuvantes ou mesmo, morfina intratecal (Azur Pharma, Inc. Prialt). No entanto, devido à janela terapêutica estreita e aos efeitos colaterais consideráveis, o ziconotide só é administrado por via intratecal aos pacientes que não responderam a outros tratamentos (SANFORD, 2013).

Várias toxinas purificadas da fração PhTx3 da peçonha de *Phoneutria nigriventer* apresentam atividade antinociceptiva pelo bloqueio de canais para cálcio. Dentre elas, encontra-se a toxina PnTx3-3, potente bloqueadora de canais para cálcio dependentes de voltagem, que gera prolongado efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática, desenvolvido em camundongos (DALMOLIN et al., 2011). A toxina PnTx3-4, purificada da mesma fração, bloqueia canais para cálcio voltagem dependentes, com baixa especificidade (DOS SANTOS et al., 2002) e apresenta efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória e incisional aguda e persistente, ambos em camundongos. Além disso, esta toxina também foi capaz de produzir antinocicepção no teste da formalina e este efeito parece estar relacionado com a redução dos

níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano dos animais (DA SILVA et al., 2015). Outra toxina, 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).

Outros artrópodes podem conter peçonhas que apresentam moléculas com atividade antinociceptivas, um exemplo é a peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*, de onde foi isolado o Agelaia-MPI. Este peptídeo, de 14 resíduos de aminoácidos, quando administrado intracerebroventricularmente em camundongos induziu antinocicepção, no teste da placa quente. A maior dose testada (6,4 nmol) apresentou efeito antinociceptivo com duração de três dias e este efeito pode estar relacionado ao bloqueio das correntes de sódio em canais para sódio voltagem dependentes (GONÇALVES et al., 2016).

Algumas toxinas isoladas de peçonhas de escorpiões, como a α anatoxina AmmVIII (um fraco modulador de canais para sódio $Na_v1.2$) e a LqIT2 (uma β insetotoxina), causam antinocicepção quando administradas por via intraperitoneal, em camundongos. Foi sugerido que a ação antinociceptiva destas toxinas envolve a participação do sistema opioide endógeno, uma vez que a co-administração do antagonista opioide, naloxona, reverteu parcialmente os efeitos analgésicos observados (MARTIN-EAUCLAIRE, et al., 2010).

Os sistemas opioide e canabinoide participam da modulação nociceptiva em vários níveis e tem sido demonstrado que esses sistemas podem estar envolvidos na atividade antinociceptiva de toxinas e peptídeos. Exemplo deste fato é a Crotalfina, peptídeo com propriedades analgésicas, similar à toxina isolada da peçonha da cascavel Sul Americana *Crotalus durissus terrificus*, que tem seu efeito antinociceptivo mediado pela liberação periférica de Dinorfina A, um agonista endógeno de receptores κ , sendo esta liberação dependente da ativação dos receptores canabinoides do tipo CB_2 (MACHADO et al., 2014).

Recentemente, nosso grupo mostrou que o peptídeo sintético, PnPP19, um análogo sintético, derivado da toxina PnTx2-6, da peçonha de *Phoneutria nigriventer*, apresenta efeito antinociceptivo periférico e central, em ratos (FREITAS et al., 2016; PACHECO et al, 2016), mediado pelos receptores opioides μ e δ , e pelos canabinoides CB₁. Este peptídeo inibe uma endopeptidase neuronal, responsável pela clivagem do opioide endógeno encefalina e os autores sugerem que esta inibição pode relacionar-se ao efeito antinociceptivo do peptídeo (FREITAS, et al., 2016).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A sensação de dor é uma das maiores causas de busca por auxílio médico no mundo (DROES, 2003). Cerca de 70 % dos pacientes que buscam atendimento médico se queixam de algum tipo de dor, sendo esse sintoma responsável por um terço dos atendimentos médicos realizados no Brasil (ROCHA et al., 2007). Neste contexto, a busca por novos agentes terapêuticos que atuem nas vias nociceptivas é crescente e de grande interesse, visto que, muitos dos compostos analgésicos existentes apresentam efeitos colaterais e ineficácia no tratamento de determinados tipos de dor.

Em estudo realizado durante meu mestrado, demonstramos que a toxina PnTx4(6-1) apresenta atividade antinociceptiva em três modelos de dor: inflamatória, neuropática e nociceptiva. Verificamos ainda que, neste último modelo, a atividade antinociceptiva da toxina envolve os sistemas opioide e canabinoide (EMERICH et al., 2016). Um dos grandes problemas enfrentados na caracterização bioquímica e no estudo do modo de ação de toxinas presentes em peçonhas é a dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de material purificado a partir dos mesmos. Nesse contexto, a síntese química é uma técnica adequada para a geração de diferentes peptídeos derivados de toxinas nativas e abre novas perspectivas para os estudos de caracterização farmacológica e otimização destas moléculas. Com o intuito de reproduzir, ou mesmo de potencializar o efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e de diminuir o tamanho da molécula original (tornando mais fácil e econômica a sua síntese), propôs-se a síntese de um peptídeo a partir de estudos preditivos, baseando-se na sequência de aminoácidos desta toxina, bem como de outras toxinas inseticidas de *Phoneutria nigriventer*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Proposição, síntese e testes farmacológicos de um peptídeo, bioinspirado nas sequências das toxinas antinociceptivas do grupo PhTx4, da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, que reproduza a atividade antinociceptiva da toxina PnTx4(6-1).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor um modelo de peptídeo, a partir de estudos de bioinformática, levando-se em consideração a estrutura primária de toxinas inseticidas e antinociceptivas da fração PhTx4 da peçonha de *Phoneutria nigriventer*;
- Sintetizar e purificar o peptídeo proposto;
- Avaliar a ação antinociceptiva do peptídeo sintetizado, utilizando-se modelo de nocicepção *in vivo*;
- Uma vez detectado o efeito antinociceptivo, investigar o mecanismo de ação do peptídeo; tanto *in vivo* quanto *in vitro*.
- Avaliar a ação insetotóxica do peptídeo quando administrado em insetos.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROPOSIÇÃO E SÍNTESE DO PEPTÍDEO A SER AVALIADO NOS TESTES NOCICEPTIVOS

Para proposição do novo peptídeo foram comparadas as sequências de aminoácidos de três toxinas do grupo PhTx4: PnTx4(6-1), PnTx4(5-5) e PnTx4-3, obtidas da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Observou-se que a região mais conservada entre as três toxinas está compreendida entre os resíduos 21 e 33. Devido às dificuldades de se conseguir estabelecer a estrutura tridimensional dessas toxinas, o que seria de grande valia para a proposição de um peptídeo com características mais bem delineadas, foi utilizada a ferramenta de predição de epitopos, disponível no site “Immune Epitope Database and Analysis Resource” (www.iedb.org). Utilizando-se a ferramenta para predição dos resíduos mais expostos na sequência de aminoácidos de PnTx4(6-1), observamos que os resíduos de aminoácidos 24 ao 30, foram considerados mais expostos. Como a região mais conservada nas sequências de aminoácidos das três toxinas foi coincidente com a predição dos resíduos expostos em PnTx4(6-1), substituímos os resíduos de cisteína mais internos da sequência (em vermelho) CD**C**YWSKS**C**KCRE por resíduos de serina. Assim, propôs-se o peptídeo que possui a seguinte sequência de aminoácidos: H-CDSYWSKSSKCRE-NH₂. Tal peptídeo foi denominado Pep13, em referência ao número de resíduos de aminoácidos do mesmo. Pep13 foi sintetizado utilizando-se a estratégia Fmoc de síntese manual em fase sólida (CHAN & WHITE, 2000) no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Esse peptídeo foi sintetizado com o resíduo C-terminal protegido por amidação. A resina Rink Amide (grau de substituição: 0,68 mmol. g⁻¹) foi utilizada como suporte sólido para a síntese. A síntese foi realizada nas seguintes etapas: desproteção, lavagem e

acoplamento. Para a desproteção foi utilizada solução de 20 % de 4-metil piperidina em dimetilformamida (DMF), para a lavagem entre os processos, foram utilizados 5 mL de DMF, 5 mL de isopropanol (IPA) e 5 mL de diclorometano (DCM) e para o acoplamento foi utilizada solução de 2 mL de DMF destilado, 1 mL de DCM, 100 µL de 1,3-diisopropilcarbodimida (DIC), 97 mg de 1H-hidroxibenzotriazola (HOBt) e 4 x o excesso molar do Fmoc-aminoácido correspondente. Na etapa de acoplamento, a mistura de resina e Fmoc-aminoácido foi incubada por três horas, sob agitação constante a 240 rpm (Infrared Vortex Mixer, VELP SCIENTIFICA®). As duas etapas iniciais (desproteção e acoplamento) foram repetidas sucessivamente, até a adição do último derivado Fmoc-aminoácido. Para detectar a presença de aminas livres na cadeia peptídica realizou-se o teste de Kaise (ninhidrina) (CHAN & WHITE, 2000). O peptídeo foi então clivado da resina pela remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, a desproteção e a clivagem foram realizadas em uma solução de 94 % de ácido trifluoroacético (TFA); 2,5 % de H₂O; 2,5 % de etanoditiol (EDT); 1 % de tri-isopropil-silano (TIS). Posteriormente, o TFA foi removido, borbulhando-se N₂ dentro do tubo de reação. O produto da síntese foi precipitado por centrifugação, por 5 minutos a 4000 rpm, em éter diisopropílico a 0 °C, esse processo foi repetido 4 vezes. O restante do éter foi removido, borbulhando-se N₂. Posteriormente o produto de síntese foi liofilizado.

4.2 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO

O peptídeo sintético foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, em coluna semipreparativa Discovery® BIO Wide Pore C8 (Supelco), utilizando-se o equipamento Shimadzu SPD- 10^a. A coluna foi equilibrada com solução de 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA)/água e a eluição foi realizada com um gradiente descontínuo de 0,1 % trifluoroacético/acetoneitrila (ACN) segundo o programa: 0 a 15 % de ACN, em 4 minutos; de 15

a 27 % de ACN, em 27 minutos e 27 a 100 % ACN, em 4 minutos. A cromatografia foi monitorada à 214 nm, as frações foram eluídas em um fluxo de 5 mL/min e coletadas manualmente.

4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA

As frações eluídas da cromatografia foram analisadas por espectrometria de massa no equipamento AutoFlex III (Bruker Daltonics). O aparelho foi operado em modo positivo, controlado pelo software FlexControl 3.1 (Bruker Daltonics). Amostras foram homogeneizadas em solução supersaturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:1 v/v) diretamente em placas MTP AnchorChip 400/384 (Bruker Daltonics) e polimerizadas à temperatura ambiente. Para a determinação da massa monoisotópica de moléculas com massas entre 750 – 4000 Da, foi empregado o modo refletido com calibração externa, utilizando-se o padrão de calibração de peptídeos Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics). Para a confirmação da sequência peptídica, a fração correspondente ao peptídeo de interesse foi submetida à fragmentação, por pulsos de laser de alta energia, e detecção pelo modo refletido positivo. Na fragmentação de uma cadeia polipeptídica, a diferença entre picos adjacentes identifica o resíduo de aminoácido que foi perdido em cada caso, revelando então a sequência do peptídeo investigado. Os fragmentos obtidos podem ser formados pela clivagem a partir do N-terminal (íons b) ou do C-terminal (íons y), dependendo da localização da carga no fragmento molecular (JONSSON, 2001). No nosso caso, a sequência foi obtida pela obtenção dos íons y, as massas moleculares dos fragmentos foram obtidas no intervalo de 40 a 1578 Da. Os resultados foram visualizados utilizando-se o software FlexAnalysis 3.1 (Bruker Daltonics).

4.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR

A estimativa da concentração molar do peptídeo foi realizada de acordo com Schid (2001), aplicando-se a fórmula da Lei de Lambert-Beer: $A = \epsilon cl$, sendo ϵ : o coeficiente de extinção molar do peptídeo, A : o valor da absorvância a 280 nm, c : a concentração molar e l : o caminho óptico de 1 cm. Após a determinação da concentração molar, o peptídeo foi alíquotado em tubos “protein LoBind”, liofilizados e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Nos experimentos destinados a avaliar a nocicepção 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 (22 a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à ração e água. Após os experimentos, todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 . Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados (ZIMMERMANN, 1983). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Utilização Animal da UFMG (CEUA, protocolo 102 / 2012).

4.6 DROGAS E REAGENTES

Os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico. Os solventes utilizados nas cromatografias foram preparados com reagentes das marcas Sigma, Aldrich e todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q Gradient da Millipore e deaeradas utilizando-se sistema de ultrassom acoplado à bomba de vácuo.

A Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Enzo, Life Sciences, EUA) foi administrada por via subcutânea, na superfície plantar da pata posterior direita dos ratos. PGE₂ foi mantida a -20 °C, em solução estoque (1 µg/µL), dissolvida em etanol 100 %. No momento do 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 %.

Naloxona (Sigma, EUA), antagonista opioide não seletivo, foi mantido a -20 °C diluído em solução salina fisiológica (0,9 % de NaCl) na concentração de 10 µg/µL. Antes das administrações, a solução contendo naloxona era diluída em salina fisiológica nas concentrações desejadas.

AM251 (1-(2,4-diclorofenil)-5-(iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazol-3-carboxamida) (Tocris, EUA), antagonista CB₁, foi mantido a -20 °C diluído em solução salina fisiológica (0,9 % de NaCl) acrescido de 12 % de DMSO (dimetil sulfóxido) na concentração de 10 µg/µL. Antes das administrações, a solução contendo AM251 era diluída em salina fisiológica (12 % de DMSO) nas concentrações desejadas.

AM630 ([6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4etoxifenil) metanona) (Tocris, EUA), antagonista CB₂, foi mantido a -20 °C diluído em solução salina fisiológica (0,9 % de NaCl) acrescido de 12 % de DMSO na concentração de 20 µg/µL. Antes das administrações, a solução contendo AM630 foi diluída em salina fisiológica (12% de DMSO) na concentração desejada.

MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil-fosfonofluorídrico metil ester) (Tocris, EUA), inibidor da degradação de anandamida, foi mantido a -20 °C, dissolvido em Tocrisolve (emulsão constituída por 1:4 óleo de soja/água), na concentração de 5 µg/µL. Antes das administrações, a solução contendo MAFP foi diluída em salina fisiológica na concentração desejada.

VDM11 [(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida] (Tocris, EUA), bloqueador do recaptador de anandamida, foi mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dissolvido em Tocrisolve, na concentração de $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Antes das administrações, a solução contendo VDM11 foi diluída em salina fisiológica na concentração desejada.

4.7 ADMINISTRAÇÕES DAS DROGAS

4.7.1. Intraplantar

A administração intraplantar (i.pl.) foi realizada por injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior dos ratos, no volume de $100\text{ }\mu\text{L}$ para PGE_2 e $50\text{ }\mu\text{L}$ para Pep13 e antagonistas ou bloqueadores. Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, exceto para o experimento de exclusão do efeito local, no qual ambas as patas receberam PGE_2 (Figura 8).



Figura 8: Administração intraplantar em ratos. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.

4.7.2. Intratecal

Previamente a administração das drogas, os ratos eram tricotomizados na região dorsal (lombar) para facilitar a palpação dos espaços intervertebrais. Após a sedação dos animais por inalação do anestésico 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 foi de 20 µL para todos os tratamentos (Figura 9).

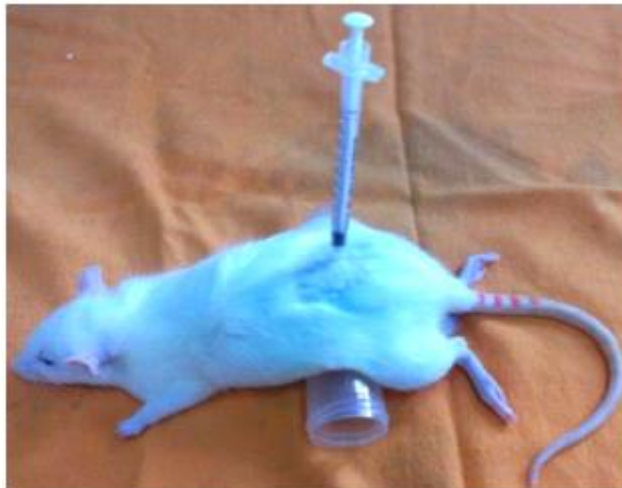


Figura 9: Administração intratecal em ratos. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.

4.8 TESTES NOCICEPTIVOS

4.8.1 Teste de retirada de pata submetida a estímulo mecânico

Para a avaliação do limiar nociceptivo mecânico, foi utilizado o método de retirada da pata, submetida à compressão (RANDALL & SELITTO, 1957). Para tanto, foi utilizado o aparelho algosimétrico (Ugo Basile, Itália) (Figura 10).

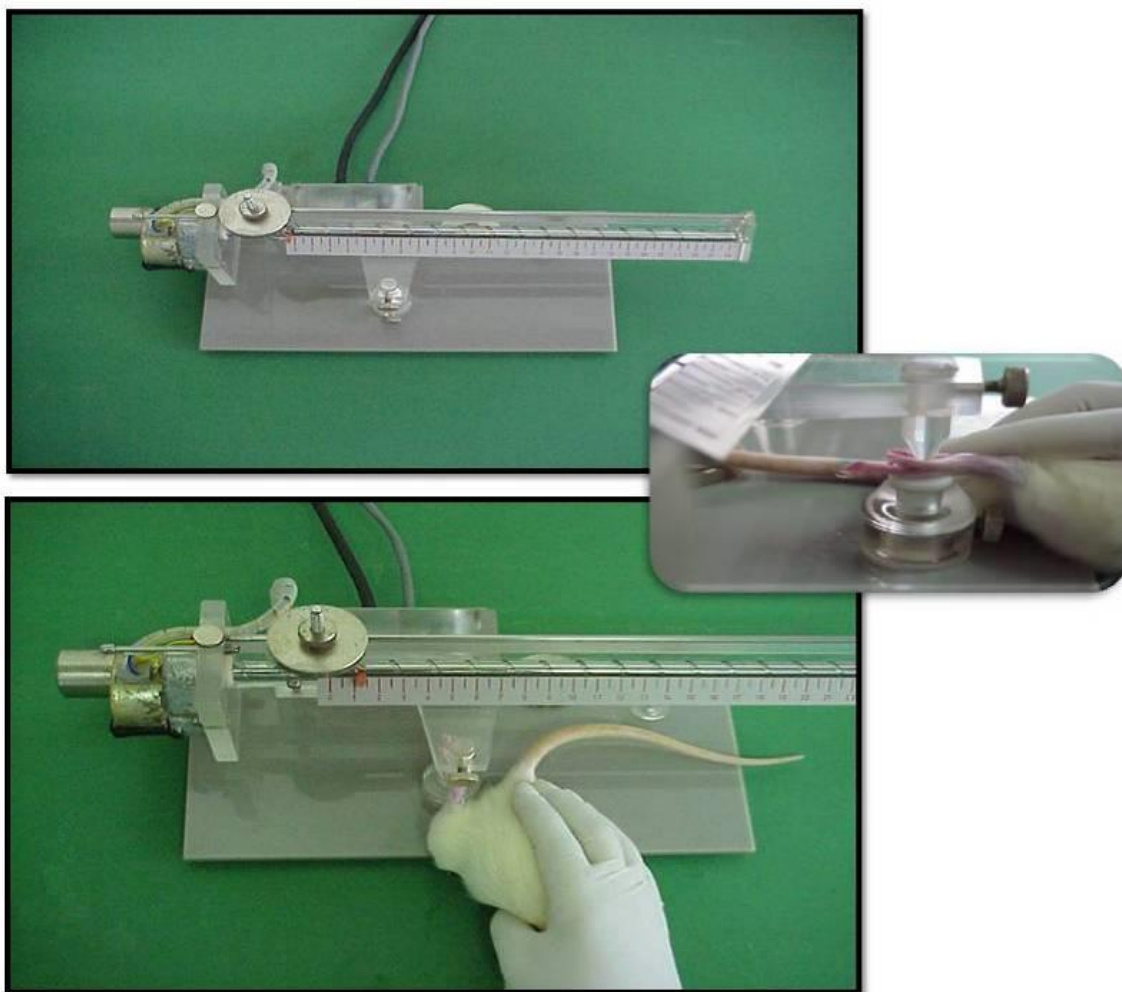


Figura 10 - Aparelho algométrico (Ugo Basile, Itália). Utilizado para aferir o limiar nociceptivo mecânico dos animais. No detalhe o posicionamento do rato e sua pata. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.

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 (Figura 10). 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 reflexo de retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal. Interrompe-se

assim, o aumento da pressão imposta à pata, sendo o último valor registrado, correspondente ao limiar nociceptivo. Esse 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 reflexa de retirada da pata. O instante inicial dessa reação é considerado como resposta nociceptiva. A partir do dia anterior à realização dos experimentos, os ratos eram mantidos na 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 e 17 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, até que este não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é muito importante já que diminui o estresse do animal 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 do animal, quando comparado ao limiar basal, e sua intensidade foi avaliada, pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo mensurado no momento do pico da hiperalgesia provocada pela prostaglandina E₂ (terceira hora) ou após a administração do peptídeo, 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 drogas utilizadas.

4.8.2 Teste de retirada da cauda mediante ao estímulo térmico

O teste de retirada da cauda modificado de D'amour & Smith (1941) consiste na determinação do tempo de latência para que o animal retire a cauda após um estímulo térmico. Neste trabalho esse teste foi utilizado apenas para o estudo da antinocicepção central do peptídeo Pep13, quando administrado por via intratecal.

Este teste consiste em, posicionar a porção distal da cauda do animal (cerca de 2 cm), sob uma resistência helicoidal de níquel-cromo que se aquece com o decorrer do tempo (Figura 11A, B). Mediante acionamento de um botão pelo experimentador, inicia-se a passagem de uma corrente elétrica pela resistência aquecendo-a, e ao mesmo tempo um cronômetro é acionado. O tempo de latência consiste no tempo requerido pelo animal para percepção do estímulo nociceptivo e o reflexo de retirada da cauda, é interpretado como a resposta nociceptiva do animal, sendo mensurado em segundos. Assim que o animal retira a cauda, a cronômetro é interrompido manualmente (Figura 11C), sendo estabelecido um tempo limite de corte de nove segundos, a fim de evitar danos teciduais à cauda do animal. No dia anterior ao experimento, os animais são ambientalizados, ou seja, submetidos a todas as condições experimentais, esse procedimento é muito importante, pois, diminui o estresse do animal frente a essa situação aversiva. O limiar nociceptivo basal dos animais é aferido antes da administração de qualquer droga.

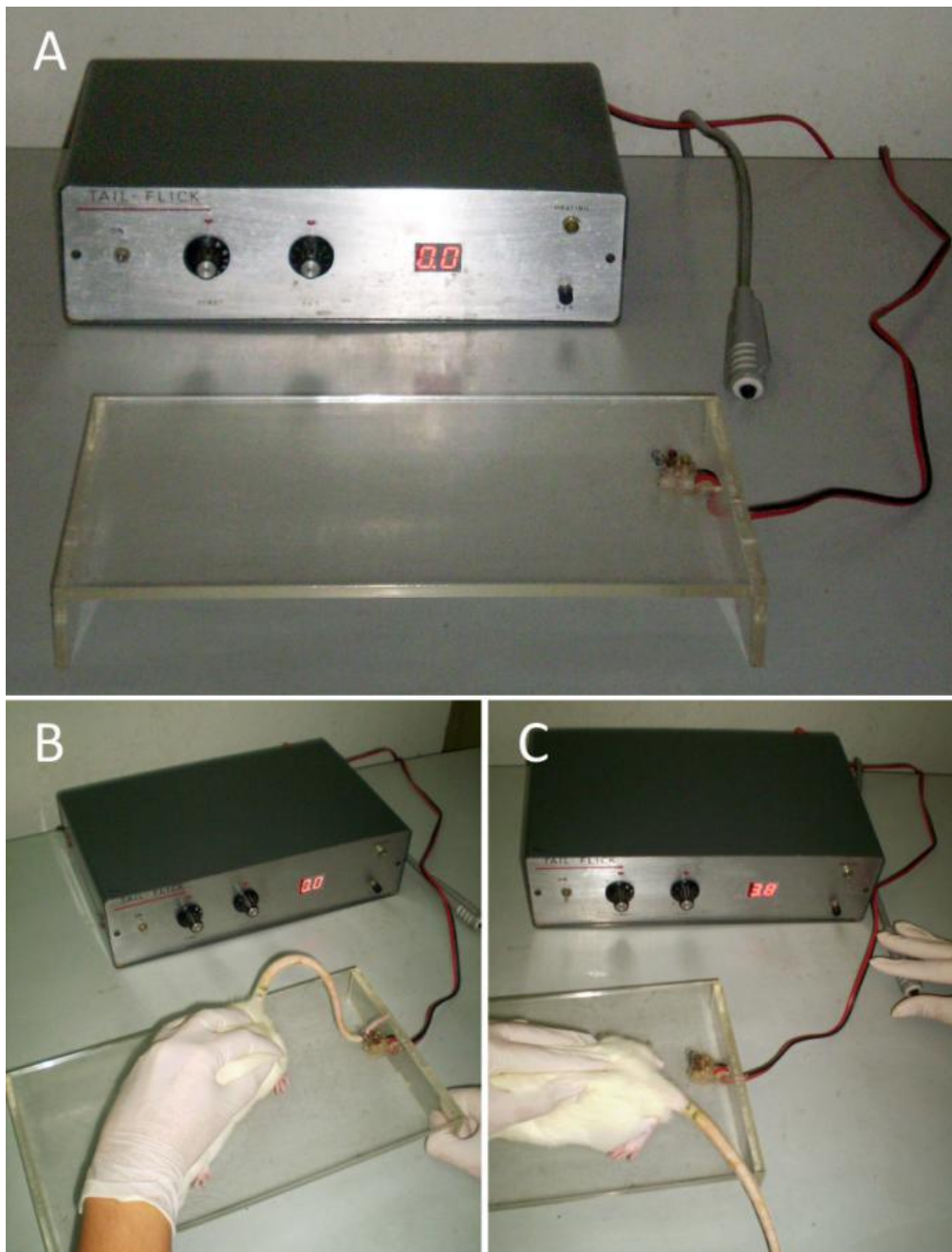


Figura 11: Teste de retirada da cauda mediante ao estímulo térmico. (A) Aparelho algesimétrico utilizado no teste de retirada da cauda mediante estímulo térmico (“tail flick”). (B) A cauda do animal é posicionada sob a resistência helicoidal e o aparelho é ligado (em detalhe o posicionamento da cauda sob a resistência helicoidal). (C) Após o acionamento a resistência vai aquecendo e o tempo de latência para a retirada da cauda do animal é medido em segundos. Foto: Laboratório de Dor e Analgesia, UFMG.

4.9 TESTE DE TOXICIDADE EM INSETOS

Para avaliar a atividade tóxica do peptídeo em insetos, foram utilizadas moscas (*Musca domestica*) com três dias de eclosão, pesando cerca de 20 mg. Foi testada uma única, porém elevada, dose do peptídeo (1 μmol) utilizando-se 10 moscas para cada grupo (teste e controle). Após serem anestesiadas, por redução da temperatura (4 °C), as moscas foram injetadas com 1 μl de solução de NaCl 0,9 % contendo albumina de soro bovino (BSA 0,1 %) (grupo controle) ou com 1 μl de Pep13 (1 μmol - grupo teste) diluído nesta mesma solução (NaCl 0,9 % contendo BSA 0,1 %). Para a injeção foi utilizada uma microseringa Hamilton (capacidade de 25 μl) acoplada a um dispositivo automático para dispensar o volume (Figura 12). Na agulha da própria seringa foi adaptado um fino capilar de vidro que foi introduzido na porção média do tórax da mosca (entre as segunda e terceira patas). Após a injeção as moscas foram colocadas em frascos transparentes com um chumaço de algodão embebido com solução aquosa de sacarose (5 %). A ocorrência de protusão e retração da probóscide, salivação, tremores, paralisia, incapacidade de vôo e morte dos insetos foram os possíveis sinais de referência, a serem observados após 5 e 30 minutos, 2 e 24 horas.

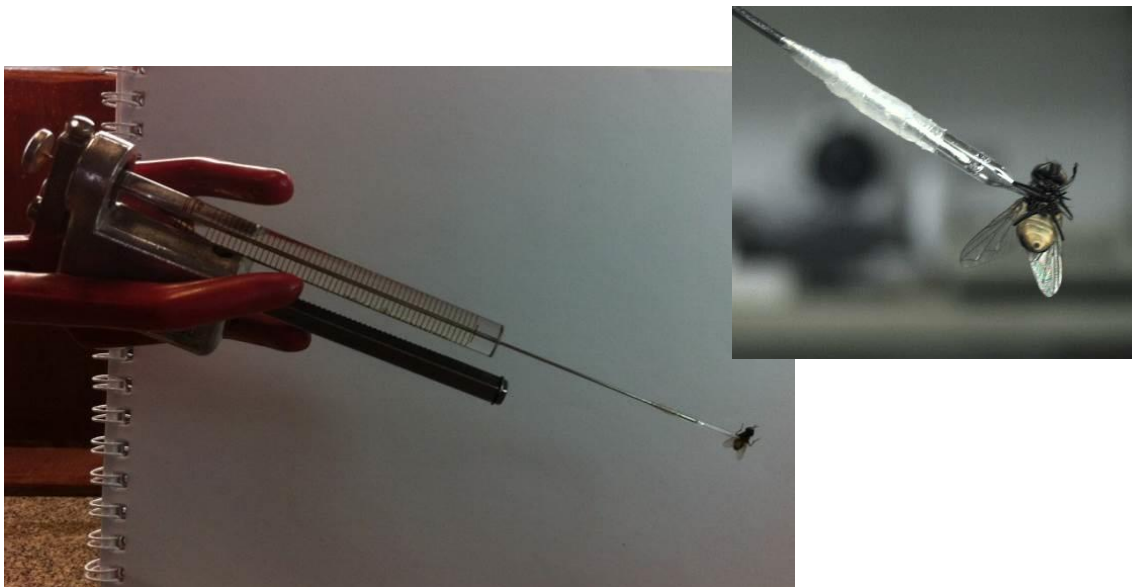


Figura 12 - Ensaio de toxicidade em mosca (*Musca domestica*), por administração intratorácica do peptídeo Pep13. Aparato utilizado para a administração intratorácica, em destaque a introdução do fino capilar de vidro na porção média do tórax da mosca. Fotos: Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (Daniel Santos e Pablo Reis).

3.1 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR)

Esta metodologia utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície para monitorar em tempo real a cinética de interação entre duas ou mais moléculas. Em uma interface entre dois meios transparentes com índices de refração diferentes (vidro e água), a luz proveniente do lado de maior índice de refração é parcialmente refletida e parcialmente refratada. Entretanto, acima de um ângulo de incidência crítico nenhuma luz é refratada através da superfície, e observa-se, portanto, a reflexão total desta luz.

Se a interface entre esses dois meios é coberta com uma camada suficientemente fina de metal, usualmente ouro, e a luz é monocromática e p-polarizada observa-se que, quando a luz incidente é totalmente refletida, o componente elétrico do seu campo eletromagnético penetra uma pequena distância na superfície do ouro, transferindo energia para a excitação dos elétrons livres do ouro, gerando assim o processo de ressonância plasmônica. Esta ressonância criará um

campo de onda evanescente (*evanescent field wave*) que decai exponencialmente com a distância da superfície. Devido à transferência de energia pela ressonância entre o campo de onda evanescente e plasmons na superfície do metal a luz refletida em um ângulo incidente específico é reduzida, produzindo uma sombra (Figura 13) (SALAMON et al., 1997).

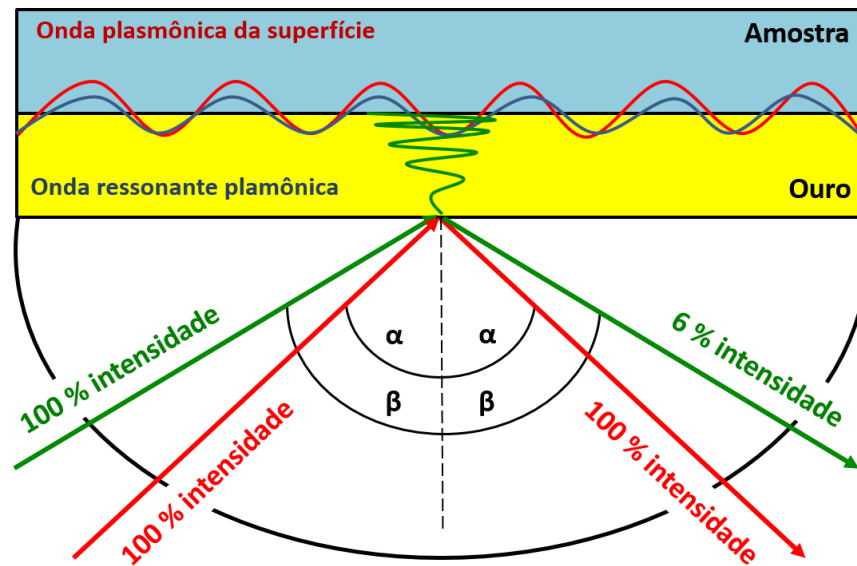


Figura 13: Representação esquemática de um sensor utilizado na técnica de ressonância plasmônica de superfície. Acima de um prisma hemi-cilíndrico, está disposto um sensor com uma fina camada de ouro, no qual um ligante pode ser imobilizado (em azul). A superfície é irradiada com luz visível p-polarizada com uma faixa de ângulos de incidência (α e β). Sob condições de reflexão total (ângulo crítico- α) um distúrbio na intensidade da luz refletida é observado e os elétrons da camada de ouro tendem a absorver a energia da luz, resultando em uma onda ressonante plasmônica superficial.

As condições de ressonância são influenciadas pelo material adsorvido no filme de metal. Existe uma relação linear entre o ângulo de ressonância e a concentração de massa de moléculas adsorvidas, principalmente quando bioquimicamente relevantes como proteínas, carboidratos e DNA. Assim, o sinal de SPR, expresso em unidades de ressonância (RU), é uma medida indireta da massa na superfície do *sensorchip*. Isso significa que a associação e dissociação ente o ligante

e o analito são observadas em tempo real, e que as taxas cinéticas e as constantes de equilíbrio podem ser calculadas.

Os experimentos foram realizados no Laboratoire de Biochimie da Faculté de Médecine Nord, de Aix-Marseille Université, França, utilizando sistema Biacore T200 (GE Healthcare), chips CM5 e os ligantes imobilizados, listados à seguir:

- Peptídeo SNAP-25 (resíduos 137 à 206 da proteína do complexo t-SNARE), utilizada como controle de ligação não específica;
- Peptídeo Na_v1.2 = SIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIAAARIGRIK-Biotin
- Peptídeo Na_v1.7 = SIVGMFLADLIETYFVSPTLFRVIRLARIGRILRK-Biotin

Todos os peptídeos eram biotinizados e foram acoplados ao chip pela interação com a neutravidina. O tampão de corrida utilizado foi fosfato de sódio (50 mM), pH 7,2 e todos os analitos foram injetados em tampão de corrida contendo 0,1 % de albumina de soro bovino. A regeneração dos analitos foi realizada com NaCl (1 M) em H₂O e os resultados foram expressos por gráficos de barras.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas do limiar nociceptivo foram realizadas em triplicata e foi utilizada a média das medidas. Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM da intensidade de hiperalgesia e a análise de variância (ANOVA e two-way 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 utilizado nos experimentos nociceptivos.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 PROPOSIÇÃO E SÍNTESE DO PEPTÍDEO

Trabalhos anteriores caracterizaram a atividade antinociceptiva das três principais toxinas purificadas da fração PhTx4: PnTx4(5-5), PnTx4(6-1) e PnTx4-3 (OLIVEIRA, 2010; MAGALHÃES, 2013; EMERICH, et al., 2016). Alinhando-se e comparando-se as sequências de aminoácidos dessas três toxinas, percebe-se uma alta similaridade entre as mesmas. PnTx4(6-1) e PnTx4-3 diferem-se apenas no vigésimo sétimo resíduo de aminoácido, sendo eles lisina e serina, respectivamente. Já PnTx4(5-5) apresenta menor identidade, entretanto, quando comparadas as três sequências, é possível notar que os resíduos de aminoácidos mais conservados se encontram entre as posições 1-16 e 21-33 (Figura 14).

Toxina	Sequência
PnTx4(6-1) - δ-ctenitoxin-Pn1a_1 sp:2108421A	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSKCREAAIVIYTAPKKLTC
PnTx4-3 - δ-ctenitoxin-Pn1b sp:P84034	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSSSKCREAAIVIYTAPKKLTC
PnTx4(5-5) - Γ-ctenitoxin-Pn1a sp:P59367	CADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYWSKSKCRESNFKIGMAIRKKFC-
	* . ** . *** . **** . ***** : : . ***** . ***** : : * * : ** :

Figura 14 - Comparação das sequências de aminoácidos de três toxinas com propriedades antinociceptivas, da fração PhTx4. As regiões mais conservadas entre as toxinas estão indicadas pelos asteriscos (*). Obtido e modificado de Clustal Omega.

Quando a sequência da toxina PnTx4(6-1) foi submetida ao estudo de predição de epítopos lineares para proteínas, no *Immune Epitope Database* (IEDB), foi possível obter a predição de acessibilidade à superfície da proteína e percebeu-se que os resíduos mais expostos se encontravam entre as posições 24 e 30 da sequência (Figura 15), o que correspondia também, à uma das duas regiões conservadas entre as sequências nas três toxinas analisadas. A grande

exposição dos resíduos C-terminais já era esperada. Portanto, a região selecionada foi aquela observada mais ao centro da molécula.

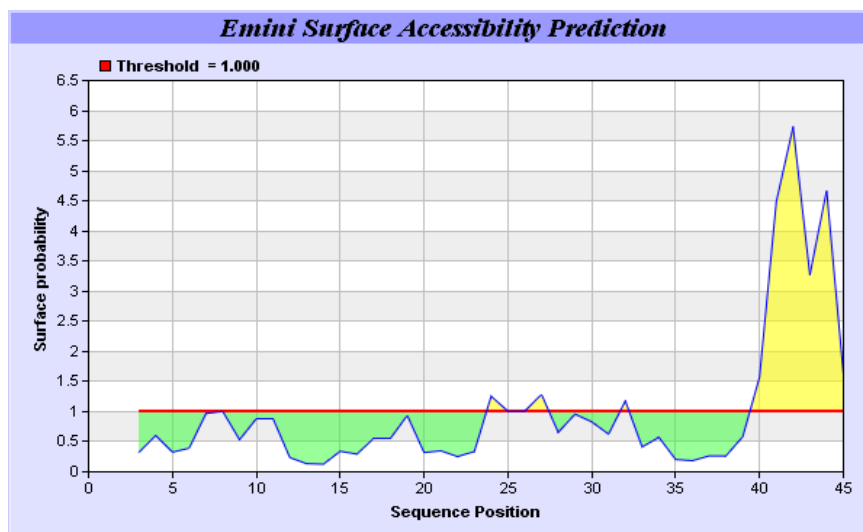


Figura 15 - Representação gráfica da previsão de acessibilidade à superfície da toxina PnTx4(6-1). Aos resíduos que apresentam maior acessibilidade são conferidos valores acima de 1 e, nesta escala, estão ressaltados pela cor amarela.

Diante das informações acima citadas, foi selecionada, para a síntese, a sequência de aminoácidos compreendida entre os resíduos 21 e 33 da toxina PnTx4(6-1). Nesta sequência (CDCYWSKSCKCRE) encontravam-se quatro resíduos de cisteína. Em consulta ao banco de dados *online* sobre toxinas de aranhas (www.arachnoserver.org) foi possível obter a previsão para a formação das pontes de dissulfeto entre as dez cisteínas presentes na sequência de PnTx4(6-1) (Figura 16).

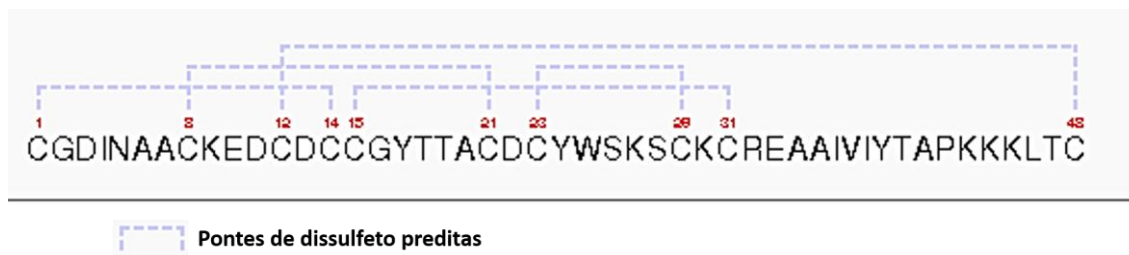


Figura 16 - Predição para a formação de pontes de dissulfeto em PnTx4(6-1). Modificado de www.arachnoserver.org.

Segundo essa predição, os resíduos de cisteína presentes nas posições 23 e 29 fazem pontes de dissulfeto entre si, assim, esses dois resíduos de cisteína foram mantidos na sequência proposta para o peptídeo e os outros dois resíduos de cisteína foram substituídos por resíduos de serina. A sequência final definida foi a seguinte: H-CDSYWSKSSKCRE-NH₂.

No decorrer da síntese não foram encontradas grandes dificuldades, entretanto, os três últimos resíduos de aminoácidos (SDC) foram reacoplados três vezes para garantir o devido acoplamento destes. Esses acoplamentos foram confirmados pelo resultado negativo no teste de Kaiser. Foram obtidos 142,2 mg dos produtos da síntese, frente aos 250 mg esperados. A massa calculada para o peptídeo foi de 1576,6 Da.

5.2 PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO

O peptídeo foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa Discovery® BIO Wide Pore C8 (Supelco). Foram aplicados à coluna 1,5 mg do produto obtido na síntese, em um volume de 1 mL. A cromatografia foi monitorada a 214 nm e a coleta foi realizada manualmente, sendo possível a obtenção do peptídeo com alto grau de pureza (Figura 17). No perfil cromatográfico, observou-se a presença de várias frações, que também foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa. As duas frações adjacentes à fração correspondente ao peptídeo (indicada pela seta vermelha, figura 17) apresentaram massa

correspondente a subprodutos de síntese, com a ausência dos aminoácidos serina e cisteína ou ambos. A fração correspondente ao Pep13 foi eluída em 19,2 % de acetonitrila (ACN), liofilizada e estocada a -20 °C.

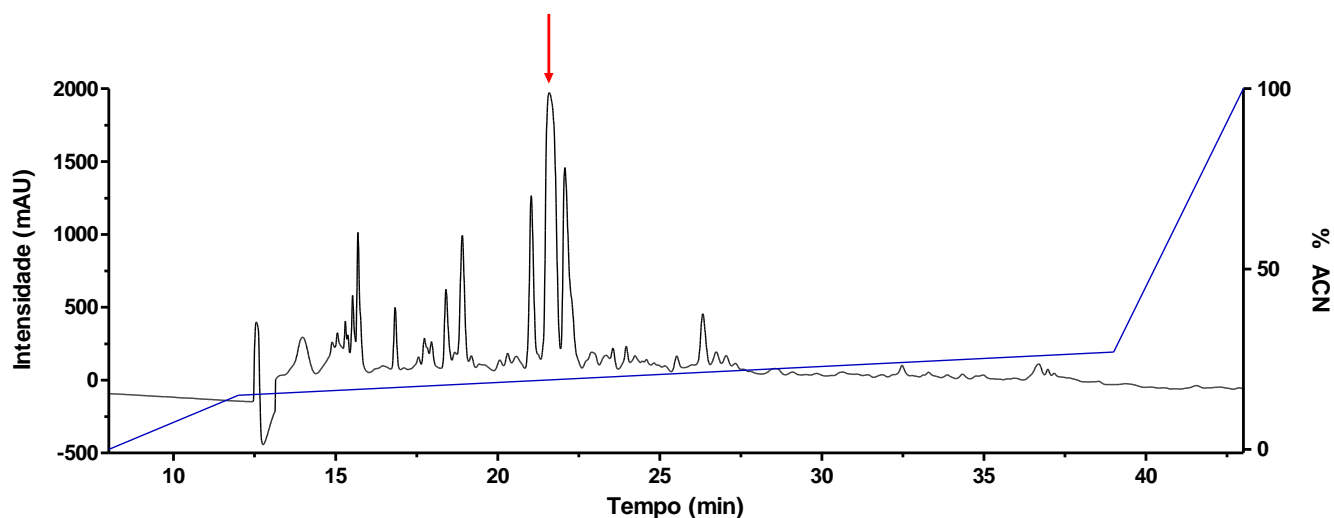


Figura 17 - Perfil cromatográfico da purificação de Pep13, a partir dos produtos obtidos após a síntese.

Cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa Discovery® BIO Wide Pore C8 (Supelco), com gradiente não linear (linha azul) de 0 a 15 % de acetonitrila (ACN), em 4 minutos; de 15 a 27 % de ACN, em 27 minutos e 27 a 100 % ACN, em 4 minutos. As frações foram eluídas em um fluxo de 5 mL/min e coletadas manualmente. A fração correspondente à Pep13 está destacada pela seta vermelha. A cromatografia foi monitorada a 214 nm (linha preta).

5.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Todas as frações provenientes da cromatografia de fase reversa foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa. A fração correspondente à Pep13 foi submetida à análise em espectrômetro de massa para verificar tanto a massa quanto a pureza do peptídeo. O espectro obtido na espectrometria indicou que a massa monoisotópica correspondia à massa molecular prevista para o peptídeo, 1576,6 Da e que, Pep13 se encontrava com alto grau de pureza (Figura 18). Após a fragmentação do peptídeo no espectrômetro de massa foi possível obter sua sequência de aminoácidos (Figura 19). Observamos que as massas moleculares correspondentes aos fragmentos da sequência, obtidos após a fragmentação a partir do C-terminal (íons y), estão presentes, com exceção da massa correspondente ao resíduo de ácido glutâmico. Entretanto a massa molecular correspondente ao dipeptídeo RE (arginina/ácido glutâmico: 303 Da) foi detectada e está indicada na figura 19 pela seta vermelha. Confirmamos, assim, a sequência do peptídeo sintetizado (H-CDSYWSKSSKCRE-NH₂).

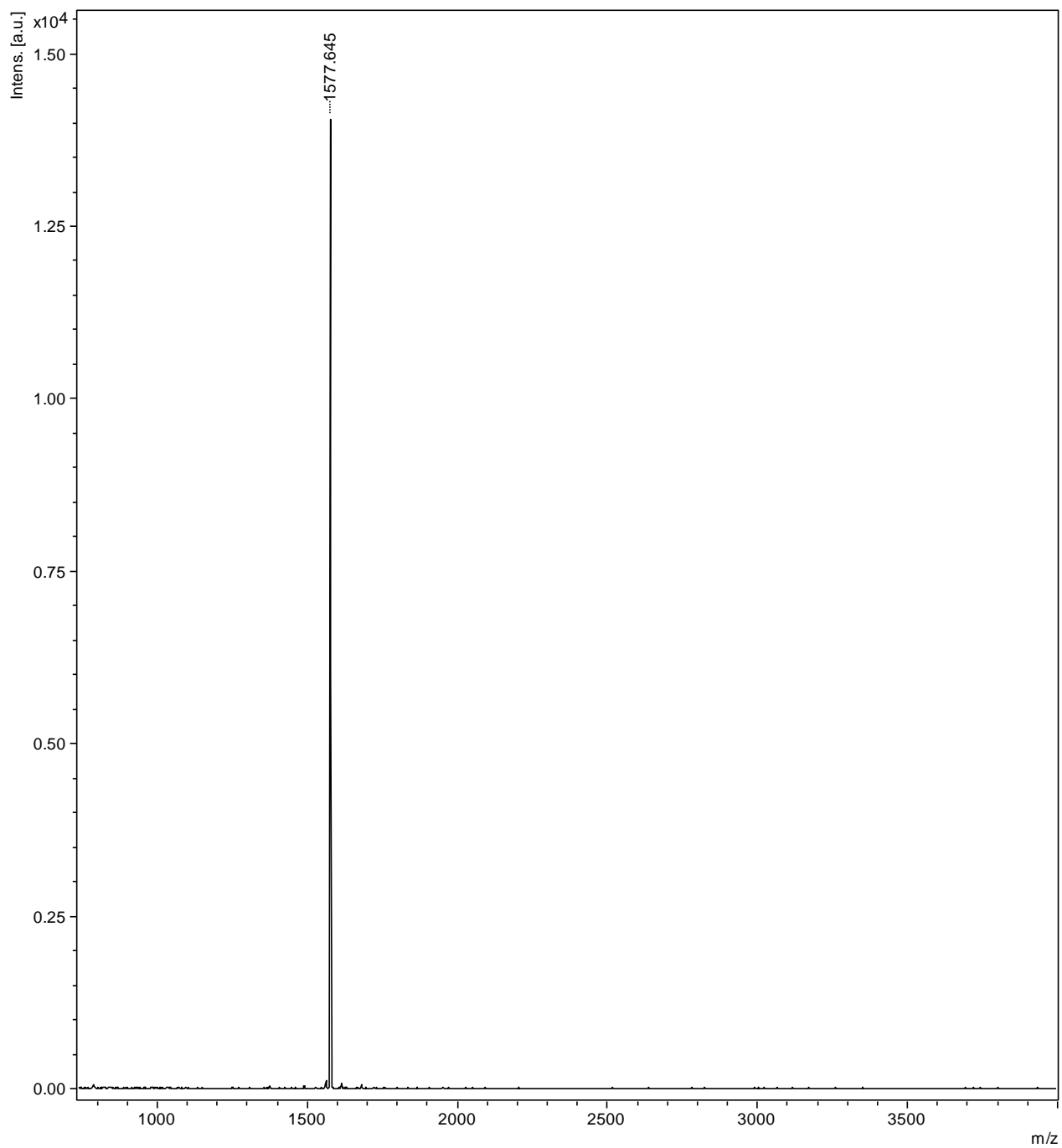


Figura 18 - Perfil da espectrometria de massa de Pep13. Massa monoisotópica de Pep13 $[M + H]^+ = 1577,6$ m/z.

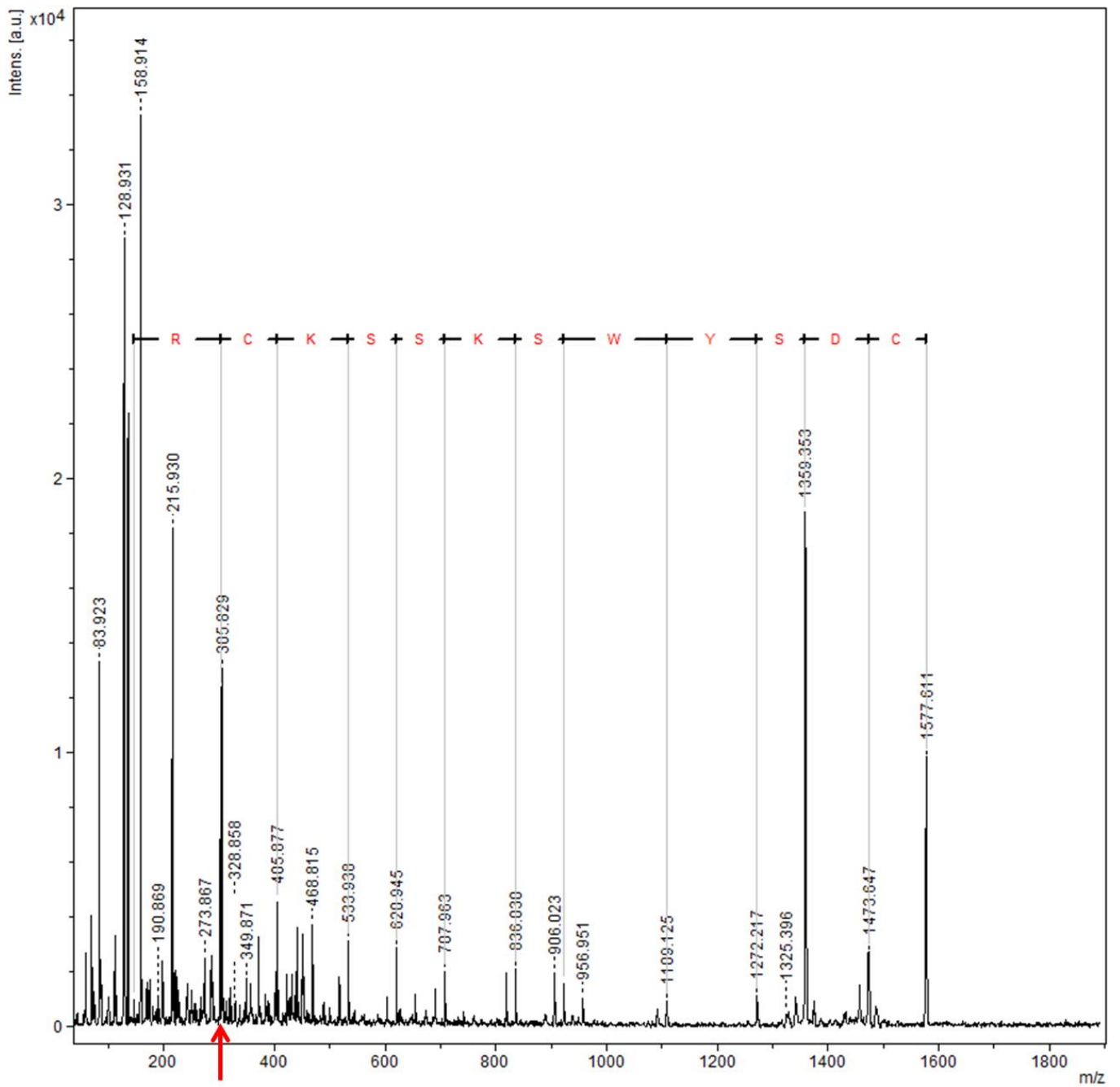


Figura 19: Perfil de fragmentação de Pep13 gerado por espectrometria de massa. Em destaque os aminoácidos (letras em vermelho) obtidos pela diferença entre os picos adjacentes, a seta em vermelho indica a massa de 303 Da, correspondente ao dipeptídeo RE.

5.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO MOLAR

O valor de ϵ calculado para Pep13 foi de 7115, considerando-se que os dois resíduos de cisteína estabeleçam ligação entre si. Assim, com o valor da absorbância da amostra a 280 nm, foi possível determinar a concentração do peptídeo, que foi de 1,2 mg/mL. O peptídeo foi então aliquotado, liofilizado e armazenado a -20 °C.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEP13

5.5.1 Avaliação do efeito central de Pep13

5.5.1.1 Efeito induzido pela administração intratecal de Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂)

A administração de Pep13, no sistema nervoso central, por injeção intratecal, apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. A dose de 0,5 µg foi capaz de elevar o limiar nociceptivo da pata dos ratos e as doses de 1 e 2 µg reverteram totalmente o efeito hiperalgésico evocado por PGE₂, tendo duração de 40 minutos. A menor dose utilizada (0,25 µg) não foi capaz de alterar de forma significativa, o efeito hiperalgésico induzido por PGE₂. Quando a dose de 20 µg foi administrada, o efeito antinociceptivo de Pep13 se manteve durante os sessenta minutos de duração do experimento, mesmo que uma redução do efeito seja observada com o decorrer do tempo (Figura 20). É interessante observar que o peptídeo, quando testado, nas mesmas condições que a toxina PnTx4(6-1), foi capaz de reproduzir o efeito antinociceptivo da mesma.

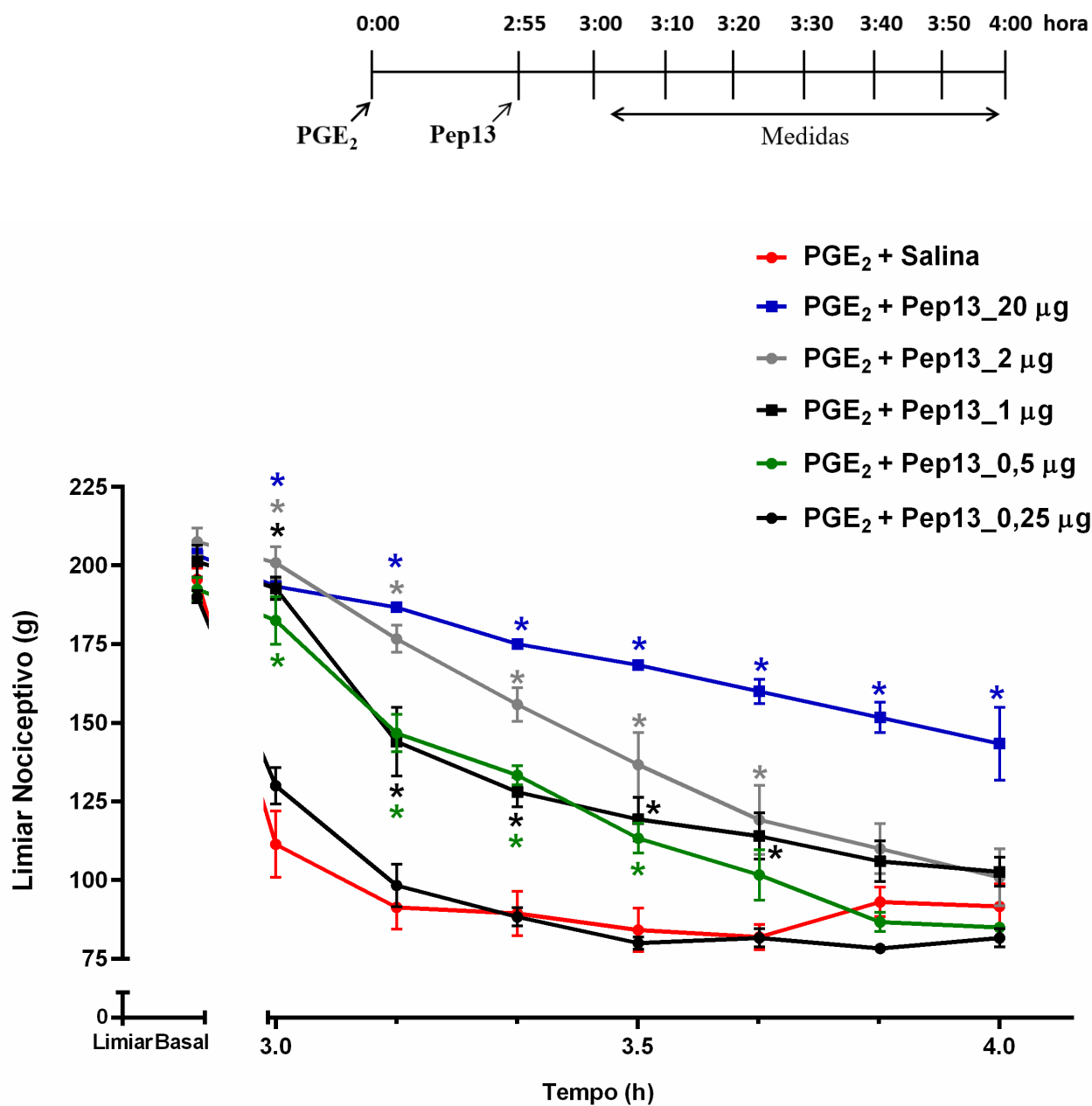


Figura 20: Efeito da administração intratecal de diferentes doses do peptídeo Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. O peptídeo foi administrado duas horas e cinquenta e cinco minutos após a administração de PGE₂ (2 µg). As medidas tiveram início cinco minutos após a administração de Pep13 e foram realizadas a cada dez minutos. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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.

5.5.1.2 Envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intratecal de Pep13

Com o intuito de avaliar se o sistema opioidérgico estaria associado à ação antinociceptiva do peptídeo, utilizou-se naloxona, um antagonista não-específico para receptores opioides. Observou-se que a dose de 100 µg de naloxona foi capaz de antagonizar o efeito analgésico do peptídeo (0,5 µg), sendo este antagonismo parcial na dose utilizada (Figura 21). A naloxona na dose utilizada não produziu antinocicepção frente a hiperalgesia evocada por PGE₂ (Figura 21 a direita).

5.5.1.3 Envolvimento do sistema canabinoide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intratecal de Pep13

Uma vez que a reversão do efeito antinociceptivo de Pep13 foi apenas parcial, frente ao antagonista opioide Naloxona, avaliou-se também a participação do sistema canabinoide neste efeito. A administração intratecal do antagonista para os receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁), AM251, foi capaz de antagonizar, parcialmente, a antinocicepção evocada pela administração intratecal de Pep13 (0,5 µg) (Figura 22). Apenas as doses de 160 e 320 µg de AM251 foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo de Pep13, entretanto, mesmo nessas altas doses, o AM251 não promoveu o antagonismo total desse efeito, sugerindo um possível mecanismo adicional para o efeito antinociceptivo do peptídeo. Diferentemente, a administração de 100 µg do antagonista dos receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂), AM630, não provocou nenhuma alteração na antinocicepção induzida pela administração intratecal de Pep13 (Figura 23), mostrando que este receptor não está, aparentemente, envolvido no efeito antinociceptivo desencadeado pelo peptídeo.

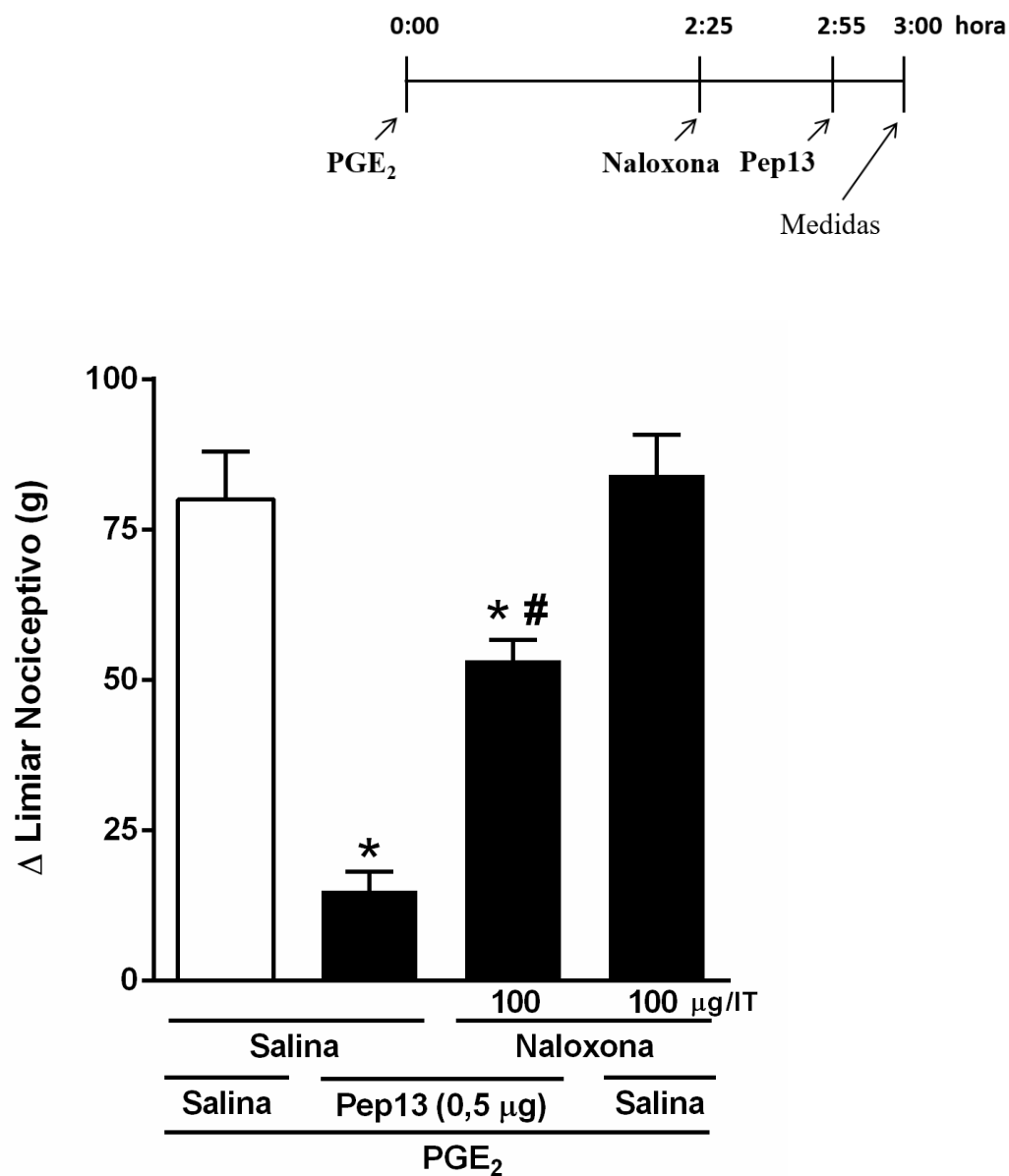


Figura 21: Efeito do antagonista não específico de receptores opioides, naloxona, na antinociceção induzida por Pep13, sobre a hiperalgisia induzida por PGE₂. Ratos receberam 100 μg de Naloxona, por via intratecal, 2 horas e 25 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intratecal 30 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P < 0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

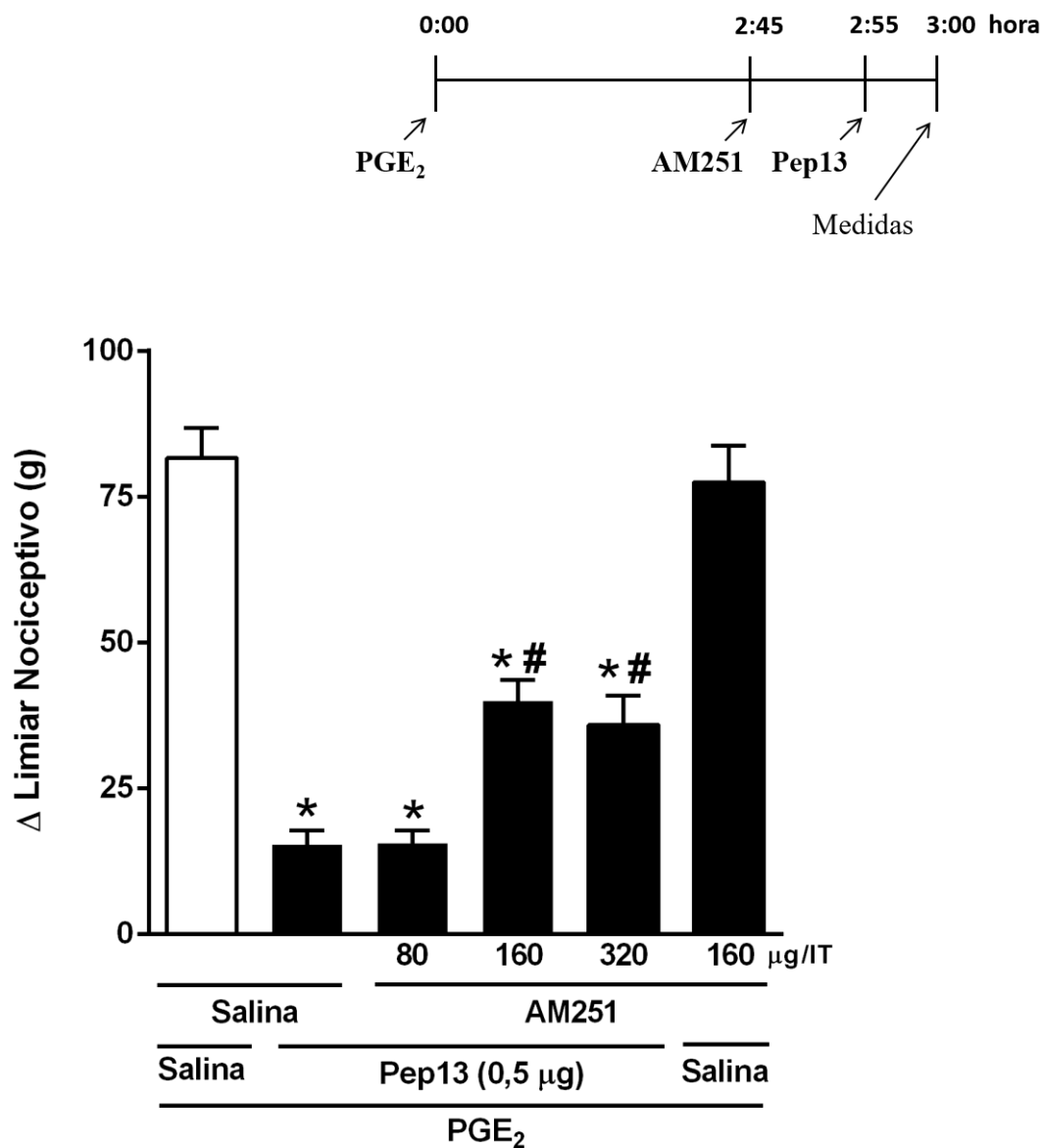


Figura 22: Efeito do antagonista do receptor CB₁, AM251, na antinociceção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia evocada por PGE₂. Ratos receberam diferentes doses de AM251, por via intratecal, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intratecal 10 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

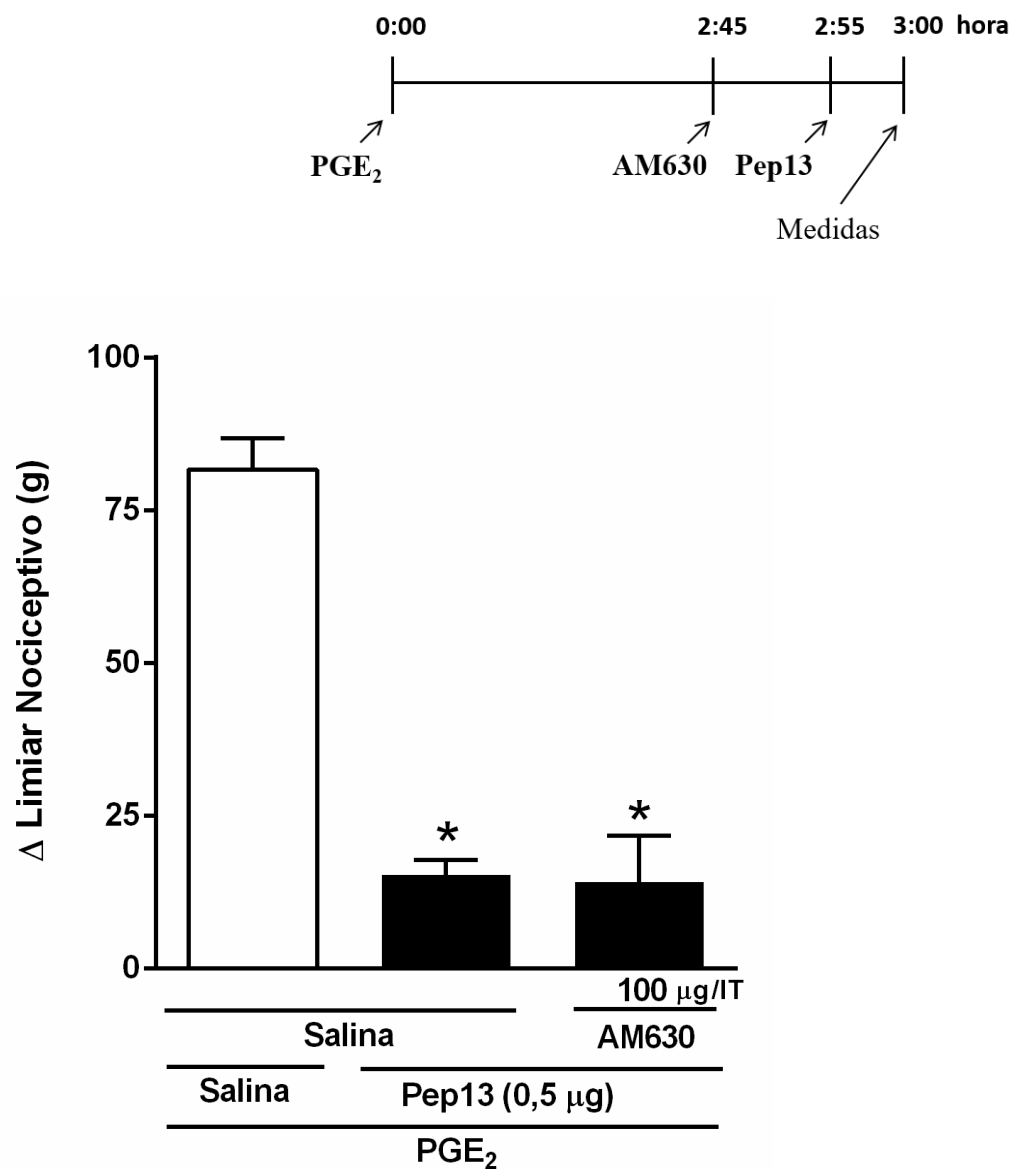


Figura 23: Efeito do antagonista do receptor CB₂, AM630, na antinociceção induzida por Pep13, sobre a hiperalgesia evocada por PGE₂. Ratos receberam 100 µg de AM630, por via intratecal, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg). Pep13 ou salina foram injetados por via intratecal 10 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*).

5.5.2 Avaliação do efeito periférico de Pep13

5.5.2.1 Efeito induzido pela administração intraplantar do peptídeo sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

Uma vez observado o efeito de Pep13, quando administrado por via intratecal, buscou-se averiguar se o peptídeo também apresentava efeito antinociceptivo ao nível periférico. Para isso, foi realizada uma curva dose-resposta para Pep13, quando administrado por via intraplantar, frente à hiperalgesia evocada por PGE₂ (Figura 24).

Foram testadas as doses de 2,5; 5; 10 e 20 µg de Pep13, que foram administradas três horas após a administração de PGE₂. Observou-se que as quatro doses são capazes de reverter a hiperalgesia na pata dos ratos, tendo seu maior efeito antinociceptivo 5 minutos após sua administração. Pep13 na dose de 20 µg apresentou 50 minutos de duração de seu efeito. Percebe-se que a redução da dose também provoca redução da duração do efeito antinociceptivo do peptídeo, sendo de 40, 20 e 10 minutos, para as doses de 10, 5 e 2,5 µg, respectivamente (Figura 24). Assim como os efeitos observados centralmente Pep13, também, apresenta atividade antinociceptiva quando administrado periféricamente.

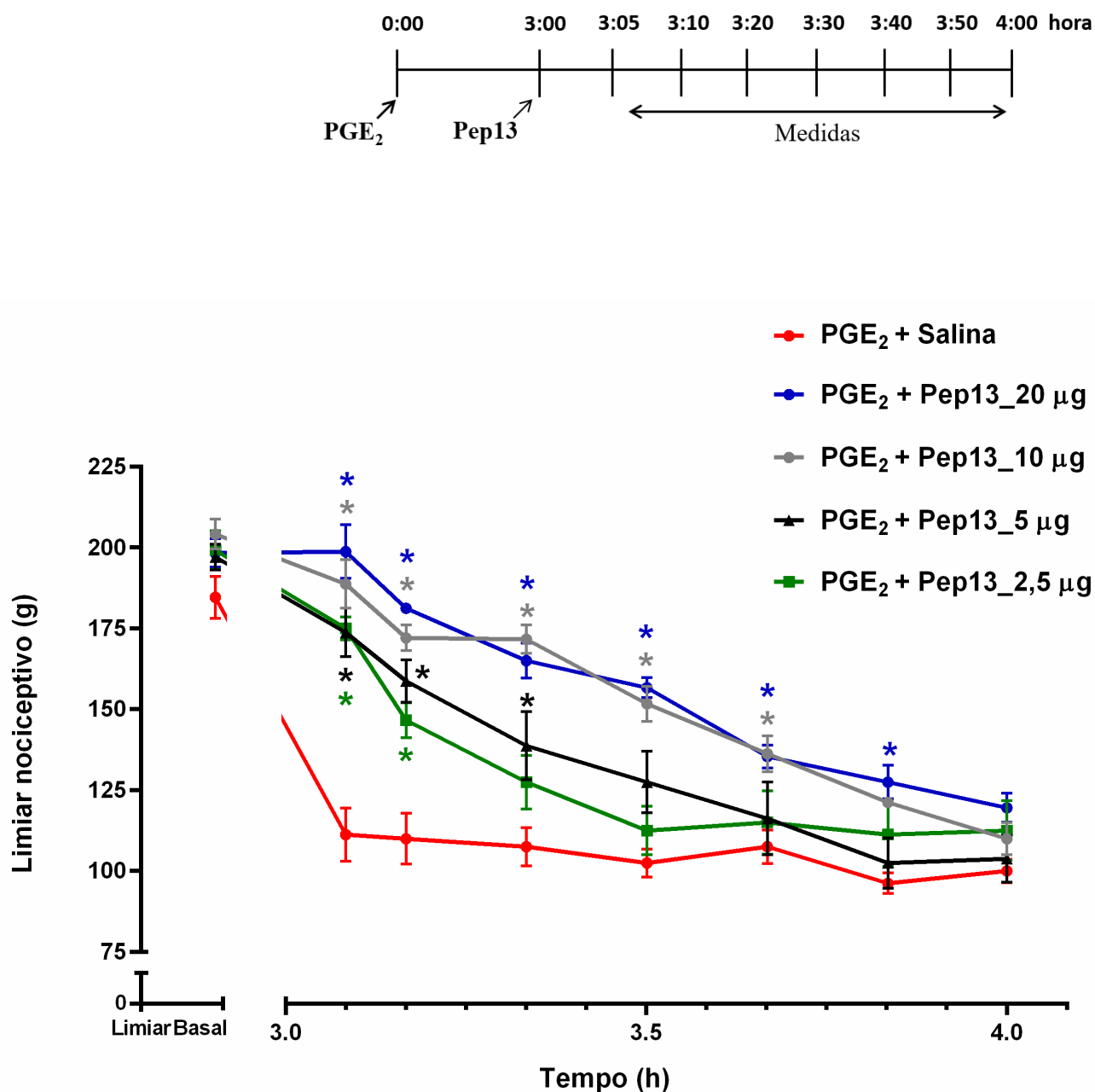


Figura 24: Efeito da administração intraplantar de diferentes doses do peptídeo Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂ (2 µg/pata). O peptídeo foi administrado três horas após a administração de PGE₂. As medidas tiveram início cinco minutos após a administração de Pep13 e foram realizadas a cada dez minutos. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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.

5.5.2.2 Avaliação do possível efeito sistêmico de Pep13 na dose de 20 µg

No teste de exclusão do efeito antinociceptivo não local do peptídeo, foi possível constatar que a dose de 20 µg de Pep13 tem ação antinociceptiva exclusivamente local (Figura 25). A PGE₂ foi administrada nas duas patas posteriores do mesmo animal, porém o peptídeo foi administrado somente na pata direita, e as medidas dos limiares nociceptivos foram realizadas em ambas as patas. A administração de 20 µg do peptídeo na pata direita induziu claro efeito antinociceptivo. Entretanto, este efeito não foi observado quando o limiar nociceptivo, do mesmo animal, foi aferido na pata esquerda (onde foi administrada somente PGE₂). Portanto, como o peptídeo na dose de 20 µg não induziu efeito sistêmico, prosseguiu-se a avaliação da atividade de Pep13 no sistema nervoso periférico.

5.5.2.3 Envolvimento da via opioide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intraplantar de Pep13

Uma vez que o efeito antinociceptivo central de Pep13 tem o envolvimento do sistema opioide, o primeiro passo para a investigação do mecanismo de ação periférico deste peptídeo foi averiguar a participação deste sistema. Para isso, foi utilizado o mesmo antagonista para os receptores opioides, naloxona. Observa-se que na dose de 100 µg, Naloxona, administrada por via intraplantar, foi capaz de antagonizar parcialmente o efeito antinociceptivo de 10 µg de Pep13. Indicando assim, a participação do sistema opioidérgico, também, no efeito periférico do peptídeo (Figura 26).

5.5.2.4 Envolvimento da via canabinoide no efeito antinociceptivo induzido pela administração intraplantar de Pep13

Uma vez observada a participação do sistema opioide e, sabendo-se que centralmente a ação antinociceptiva de Pep13 evoca a participação do sistema canabinoide, buscou-se averiguar a participação deste sistema, também, periféricamente. Para isso, foram utilizados os mesmos antagonistas para os receptores, AM251 para CB₁ e AM630 para CB₂. Neste experimento, tanto o Pep13 quanto os antagonistas foram administrados por via intraplantar. Quando utilizado o antagonista para os receptores CB₁, nas doses de 160 e 320 µg, observou-se uma redução do efeito antinociceptivo do peptídeo (Figura 27).

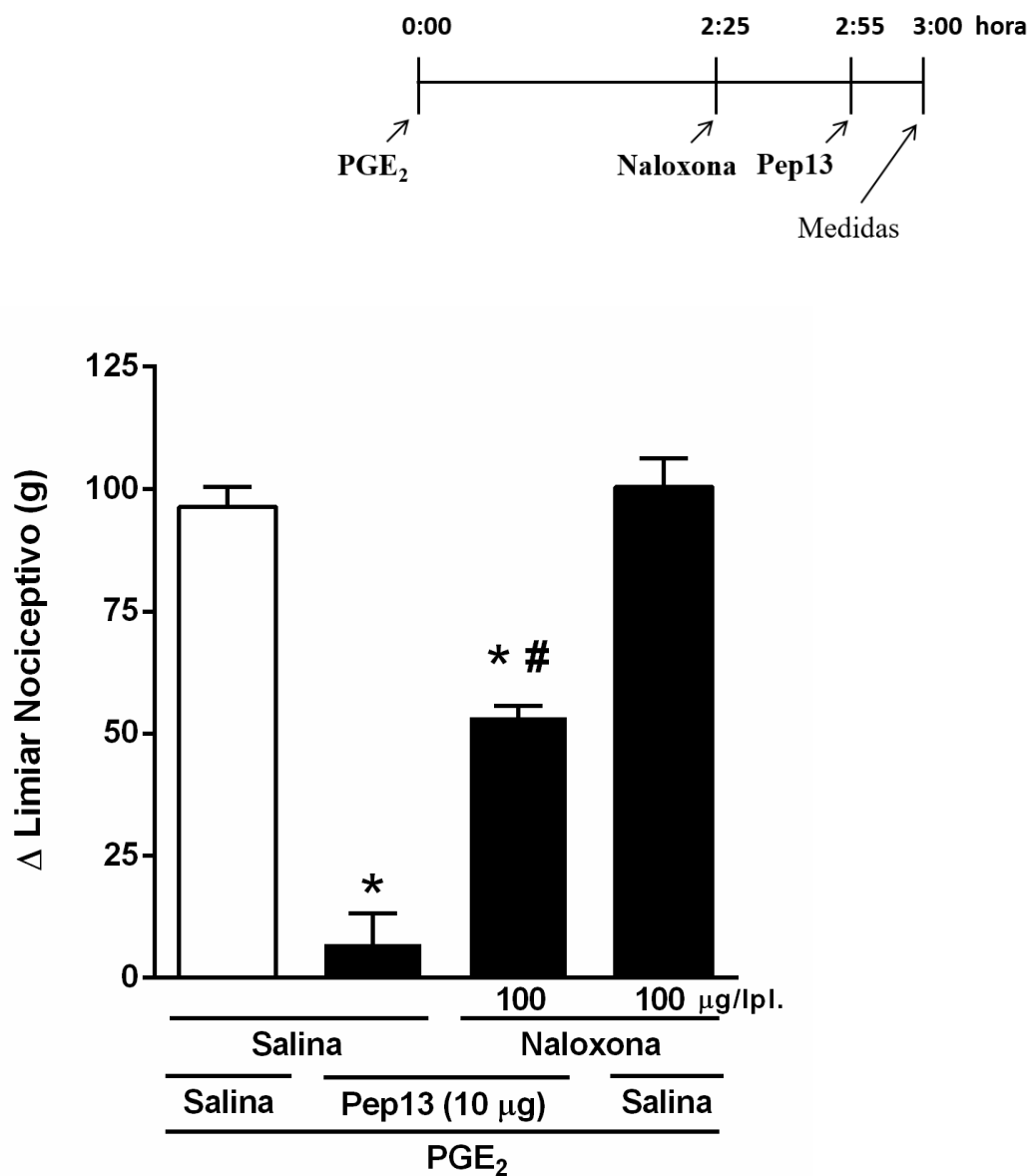


Figura 26: Efeito do antagonista não específico dos receptores opídeos, naloxona, na antinociceção induzida por Pep13, sobre a hiperalgia induzida por PGE₂. Ratos receberam 100 μg de Naloxona, por via intraplantar, 2 horas e 25 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intraplantar, 30 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

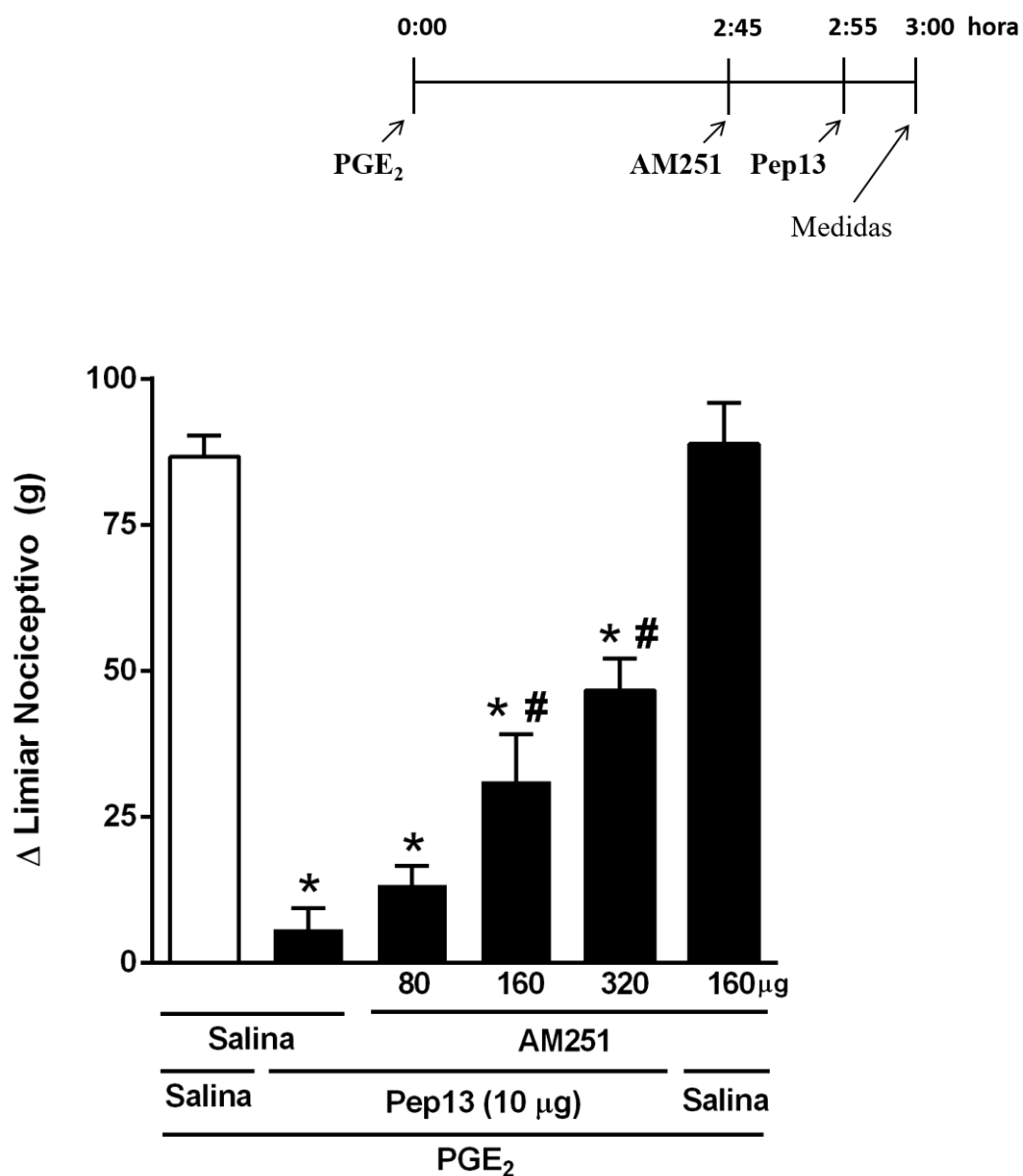


Figura 27: Efeito do antagonista do receptor CB₁, AM251, na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. Os ratos receberam diferentes doses de AM251, por via intraplantar, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intraplantar, 10 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

De maneira similar ao observado nos experimentos de ação central do peptídeo, o antagonista canabinoide para os receptores CB₂, na elevada dose de 100 µg, não antagonizou o efeito analgésico do mesmo, indicando que esses receptores não estão envolvidos no efeito de Pep13 (Figura 28). Concluiu-se que, o efeito antinociceptivo de Pep13, tanto central (por administração intratecal), quanto periférico (por administração intraplantar), envolve a participação do receptor canabinoide CB₁ e, aparentemente, não há participação do receptor CB₂ neste efeito.

Para avaliar a participação dos canabinoides endógenos no efeito antinociceptivo periférico de Pep13 utilizamos o MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil-fosfonofluorídrico metil éster), droga responsável pela inibição da FAAH (amida hidrolase de ácidos graxos). A FAAH é uma enzima que degrada a anandamida. Os inibidores da FAAH, são capazes de aumentar significativamente os níveis deste endocanabinoide nos tecidos. Quando administrado por via intraplantar o MAFP 0,5 µg, foi capaz de intensificar o efeito antinociceptivo da dose submáxima de Pep13 (2,5 µg). O MAFP, na dose de 0,5 µg, quando administrado apenas com o veículo de Pep13 (salina), não alterou estatisticamente a hiperalgesia evocada por PGE₂ (Figura 29).

Uma segunda ferramenta farmacológica foi utilizada para avaliar a participação de endocanabinoides na antinocicepção de Pep13, o VDM11 [(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14 eicosatetraenamida], descrito inicialmente como inibidor da recaptção de anandamida, mantendo desta forma mais endocanabinóides disponíveis na fenda sináptica. Observamos que a dose de 2,5 µg de VDM11 foi capaz de intensificar a ação antinociceptiva da dose submáxima de Pep13 (0,5 µg) (Figura 30). É importante ressaltar que quando administrado apenas com o veículo do peptídeo (salina) o VDM11, na dose de 2,5 µg, não alterou de forma estatisticamente significativa a hiperalgesia provocada pela administração intraplantar de PGE₂.

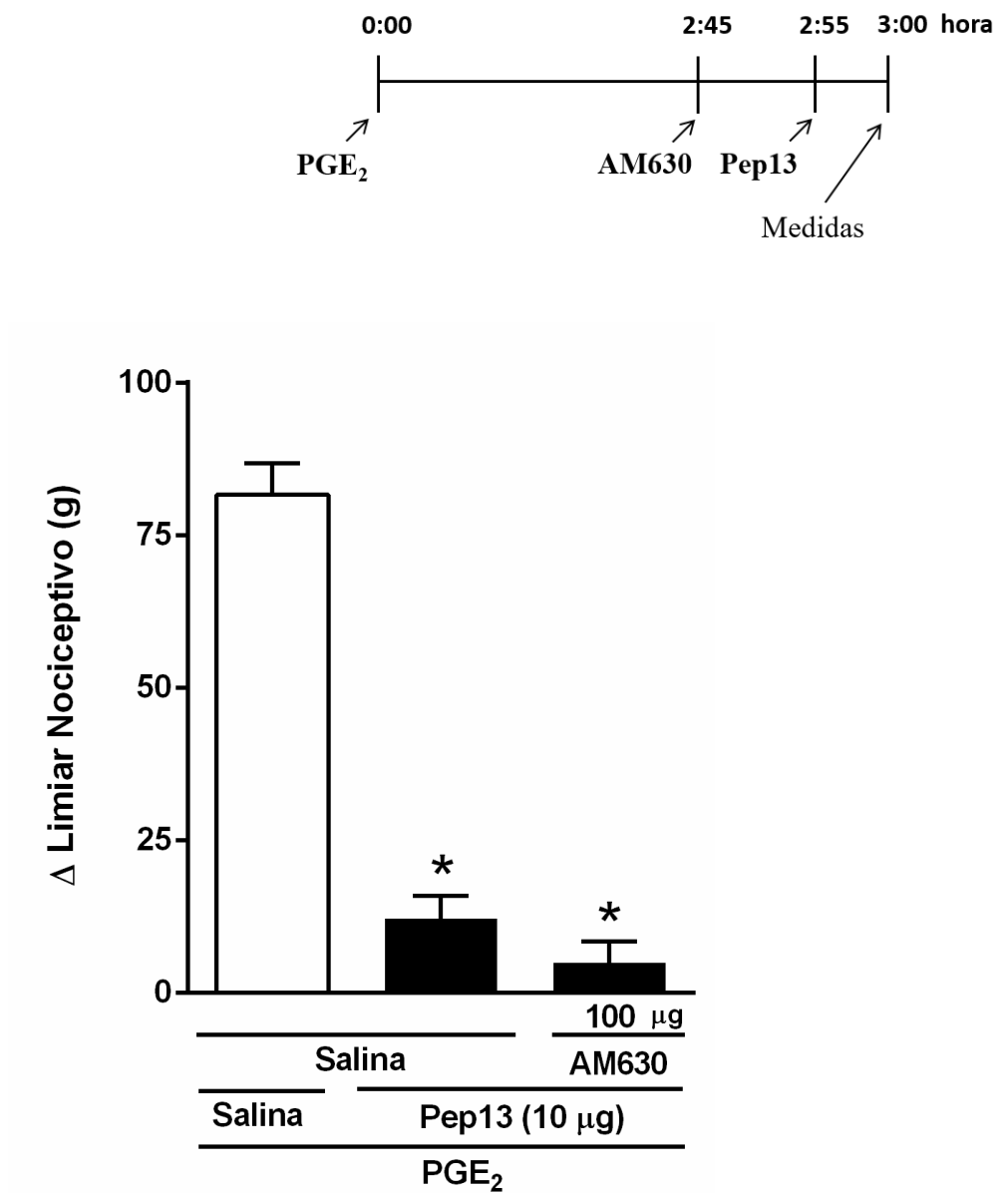


Figura 28: Efeito do antagonista do receptor CB₂, AM630, na antinocicepção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. Os ratos receberam 100 μg de AM630, por via intraplantar, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intraplantar, 10 minutos após a administração do antagonista. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina (*).

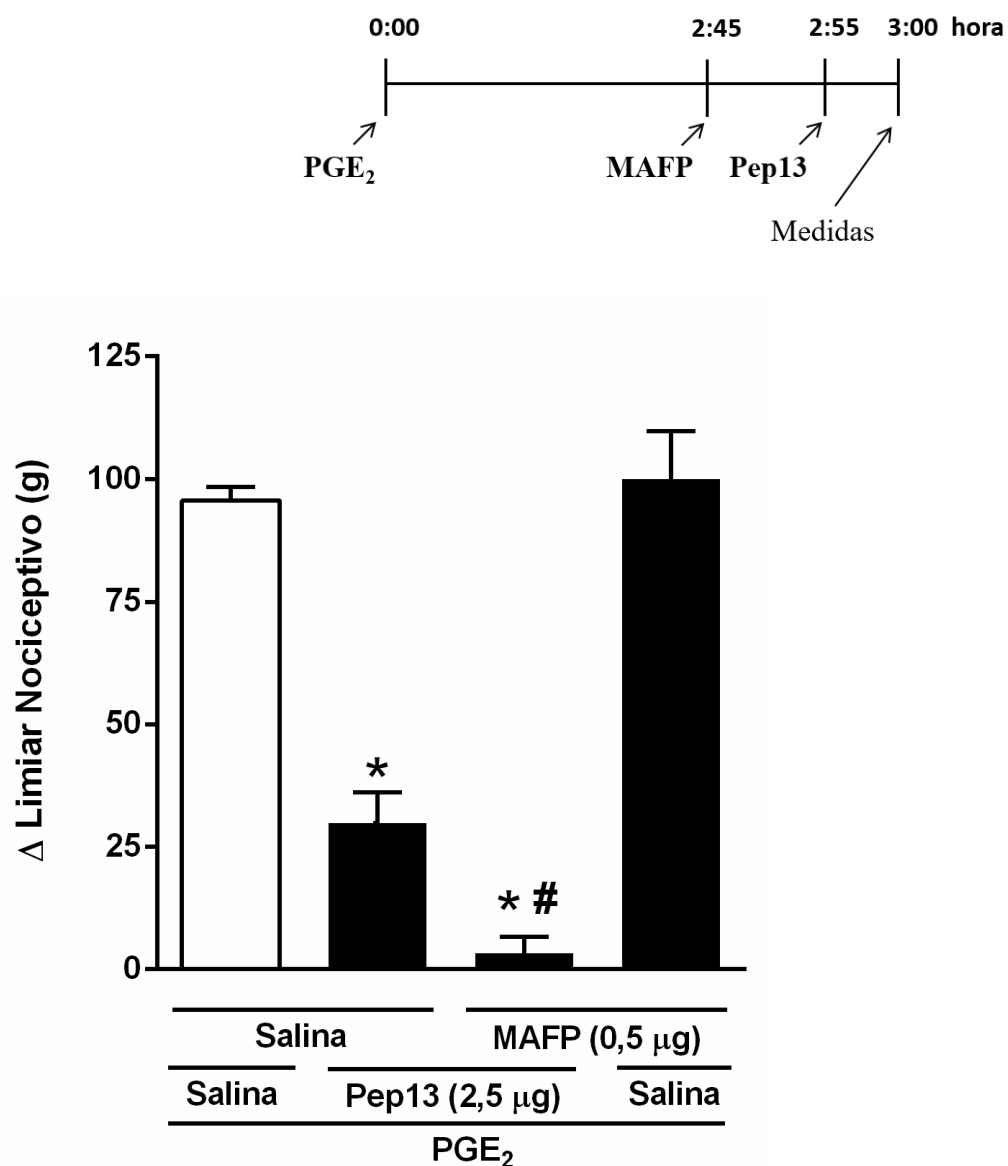


Figura 29: Efeito da ação de MAFP na antinociceção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. Ratos receberam 0,5 μg de MAFP, por via intraplantar, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (2 μg). Pep13 ou salina foram injetados por via intraplantar, 10 minutos após a administração do bloqueador. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Saline + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

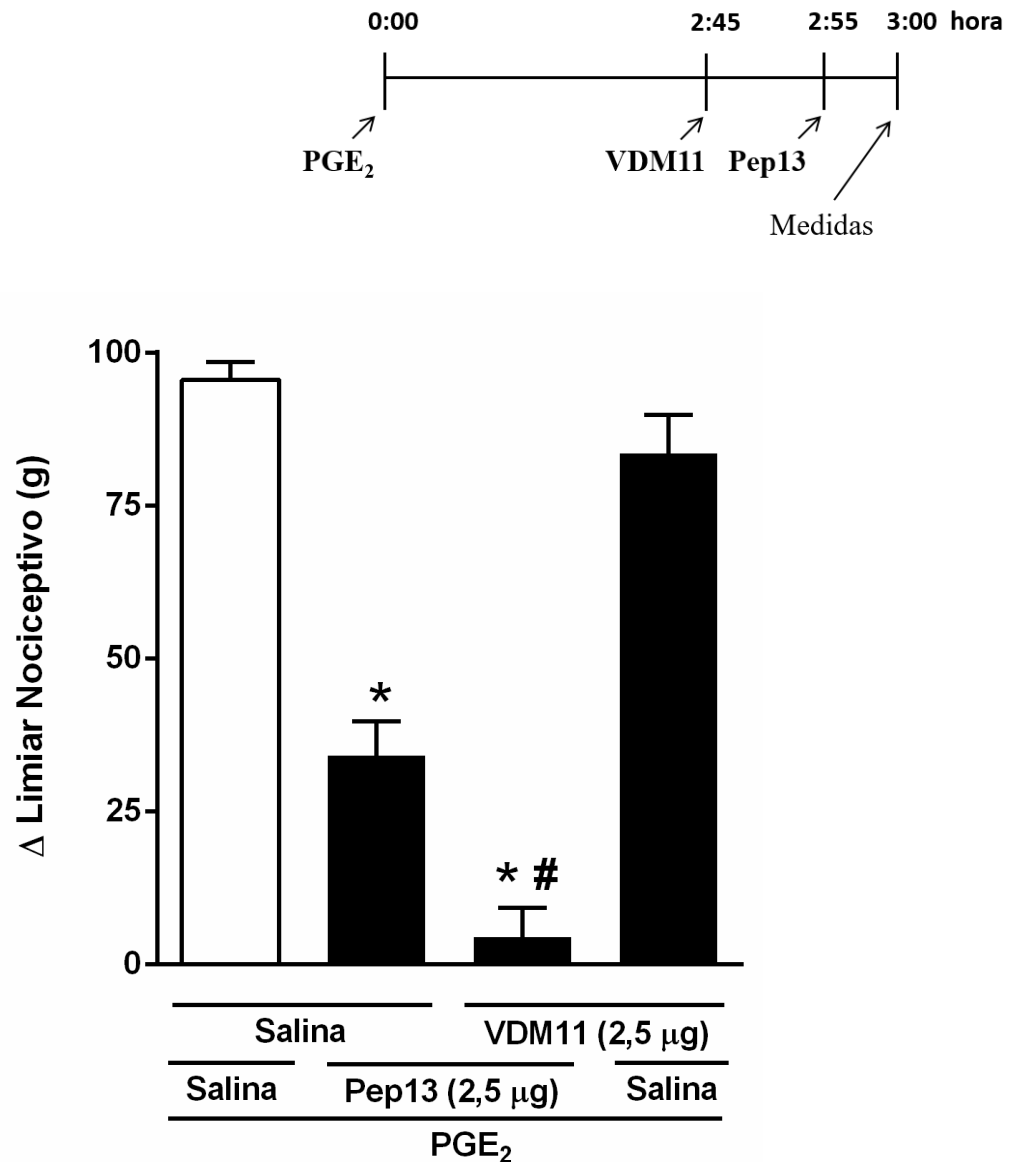


Figura 30: Efeito da ação de VDM11 na antinociceção induzida por Pep13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. Os ratos receberam 2,5 µg de VDM11, por via intraplantar, 2 horas e 45 minutos após a administração de prostaglandina E₂ (2 µg). Pep13 ou salina foram injetados por via intraplantar, 10 minutos após a administração do bloqueador. O limiar nociceptivo foi mensurado 5 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima 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. Os dados foram analisados usando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. P <0,05 em relação aos grupos PGE₂ + Salina + Salina (*) ou PGE₂ + Pep13 + Salina (#).

5.5.3 Teste do efeito antinociceptivo de Pep13 mediante ao estímulo térmico

Com relação à resposta central aferida pela administração intratecal de Pep13, não foi possível estabelecer uma dose que apresentasse atividade antinociceptiva pelo método de retirada da cauda mediante estímulo térmico (“Tail Flick”). As doses de 0,5 e 5 µg do peptídeo não apresentaram nenhum efeito sobre o limiar nociceptivo dos animais (Figura 31). Isto pode indicar que o peptídeo só tem sua atividade antinociceptiva efetiva mediante à sensibilização prévia das vias nociceptivas.

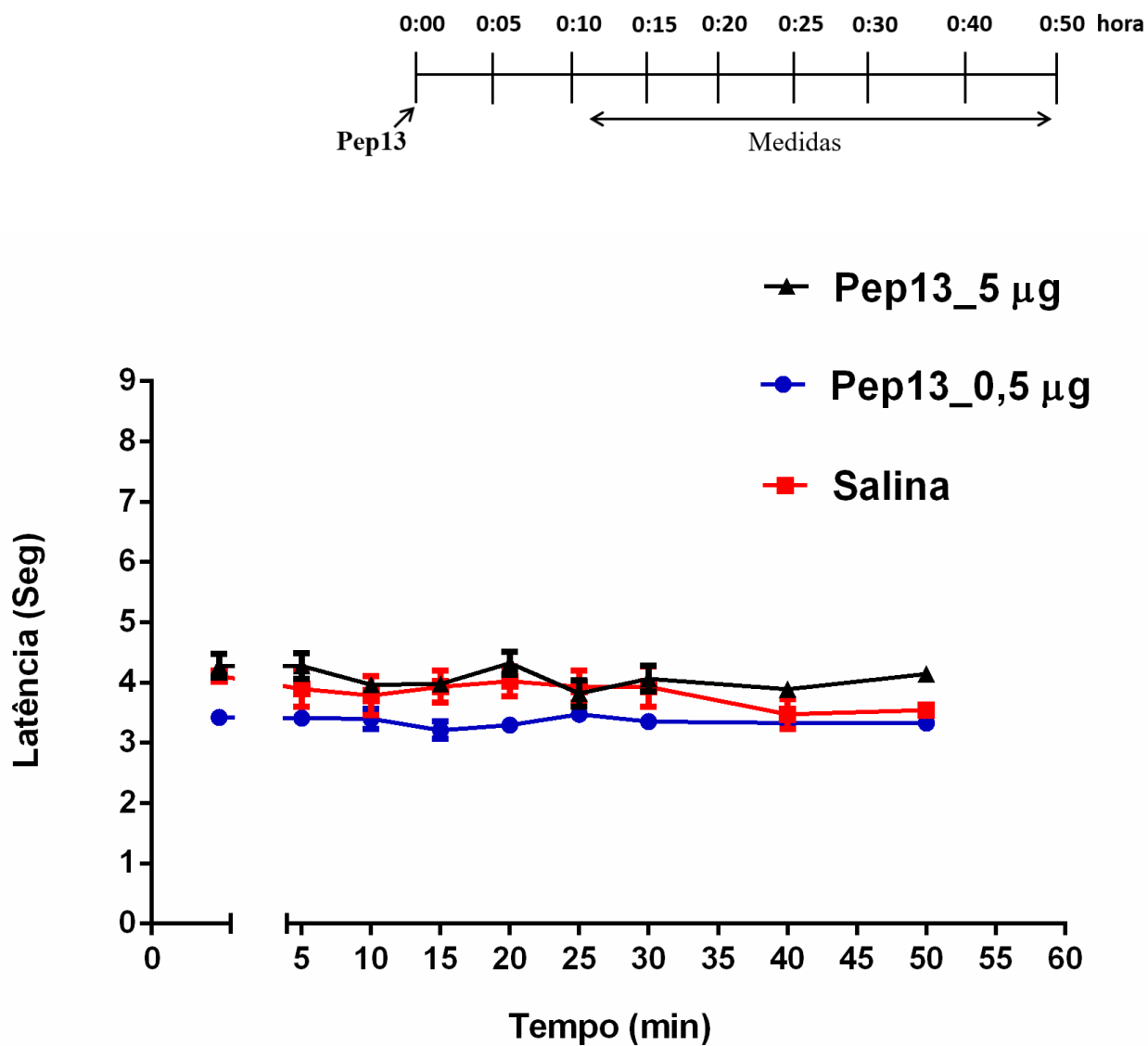


Figura 31: Efeito de administração intratecal de Pep13 mediante ao estímulo térmico. Os ratos receberam por via intratecal 0,5 e 5 µg de Pep13 ou salina. O limiar nociceptivo foi mensurado nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 minutos após a injeção de Pep13 ou salina. O momento das administrações está representado no diagrama localizado acima do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em segundos (Seg).

5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PEP13 COM *PADDLES* DE Na_v .

Os canais para sódio voltagem dependentes são particularmente implicados na condução do estímulo nociceptivo da periferia ao córtex, onde este será interpretado ao nível da consciência. Assim, a interação seletiva de toxinas animais e de peptídeos derivados destas, com os canais para sódio voltagem dependentes são uma promissora ferramenta para o melhor entendimento e tratamento da dor. Baseado nas construções de peptídeos *paddles* descritos anteriormente (MARTIN-EUCLAIRE et al., 2015), a interação das toxinas PnTx4(6-1), PnTx4-3 e do peptídeo Pep13 com os peptídeos do *paddles* foram avaliadas utilizando-se a metodologia de ressonância plasmônica de superfície (SPR).

A figura 32 mostra um gráfico representativo dos ensaios de interação da AaHII (α toxina clássica, obtida da peçonha do escorpião *Androctonus australis* Hector, utilizada como controle positivo), das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 (purificadas da peçonha de *P. nigriventer*), do peptídeo sintético Pep13 e da toxina KTX (kaliotoxina bloqueadora de canais para potássio, obtida da peçonha do escorpião *Androctonus mauretanicus*, utilizada como controle negativo) com o *paddle* do domínio DIV do $Na_v1.2$ (SIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIAAARIGRIK-Biotin).

Podemos observar a clássica interação da α toxina de *Androctonus*, AaHII na preparação do *paddle* do domínio IV de $Na_v1.2$. A ligação das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 não diferiu significativamente (One-way ANOVA) daquela observada para a toxina ativa em canais para potássio KTX (controle negativo). Assim podemos inferir que não existe uma ligação específica entre as duas toxinas purificadas da fração PhTx4 e o *paddle* $Na_v1.2$, o que fica ainda mais evidenciado no sensorgrama representativo dessa interação (Figura 33).

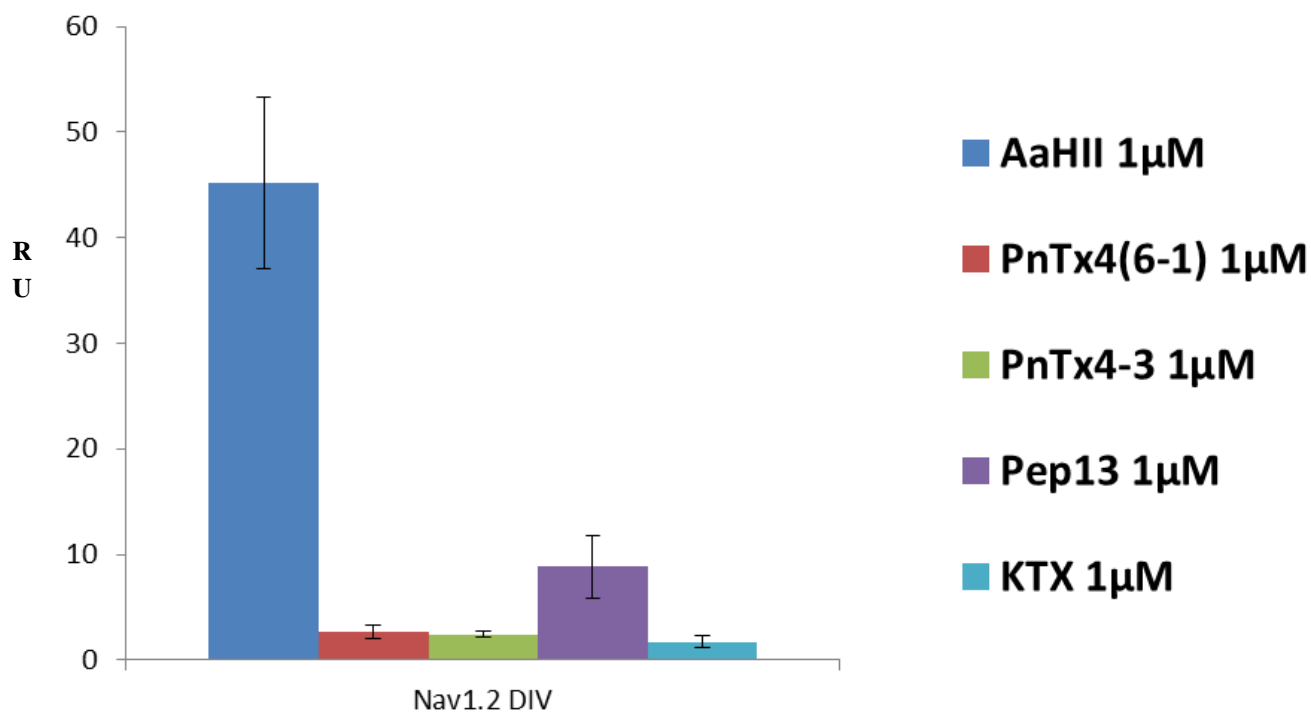


Figura 32: Ensaio de ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3, Pep13 e KTX ao peptídeo *paddle* Nav1.2 DIV (SIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIAAARIGRIK-Biotin). Ressonância plasmônica de superfície realizada em Biacore T200. Tampão de corrida fosfato de sódio (50 mM), pH 7,2 e todos os analitos foram injetados em tampão de corrida contendo 0,1 % de albumina de soro bovino. Dos valores de ligação de cada analito foram subtraídos o sinal não específico de ligação ao peptídeo Snap25.

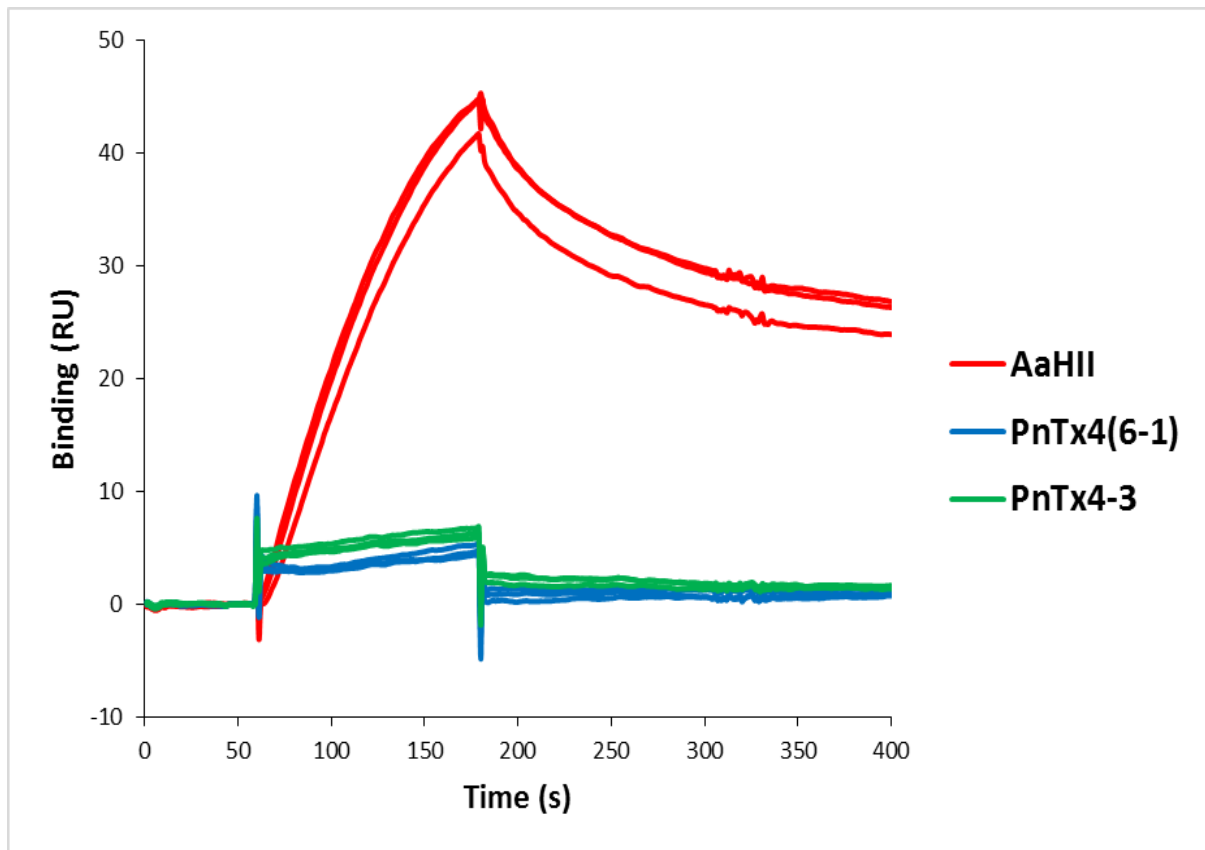


Figura 33: Sensorgrama mostrando o ensaio da ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3, ao peptídeo *paddle* Nav1.2 DIV (SIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIAAARIGRIK-Biotin). Ressonância plasmônica de superfície realizada em Biacore T200. Tampão de corrida fosfato de sódio (50 mM), pH 7,2 e todos os analitos foram injetados em tampão de corrida contendo 0,1 % de albumina de soro bovino. Dos valores de ligação de cada analito foram subtraídos o sinal não específico de ligação ao peptídeo Snap25. Cada linha do sensorgrama corresponde ao sinal obtido após a injeção de cada analito, separadamente.

Já para o peptídeo Pep13 observamos uma baixa interação com o peptídeo *paddle*, essa interação mostrou-se ligeiramente maior do que a observada para as toxinas de *P. nigriventer*, sem entretanto, apresentar diferença estatística (Figura 34).

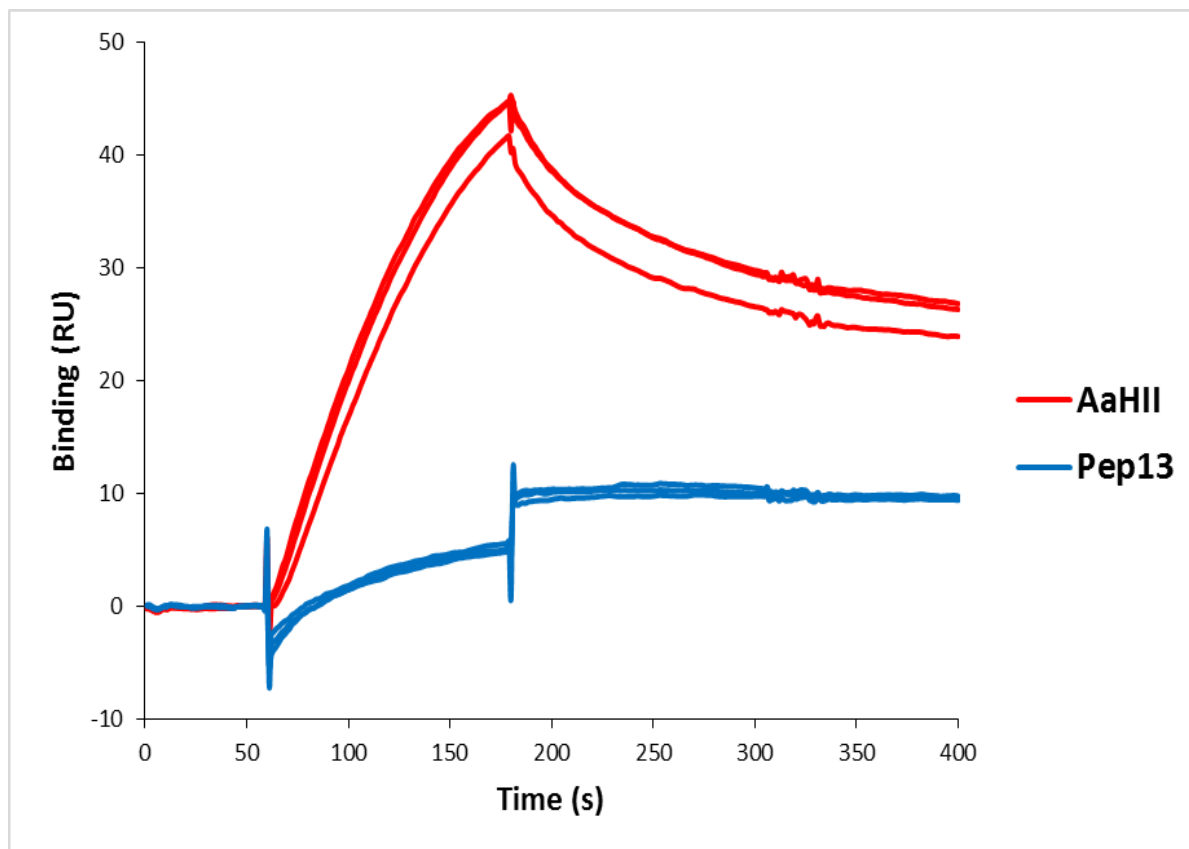


Figura 34: Sensorgrama mostrando o ensaio de ligação das toxinas AaHII e Pep13 ao peptídeo *paddle* Nav1.2 DIV (SIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIAAARIGRIK-Biotin). Ressonância plasmônica de superfície realizada em Biacore T200. Tampão de corrida fosfato de sódio (50 mM), pH 7,2 e todos os analitos foram injetados em tampão de corrida contendo 0,1 % de albumina de soro bovino. Dos valores de ligação de cada analito foram subtraídos o sinal não específico de ligação ao peptídeo Snap25. Cada linha do sensorgrama corresponde ao sinal obtido após a injeção de cada analito, separadamente.

A participação dos canais para sódio dos subtipos $\text{Na}_v1.7$, 1.8 e 1.9 na transmissão nociceptiva e sua ampla distribuição nas fibras nociceptivas já são bem caracterizadas (CUMMINS et al., 2007). Mutações no gene que codifica a sub-unidade α dos canais para sódio voltagem dependentes, $\text{Na}_v1.7$, por exemplo, levam à 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 (COX et al., 2006).

Com o objetivo de investigar a interação das toxinas PnTx4(6-1), PnTx4-3 e do peptídeo Pep13, ao peptídeo desenhado a partir do *paddle* do domínio IV do canal para sódio sensível a voltagem 1.7 ($\text{Na}_v1.7$ - SIVGMFLADLIETYFVSPTLFRVIRLARIGRILRK-Biotin) realizamos os experimentos de SPR nas mesmas condições citadas anteriormente. A figura 34 mostra um gráfico representativo dos ensaios de interação da AaHII (controle positivo), das toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4-3 e do peptídeo sintético Pep13 com o *paddle* do domínio DIV do $\text{Na}_v1.7$. Mesmo que a ligação da toxina de referência AaHII, tenha apresentado um grande desvio, a diferença entre a sua ligação e a ligação dos outros analitos testados nos parece nítida, indicando que nem as toxinas de *P. nigriventer*, nem o peptídeo sintético, se ligaram ao referido peptídeo do $\text{Na}_v1.7$.

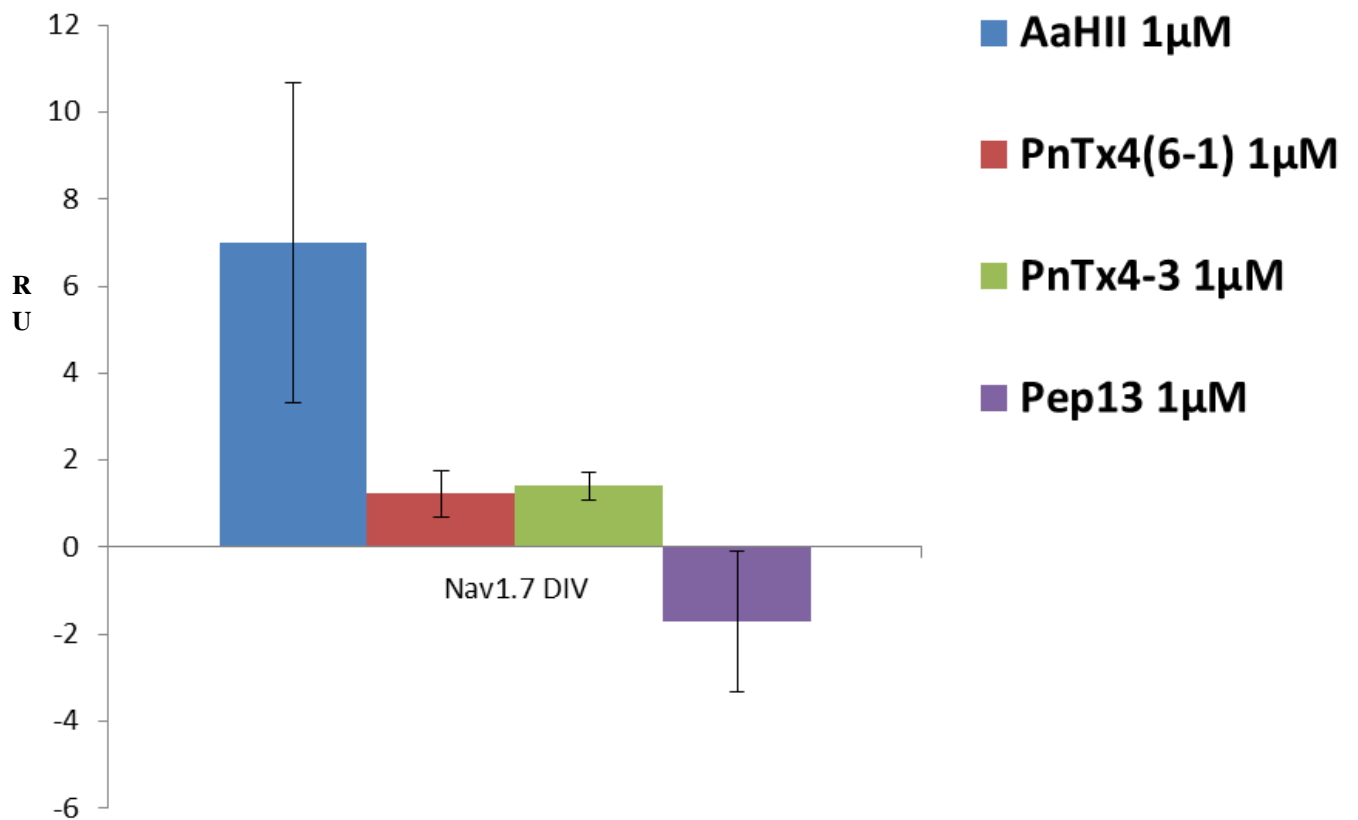


Figura 35: Ensaio de ligação das toxinas AaHII, PnTx4(6-1), PnTx4-3 e Pep13 ao peptídeo *paddle* Nav1.7 DIV (SIVGMFLADLIETYFVSPTLFRVIRLARIGRILRK-Biotin). Ressonância plasmônica de superfície realizada em Biacore T200. Tampão de corrida fosfato de sódio (50 mM), pH 7,2 e todos os analitos foram injetados em tampão de corrida contendo 0,1 % de albumina de soro bovino. Dos valores de ligação de cada analito foram subtraídos o sinal não específico de ligação ao peptídeo Snap25.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE PEP13

Após a administração de solução salina/BSA no grupo controle e de Pep13 (1 μmol) no grupo teste, as moscas (*Musca domestica*) foram observadas, quanto aos possíveis sinais de toxicidade, nos tempos de 5 e 30 minutos, 2 e 24 horas. O teste revelou que, Pep13, nessa dose, não induz nenhum efeito tóxico aparente sobre os insetos (Tabela 2). Estes resultados diferem dos observados para a toxina PnTx4(6-1), para a qual, baixas doses são letais para moscas, a DL_{50} calculada para esta toxina é de 3,8 ng, que corresponde a 0,72 nmoles (FIGUEIREDO et al., 1995). Sendo assim, mesmo em concentrações 1300 vezes superiores a aquela correspondente ao DL_{50} da toxina, o peptídeo não foi tóxico para as moscas. Portanto Pep13 não é uma molécula com propriedades inseticidas, pelo menos no inseto aqui testado, mosca doméstica.

Tabela 2 – Resultado do teste de toxicidade em moscas (*Musca domestica*). Esses são os principais sinais observados em caso de toxicidade.

Sinais	5 minutos	30 minutos	2 horas	24 horas
Salivação	-	-	-	-
Tremores nos membros	-	-	-	-
Tremores violentos do corpo	-	-	-	-
Incapacidade de voo	-	-	-	-
Incapacidade de reverter o decúbito dorsal	-	-	-	-
Morte	-	-	-	-

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os avanços no estudo de biomoléculas são inúmeros e as pesquisas sobre o mecanismo de ação de toxinas e outras moléculas, provenientes de peçonhas animais são cada vez mais promissoras quanto ao seu potencial uso como ferramentas farmacológicas (RAJENDRA et al., 2004). Muitas peçonhas possuem conteúdo altamente complexo, com centenas ou milhares de peptídeos bioativos, especialmente se considerarmos espécies co-relatas, além de outras moléculas de natureza não peptídica. As moléculas das peçonhas sofreram pressão evolutiva durante milhões de anos, o que as tornaram, em sua grande maioria, altamente seletivas e específicas para determinados alvos moleculares (DE LIMA et al. 2009; 2015; KING, 2011, ZHU et al., 2016).

A toxina PnTx4(6-1) purificada da peçonha da aranha armadeira *P. nigriventer*, além de apresentar atividade inseto tóxica (FIGUEIREDO et al., 1995), apresentou ação antinociceptiva em três diferentes modelos nociceptivos, em ratos. Esta toxina foi capaz de reverter a hiperalgesia evocada por carragenina, pela constrição do nervo ciático, e pela prostanglandina E₂, sendo que neste último modelo, constatou-se ainda, a participação dos sistemas opioide e canabinoide no efeito analgésico de PnTx4(6-1) (EMERICH et al., 2016).

Um dos grandes desafios para a exploração do potencial farmacêutico de moléculas purificadas de peçonhas animais é a pequena quantidade de material obtido após a purificação, principalmente quando estas peçonhas são extraídas de artrópodes. Figueiredo e colaboradores (1995) demonstraram que após todas as etapas de purificação da peçonha, extraída de *P. nigriventer*, a quantidade de PnTx4(6-1) obtida correspondia a apenas 0,65 % da peçonha total. Estratégias como a síntese química e a expressão destas moléculas em sistema bacteriano têm surgido, na tentativa de contornar esta limitação.

Neste trabalho, baseado na sequencia de PnTx4(6-1), PnTx4-3 e PnTx4(5-5) sintetizou-se um peptídeo de 13 resíduos de aminoácidos que foi capaz de reproduzir a atividade antinociceptiva da toxina PnTx4(6-1), no modelo de dor nociceptiva, evocado por PGE₂, quando administrado centralmente. Observou-se ainda que, Pep13 foi capaz de gerar antinocicepção quando administrado periféricamente, por via intraplantar. Verificou-se que, de forma similar à PnTx4(6-1), a ação analgésica de Pep13 envolve a participação dos sistemas opioide e canabinoide.

É interessante observar que, o peptídeo quando testado nas mesmas condições que a toxina PnTx4(6-1), foi capaz de reproduzir o efeito antinociceptivo da mesma. Ressalta-se que Pep13, quando administrado na dose de 0,5 µg (0,3 nmol), apresentou efeito antinociceptivo com a mesma duração do observado para a dose equimolar de PnTx4(6-1), 30 minutos (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre dose e duração do efeito antinociceptivo de PnTx4(6-1) e Pep13. O efeito antinociceptivo foi considerado significativo quando comparado ao controle hiperalgésico.

	Dose (nmol)	Duração do efeito antinociceptivo (min)
PnTx4(6-1)	0,38	30
	0,19	10
	0,09	5
	0,045	Sem efeito
Pep13	1,2	40
	0,6	40
	0,3	30
	0,15	Sem efeito

Uma vez que o efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1), envolveu a participação dos receptores opioides do tipo μ e δ . Utilizamos o antagonista não específico dos receptores opioides naloxona para verificar a participação deste mesmo sistema no efeito analgésico central

de Pep13. Observamos que a administração intratecal de 100 µg de naloxona antagonizou parcialmente o efeito antinociceptivo evocado pelo peptídeo. Para a toxina nativa foi observado que naloxona na dose de 100 µg exerceu antagonismo, estatisticamente, total sobre a analgesia evocada pela toxina (EMERICH et al., 2016). Uma vez que o antagonismo gerado pela naloxona sob a antinocicepção de Pep13 foi parcial é interessante pensar que o peptídeo possa agir também por outros mecanismos, que não envolvam apenas os receptores opióides. A investigação de outros possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de Pep13 estão nas perspectivas deste trabalho.

Tem sido mostrado que a antinocicepção central e periférica produzida pela morfina, um potente e seletivo agonista de receptores µ opioides, envolve, também, a liberação de canabinóides endógenos que, por sua vez, ativam receptores do tipo CB₁ (PACHECO et al., 2008, PACHECO et al., 2009). Diante dos achados de que opióides estão envolvidos no mecanismo de ação de Pep13, testamos a participação da via dos canabinóides, através da utilização de antagonistas para os receptores canabinoides do tipo CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630). Semelhantemente ao observado para PnTx4(6-1), os receptores CB₁, mas não os receptores CB₂, participam do efeito antinociceptivo. Nenhuma alteração foi observada na analgesia evocada por Pep13, quando o antagonista AM630 foi administrado por via intratecal, a dose de 100 µg. Entretanto, o antagonista dos receptores canabinoides do tipo CB₁, AM251, promoveu antagonismo parcial do efeito antinociceptivo de Pep13, quando administrado nas doses de 160 e 320 µg. Comparando-se os efeitos deste antagonista CB₁, nos experimentos envolvendo a toxina, bem como o Pep13, constatamos que uma dose duas vezes menor de AM251 (80 µg) em relação àquela utilizada para o Pep13 (160 µg) já foi capaz de gerar antagonismo parcial do efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1). Uma possível explicação poderia estar relacionada à dose

utilizada para os experimentos de antagonismo nos quais para Pep13 (0,3 nmol) foram utilizados 3 vezes a dose antinociceptiva da toxina (0,09 nmol).

Segundo [Callén e colaboradores \(2012\)](#), os receptores CB₁ são densamente expressos nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, no gânglio da raiz dorsal, nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários e na via descendente da dor. Esta ampla distribuição, pode estar relacionada ao antagonismo do AM251 sobre o efeito analgésico de Pep13, tanto ao nível medular quanto ao nível periférico.

Outro peptídeo sintetizado por nosso grupo de estudo, PnPP19, demonstrou atividade antinociceptiva frente ao estímulo térmico, quando administrado intracerebroventricularmente em camundongos (0,5 e 1 µg). Demonstrou-se ainda que este efeito é dependente da ativação dos receptores canabinoies CB₁ e opioides µ e δ ([PACHECO et al., 2016](#)). Quando o efeito de Pep13 foi avaliado frente ao estímulo térmico, pelo método de retirada da cauda, não foi observada nenhuma alteração na latência de retirada de cauda dos animais. No caso de Pep13 a administração foi realizada por via intratecal, diferindo do local de administração de PnPP19, o que pode afetar os resultados observados. É relevante ressaltar que nesse trabalho Pep13 não foi testado em nenhuma região supra espinhal. A ausência de efeito antinociceptivo frente ao estímulo térmico pode indicar que Pep13 não é capaz de modular as vias nociceptivas que envolvem os receptores térmicos, ou que ele só apresenta sua atividade antinociceptiva, quando as vias nociceptivas já estejam ativadas por algum agente hiperalgésico.

O peptídeo proposto apresenta atividade antinociceptiva mesmo sendo um peptídeo minimizado, apresentando apenas 13 resíduos de aminoácidos, se comparados aos 48 resíduos de aminoácidos que constituem a toxina. Essa atividade foi similar à de PnTx4(6-1) quando testada na via intratecal e envolveu os mesmos sistemas nociceptivos que a toxina.

O tratamento da dor com a administração intratecal de peptídeos derivados de toxinas animais já ocorre nos EUA, um exemplo é o Ziconotide (Prialt[®]), uma versão sintética da ω -conotoxina MVIIA, obtida da peçonha do gastrópode marinho *Conus magus*, usado no tratamento de dor crônica severa, que tem seu efeito analgésico relacionado a um potente e seletivo bloqueio dos canais para cálcio voltagem dependentes, do tipo N (MILJANICH, 2004). Canais para cálcio voltagem dependentes do tipo N estão presentes nas células do corno dorsal da medula espinhal, esta região possui a primeira comunicação sináptica da via nociceptiva, que recebe os impulsos vindos da periferia através das fibras A δ e C. A administração intratecal de ziconotide interfere no processamento da informação sensorial neste nível, reduzindo a transmissão do sinal doloroso pelo trato espinotalâmico aos centros cerebrais de dor (SCHMIDTKO et al., 2010). Pela sua ação nos canais para cálcio (tipo N) do sistema nervoso central, o ziconotide apresenta uma janela terapêutica limitada, pacientes que receberam ziconotide tiveram um risco muito maior de apresentarem tontura, confusão, ataxia, marcha anormal e comprometimento da memória (RAUCK et al., 2006).

Nota-se, portanto, que tratamentos pela administração intratecal de analgésicos podem não ser a melhor alternativa. Assim, buscar fármacos que apresentem um efeito periférico local é de extrema relevância. Uma vez demonstrado o efeito antinociceptivo de Pep13 quando administrado por via intratecal, averiguou-se se este peptídeo também apresentava atividade analgésica quando administrado perifericamente, frente a hiperalgesia evocada por PGE₂.

Foram testadas as doses de 2,5; 5; 10 e 20 μ g de Pep13 e observou-se que as quatro doses são capazes de reverter a hiperalgesia na pata dos ratos, tendo o maior efeito antinociceptivo 5 minutos após a administração. A duração deste efeito foi dose dependente, variando de 10 a 50 minutos, de acordo com o aumento das doses.

Para verificar se o efeito periférico de Pep13 era local ou sistêmico, realizamos o experimento de exclusão do efeito não local e constatamos que o efeito antinociceptivo acontece localmente, uma vez que a administração de 20 µg do peptídeo na pata direita do animal não alterou a hiperalgesia avaliada na pata contralateral esquerda. Assim os experimentos para a investigação do mecanismo de ação de Pep13, utilizando-se doses de 10 e 2,5 µg asseguram o efeito local do peptídeo.

Uma vez observada a participação do sistema opioide no efeito medular de Pep13, utilizamos o mesmo antagonista não específico, naloxona, para verificar a participação deste sistema também em nível periférico. Naloxona (100 µg), administrada por via intraplantar, foi capaz de antagonizar parcialmente, o efeito antinociceptivo do peptídeo (10 µg).

Buscando-se compreender porque a Crotalina (peptídeo derivado da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*) exibia longo e potente efeito antinociceptivo apenas na presença de inflamação, **Zambelli e colaboradores (2014)** demonstraram que a administração de PGE₂ aumenta os níveis de expressão periférica de RNAs mensageiros dos receptores opioides µ, δ e κ e os níveis de expressão das proteínas dos receptores µ e κ, três horas após sua administração. Apesar de ainda não terem sido realizados os experimentos para verificar quais receptores opioides estão especificamente envolvidos neste efeito, foi observado para a toxina PnTx4(6-1) o envolvimento medular dos receptores opioides µ e δ (**EMERICH, et al., 2016**). Não existem evidências que indiquem que esta toxina ative diretamente os receptores opioides. Em trabalho realizado por **Freitas e colaboradores (2016)**, observou-se também a participação dos receptores opioides do tipo µ e δ no efeito antinociceptivo de outro peptídeo sintético, de 19 resíduos de aminoácidos, chamado PnPP19. Dentre os peptídeos opioides endógenos, os únicos que se ligam tanto aos receptores µ quanto δ, sem se ligarem aos receptores κ são as Leu-encefalinas e as Met-encefalinas, cujas sequências são Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL) e Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (YGGFM), respectivamente (**RANG et al., 1995; MCDONALD & LAMBERT, 2005**). Observou-se que PnPP19 é capaz de inibir a neprilisina, uma endopeptidase responsável pela clivagem de vários peptídeos endógenos, entre eles o peptídeo

opioide Leu-enkefalina (FREITAS, et al., 2016). Observa-se, portanto, que a ação analgésica pode envolver tanto a ativação direta desses receptores quando a modulação do metabolismo dos opioides endógenos.

A interação entre os sistemas opioide e canabinoide na modulação nociceptiva vem sendo demonstrada, já foi verificado, por exemplo, que a ativação periférica dos receptores CB₁ pelo endocanabinoide anandamida leva à liberação de opioides endógenos (REIS et al., 2009). Observou-se também que, efetivamente ocorre formação de heterodímeros entre receptores δ -opioides e receptores canabinoides do tipo CB₁ (BUSHLIN et al., 2012; ROZENFELD et al., 2012). A modulação entre os receptores δ -opioides e CB₁ pode ser observada pelo fato de que a ligação de agonista CB₁ ao seu receptor leva ao aumento da ligação do agonista δ -opioide ao seu receptor específico, aumentando a sinalização via opioide. Isso indica que a ligação do agonista CB₁ altera a conformação do seu receptor específico, modificando assim a sua interação com o receptor opioide, fazendo com que este último se torne mais propenso à ligação do seu agonista específico (BUSHLIN et al., 2012).

Uma vez observada a participação do sistema opioide, verificou-se a participação do sistema canabinoide na ação antinociceptiva periférica de Pep13. Verificou-se que o antagonista para os receptores CB₁, AM251 nas doses de 160 e 320 μ g, foi capaz de prevenir parcialmente a analgesia evocada pelo peptídeo, quando ambos foram administrados perifericamente. Como observado para o efeito central do peptídeo, o antagonista AM630, na dose de 100 μ g, não antagonizou o efeito de Pep13, indicando que apenas os receptores canabinoides do tipo CB₁ participam da analgesia evocada pelo peptídeo.

A anandamida é um agonista endógeno para ambos os receptores canabinoides CB₁ e CB₂, apesar de apresentar maior afinidade para os receptores CB₁ (LIN et al., 1998). Tem sido proposto que o efeito biológico da anandamida é rapidamente finalizado pelo sistema de recaptação que a transporta para a célula, onde a mesma é rapidamente hidrolisada (DI MARZO

et al., 1994). A enzima responsável pela hidrólise da anandamida é a FAAH que libera como produtos: ácido araquidônico e etalonamina (HOHMANN AND SUPLITA, 2006). Assim, utilizamos MAFP, inibidor da enzima FAAH, e VDM11, inibidor do transportador de membrana da anandamida, para avaliar o envolvimento dos canabinoides endógenos no efeito antinociceptivo periférico, induzido pela administração de Pep13 (2,5 µg). Em ambos os casos observamos que o pré-tratamento com os inibidores aumentou o efeito antinociceptivo evocado pela dose submáxima de Pep13. É importante ressaltar que, MAFP na dose de 0,5 µg e VDM11 na dose de 2,5 µg, quando administrados perifericamente, não foram capazes de alterar a hiperalgesia evocada por PGE₂, na pata dos animais.

A participação dos canais iônicos nos processos nociceptivo e antinociceptivo já é muito bem estabelecida. O Ziconotide (Prialt®) é o mais recente exemplo de droga sintética, derivada da ω-conotoxina MVIIA, que tem sua ação pelo bloqueio seletivo dos canais para cálcio do tipo-N. Várias toxinas purificadas da peçonha da aranha *P. nigriventer* exercem ação antinociceptiva pela modulação de canais iônicos. PnTx3-4 bloqueia canais para cálcio voltagem dependentes com baixa especificidade e apresenta efeito antinociceptivo nas duas fases: inflamação, induzida por formalina, e no modelo de dor por incisão, ambos em camundongos. O efeito antinociceptivo observado no teste de formalina foi associado pelos autores, com a redução dos níveis de glutamato no fluido cérebro-espinhal. Eles sugerem, portanto que o efeito antinociceptivo de PnTx3-4 se dê tanto pelo bloqueio dos canais para cálcio, quanto pela redução dos níveis de glutamato (DA SILVA et al., 2015).

São descritas na literatura diversas toxinas que além de sua ação inseticida apresentam também ação antinociceptiva em modelos murinos (TAN et al., 2001; CHEN et al., 2006; LIU et al., 2008). Uma toxina altamente tóxica para insetos β/δ-PrIT1, purificada da peçonha da aranha *Phoneutria reidy*, apresenta 77 % e 65 % de similaridade às toxinas PnTx4(5-5) e PnTx4(6-1),

respectivamente. Foi demonstrado que essa toxina interage com alta afinidade com preparação sinaptosomal de corda nevosa de barata. Além disso, em experimentos eletrofisiológicos, em gânglio de baratas, demonstrou-se que β/δ -PrIT1 é capaz de aumentar o influxo de sódio pelo retardo da inativação dos canais e de alterar a ativação dos canais para sódio para potenciais mais negativos, mostrando características tanto de α toxinas quanto β toxinas (OLIVEIRA et al., 2015).

Em 2010, Oliveira, em seu trabalho de mestrado, descreveu a atividade analgésica da toxina, purificada da peçonha de *P. nigriventris*, PnTx4(5-5), nos modelos de dor nociceptiva e inflamatória. Demonstrou-se ainda que a toxina é capaz de reverter a hiperalgesia periférica, evocada pela administração de L-glutamato. Esta toxina foi inicialmente descrita como uma neurotoxina inseticida e capaz de inibir, seletivamente, as correntes evocadas pelo receptor de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios de ratos (FIGUEIREDO et al., 2001). A fim de obter-se maior quantidade de PnTx4(5-5) esta foi expressa em sistema heterólogo, em *Escherichia coli* e testada em canais para sódio transfectados em ovócitos de *Xenopus laevis*. Além de retardar a inativação de canais para sódio de insetos, no caso os de barata, *Blattella germanica* (Na_vBg), a toxina recombinante inibiu o pico de amplitude das correntes, quando testada em canais para sódio humanos transfectados ($\text{Na}_v1.2$ à $\text{Na}_v1.6$), sendo essa inibição menor nos subtipos $\text{Na}_v1.2$ e $\text{Na}_v1.4$ e mais significativa no $\text{Na}_v1.3$ (PAIVA et al., 2016).

Assim, a interação seletiva de toxinas animais e de peptídeos derivados destas, com os canais para sódio voltagem dependentes, são uma promissora ferramenta para o melhor entendimento e tratamento da dor. Baseado nas construções de peptídeos *paddles* descritos anteriormente, a interação das toxinas PnTx4(6-1), PnTx4-3 e do peptídeo Pep13 com os peptídeos do *paddles* de $\text{Na}_v1.2$ foram avaliadas utilizando-se a metodologia de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Observamos que nem as toxinas PnTx4-3, PnTx4(6-1) nem o

peptídeo Pep13 apresentaram ligação ao paddles se comparados estatisticamente à toxina AaHII (controle positivo). Nossos resultados, vão de encontro aos obtidos por Paiva e colaboradores (2016), mostrando que a toxina recombinante PnTx4(5-5), que apresenta 63 % de identidade à PnTx4(6-1), teve menor efeito nos canais $Na_v1.2$, quando comparado aos outros subtipos testados. Percebe-se ainda que a ligação de Pep13 teve um leve aumento, se comparado à ligação da KTX (controle negativo), aumento que não foi estatisticamente significativo, utilizando One-way ANOVA como teste.

Buscando-se entender melhor a ação de nossos peptídeos, nossa colega Ana Cristina Nogueira Freitas, em colaboração com o Laboratório Toxicology and Pharmacology, KU Leuven, na Bélgica, os testou em alguns canais e receptores de membranas, transfectados em ovócitos de *Xenopus leavis*. A atividade de Pep13 (1 μ M) foi avaliada em ovócitos transfectados com canais para sódio voltagem dependentes dos subtipos 1.3 e 1.8 e nenhuma alteração nas correntes para sódio foi observada. Testou-se também a interação de Pep13 com os receptores opióides μ e δ transfectados nos ovócitos, e nenhuma alteração das correntes foi observada, indicando mais uma vez, que não existe interação direta entre Pep13 e esses receptores e que a modulação dessa via se dá, provavelmente por outro mecanismo.

Finalmente, utilizamos o programa SEA (<http://sea.bkslab.org/>) para predizer possíveis alvos moleculares para o peptídeo Pep13, que pudessem ser investigados. O programa indicou inúmeros possíveis alvos para o peptídeo, dentre eles receptores de Melanocortina e receptores do neuropeptídeo γ , e um antagonista dos receptores de neurocinina NK_2 (Figura 36).

Code	#Ligands	Reference Name	E-value	MaxTC	Molecules
1 CXCR4_HUMAN_10000	122	C-X-C chemokine receptor type 4	2.67e-14	0.32	view >>
2 GASR_MOUSE_10000	339	Cholecystokinin B receptor	1.80e-6	0.30	view >>
3 MSHR_HUMAN_10000	102	Melanocortin receptor 1	2.95e-5	0.34	view >>
4 MSHR_MOUSE_10000	19	Melanocortin receptor 1	4.51e-5	0.29	view >>
5 TYTR_TRYCR_10000	28	Trypanothione reductase	8.69e-4	0.32	view >>

Code	#Ligands	Reference Name	E-value	MaxTC	Molecules
1 NPY4-R+	15	neuropeptide Y receptor type 4 [+]	1.94e-33	0.39	view >>
2 NPY2-R+	13	neuropeptide Y receptor type 2 [+]	1.64e-27	0.39	view >>
3 NPY5-R+	13	neuropeptide Y receptor type 5 [+]	1.64e-27	0.39	view >>
4 NPY4-R-	20	neuropeptide Y receptor type 4 [-]	5.17e-27	0.39	view >>
5 NPY1-R+	16	neuropeptide Y receptor type 1 [+]	1.56e-23	0.39	view >>

Code	#Ligands	Reference Name	E-value	MaxTC	Molecules
1 42733	462	Neurokinin NK2 Antagonist	5.21e-8	0.38	view >>
2 60110	11	Bacterial Vaccine	1.97e-7	0.32	view >>
3 12470	108	Neurologic Agent	4.08e-7	0.39	view >>
4 70500	19	Antifungal Activity Enhancer	1.31e-4	0.33	view >>
5 27523	195	Cystic Fibrosis, Agent for	5.33e-4	0.38	view >>

Figura 36: Lista de possíveis alvos moleculares preditos pelo programa SEA, para o peptídeo Pep13 (KEISER et al., 2007).

Várias linhas de pesquisa têm sugerido o envolvimento do sistema de melanocortina na nocicepção, a administração intratecal de um agonista dos receptores de melanocortina reduz a alodinia mecânica e ao frio, na injúria promovida por constrição do nervo ciático (VRINTEN et al., 2000). A interação entre os sistemas melanocortina e opioide já vem sendo explorada, observou-se que a administração periférica, ou intracerebroventricular de melanocortinas, antes ou concomitante à morfina, atenua a analgesia induzida por este agonista opioide (CONTRERAS & TAKEMORI, 1984), demonstrou-se ainda, que melanocortinas podem inibir a tolerância causada pela morfina (SZEKELY et al., 1979).

O neuropeptídeo Y é um neuropeptídeo de 36 resíduos de aminoácidos que medeia diversas funções biológicas pela ativação de seus diferentes receptores acoplados a proteína G. O efeito deste neuropeptídeo na modulação nociceptiva já foi extensamente estudado e mostrou-se

que o receptor Y_1 é requerido para a indução da analgesia pelo neuropeptídeo Y (LI et al., 2002; SILVA et al., 2002). Li e colaboradores observaram ainda que, o efeito antinociceptivo do neuropeptídeo Y foi atenuado pela administração, no núcleo accumbens, do antagonista opioide naloxona.

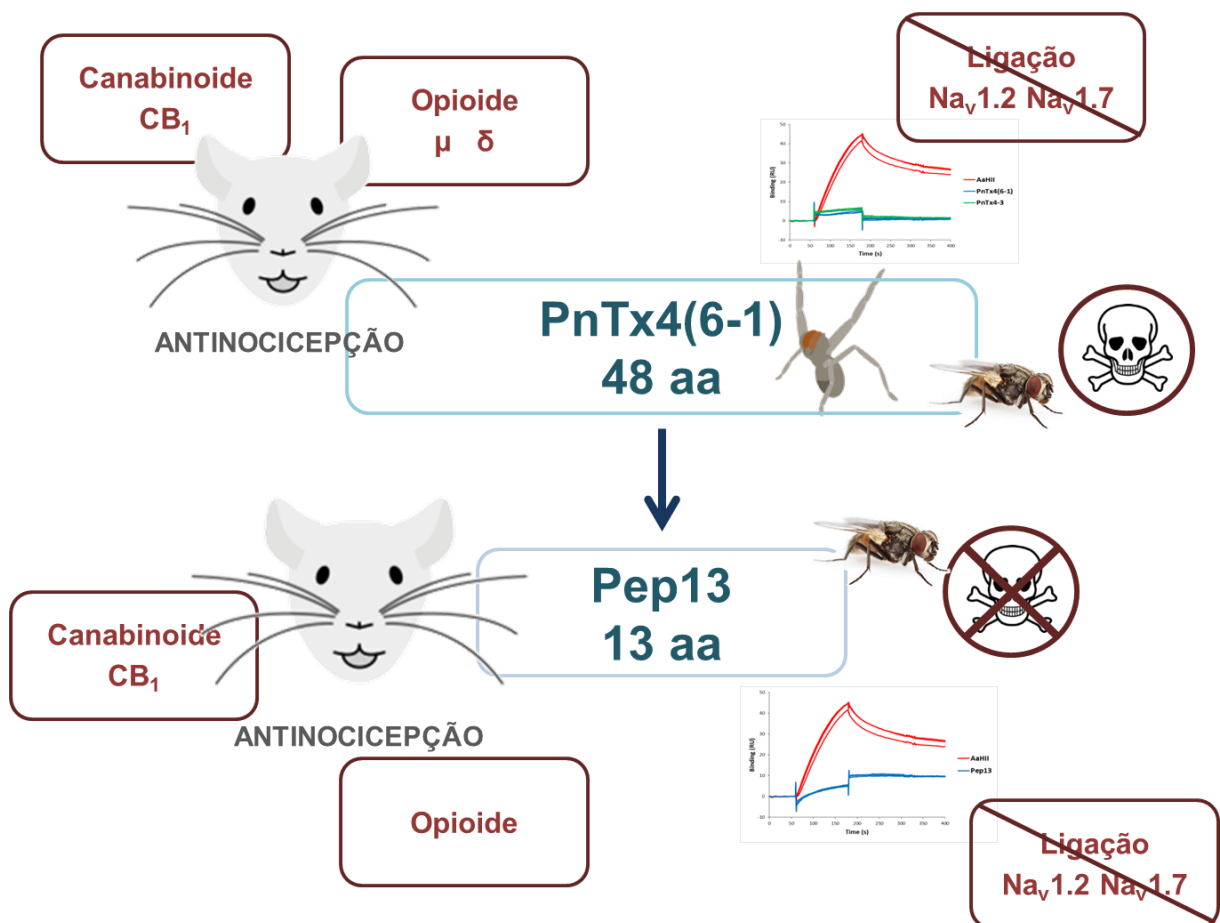
A ação farmacológica das taquicininas é mediada por três diferentes receptores de neurocininas NK_1 , NK_2 e NK_3 (PATACCHINI et al., 1995). A participação das taquicininas na hiperalgesia visceral, não inflamatória, intestinal foi demonstrada pela administração espinal de antagonistas para os receptores de taquicininas. Os antagonistas dos receptores NK_1 e NK_3 foram capazes de reverter a hiperalgesia visceral em ratos (GAUDREAU & PLOURDE, 2003).

Todos esses alvos indicados pelo SEA são potencialmente interessantes para a investigação do mecanismo de ação de Pep13, o que certamente abrirá caminhos para novos ensaios farmacológicos e sobretudo, contribuir para possíveis indicações de novos modelos de drogas antinociceptivas.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Obtivemos êxito no desenho e síntese de um peptídeo antinociceptivo bioinspirado nas toxinas antinociceptivas da fração PhTx4 da peçonha da aranha *P.nigriventer*. Este peptídeo, denominado Pep13 reproduziu a atividade antinociceptiva da toxina de referência, PnTx4(6-1), com a mesma eficácia que a mesma. Constatou-se que Pep13 apresenta atividade antinociceptiva tanto medular quanto periférica e que essa atividade envolve a participação dos sistemas canabinoide e opioide.



Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Para continuação desse trabalho propomos:

- Determinar quais receptores opioides estão envolvidos no efeito antinociceptivo do peptídeo, a nível periférico;
- Explorar outras vias nociceptivas para melhor entendimento do mecanismo de ação de Pep13, baseando-se principalmente, nas indicações de alvos moleculares, pelo SEA;
- Averiguar a possível imunogenicidade do peptídeo;
- Estudar a histopatologia de diferentes tecidos de animais injetados com o peptídeo;
- Determinar a estrutura secundária do peptídeo, utilizando-se a técnica de dicroísmo circular;
- Obter outras variáveis sintéticas do peptídeo, visando-se potencializar seu efeito e compreender a relação estrutura-função na atividade antinociceptiva.

Referências

9 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N. et al. **Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors.** *Nature Neurosci.* London, v. 10, n. 7, p. 870-879, Jul. 2007.
- ALVES, D. P. et al. **NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation.** *Nitric Oxide (Print)*, v. 28, p. 8-13, 2013.
- Azur Pharma, Inc. Prialat (ziconotide) injection, solution. US prescribing information; 2011. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2011/021060s006ltr.pdf (Acesso 08 de Abril, 2017).
- 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.
- BISOGNO, T. et al. **The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects.** *Pharmacol Biochem Behav*, Terrytown (NY), v. 81, n. 2, p. 224–238, Jun. 2005.
- BORGES, M. H. et al. **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. et al. **Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels.** *Nature [S.I.]*, v. 456, n. 7219, p. 202-208, 2008.
- BOSMANS, F.; SWARTZ, K. J. **Targeting voltage sensors in sodium channels with spider toxins.** *Trends in Pharmacological Sciences [S.I.]*, v. 31, n. 4, p. 175-182, 2010.
- BURGESS, P. R.; PERL, E. R. **Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin.** *Journal of Physiology*. 190, 541–562, 1967.
- BUSHLIN, I. et al. **Dimerization with Cannabinoid Receptors Allosterically Modulates Delta Opioid Receptor Activity during Neuropathic Pain.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, e49789, 2012.
- CADAS, H. et al. **Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine in rat brain.** *J Neurosci*, Washington (DC), v. 17, n. 4, p. 1226–1242, Feb. 1997.
- CAI, Q. et al. **Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons.** *Brain Res.* 1554:12–20, 2014.

- CALLÉN, L. et al. **Cannabinoid Receptors CB₁ and CB₂ Form Functional Heteromers in Brain**. The Journal of Biological Chemistry. 287(25):20851-20865, 2012.
- CAPOCASALE, R. **Las arañas peligrosas del Uruguay**. Aracnología. Suplemento 1:1-24, 1984.
- CATTERALL, A. et al. **Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins**. Toxicon 49, 124–141, 2007.
- CATTERALL, W. A. **Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology**. The Journal of Physiology [S.I.], v. 590, n. 11, p. 2577-2589, 2012.
- CHAN, W.C.; WHITE, P.D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. Oxford University Press, 2000.
- CHEN, J. et al. **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.
- COHEN, M. M. **The history of opium and opiates**. Tex Med, 65:76-85, 1969.
- CONTRERAS, P. C., TAKEMORI, A. E. **Antagonism of morphine-induced analgesia, tolerance and dependence by alpha-melanocyte-stimulating hormone**. J. Pharmacol. Exp. Ther. 229, 21–26, 1984.
- COX, J. J. et al. **An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain**. Nature. 444:894–98, 2006.
- CUMMINS, T. R. et al. **The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain**. Pain, 131, 243, 2007.
- D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. **A method for determining loss of pain sensation**. J Pharmacol Exp Ther. Baltimore (MD), v. 72, n. 1, p.74-79, May 1941.
- DA SILVA, J. F. et al. **Characterization of the antinociceptive effect of PhTx3-4, a toxin from *Phoneutria nigriventer*, in models of thermal, chemical and incisional pain in mice**. Toxicon 108, 53–61, 2015.
- DALMOLIN, G. D. et al. **Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3–3 in animal models of neuropathic pain**. Pain, 152, 2224–2232, 2011.
- DE LIMA, M. E. et al. **Animal Toxins: State of the art – Perspectives in health and Biotechnology**. 1st ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 750 p, 2009. ISBN 9788570417350.

- DE LIMA, M. E. et al. **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. et al. ***Phoneutria nigriventer* Venom and Toxins: A Review.** *Spider Venoms, Series Toxinology.* pp 1-24. March 2015.
- DE LIMA, M. E. et al. **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. et al. **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.
- DEVANE, W. A. et al. **Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.** *Mol Pharmacol, Bethesda (MD),* v. 34, n. 5, p. 605–613, Nov. 1988.
- DEVANE, W.A. et al. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science, Washington (DC),* v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, Dec. 1992.
- DI MARZO, V. et al. **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** *Nature, London,* v. 372, n. 6507, p. 686–691, Dec. 1994.
- DI, S. et al. **Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus.** *J Physiol, London,* v. 569, n. 569, p. 751–760, Dec. 2005.
- 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.
- DOS SANTOS R. G. et al. ***Phoneutria nigriventer* ω -phonetoxin IIA blocks the Ca v2 family of calcium channels and interacts with ω -conotoxin-binding sites.** *J Biol Chem.* 277:13856–62, 2002.
- DROES, N. S. **Role of nurse practitioner in managing patients with pain.** *Internet J Adv Pract,* v. 6, n. 2, 2003.
- 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.
- EMERICH, B. L. et al. **δ -Ctenitoxin-Pn1a, a Peptide from *Phoneutria nigriventer* Spider Venom, Shows Antinociceptive Effect Involving Opioid and Cannabinoid Systems, in Rats.** *Toxins.* 8, 106, 2016.

- ENDRES-BECKER, J. et al. **Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain.** Mol. Pharmacol. 71:12–18, 2007.
- ENTWHISTLE, I. D. et al. **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.
- FELDER, C. C. et al. **Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors.** Mol Pharmacol. 48:443–50, 1995.
- FIGUEIREDO, S. G. et al. **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. et al. **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. et al. **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.
- FOX, A. et al. **The role of central and peripheral cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain.** Pain, Amsterdam, v. 92, p. 91–100, May 2001.
- FREITAS, A. C. et al. **PnPP-19, a spider toxin analogue, induces peripheral antinociception through opioid and cannabinoid receptors and inhibition of Neutral endopeptidase.** Br. J. Pharmacol, 7, 2016.
- FÜRST, S. **Transmitters involved in antinociception in the spinal cord.** Brain Res, Bull, v. 48, p. 129-141, 1999.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, R. **Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish.** J Am Chem Soc. New York, v. 86, p.1646–1647, 1964.
- GAUDREAU, G-A; PLOURDE, V. **Role of tachykinin NK₁, NK₂ and NK₃ receptors in the modulation of visceral hypersensitivity in the rat.** Neuroscience Letters 351, 59–62, 2003.
- GEBREMEDHIN, D. et al. **Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca₂₊ channel current.** Am J Physiol, Bethesda (MD), v. 266, n. 6 (Pt. 2), p. H2085–H2093, Jun. 1999.

- GLASS, M.; NORTHUP, J. K. **Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors.** Mol Pharmacol. 56:1362–9, 1999.
- GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. **DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro.** Neurosci. Lett. 212:83–86, 1996.
- GOLDSTEIN, A.; NAIDU, A. **Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures.** Mol Pharmacol, Bethesda (MD), v.36, n. 2, p. 265-272; Aug. 1989.
- GÓMEZ DEL PULGAR, T. et al. **Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway.** J Biol Chem Baltimore (MD), v. 277, n. 39, p. 36527–36533, Sep. 2002.
- GOMEZ, M. V. et al. **Phoneutria nigriventer Venom: A Cocktail of Toxins that affect Ion Channels.** Cellular and Molecular Neurobiology. 22:579-588, 2002.
- GONÇALVES et al. **Antinociceptive properties of the mastoparan peptide Agelaia-MPI isolated from social wasps.** Toxicon. Sep 15; 120:15-21, 2016.
- HANUS, L. et al. **2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor.** Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC), v. 98, n. 7, p. 3662–3665, Mar. 2001.
- HASANI, R. AL.; BRUCHAS, M. R. **Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior.** Anesthesiology. December; 115(6): 1363–1381, 2011.
- HERKENHAM, M. et al. **Cannabinoid receptor localization in brain.** Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC), v. 87, p. 1932–1936, 1990.
- HESCHELER, J. et al. **The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels.** Nature, London, v. 325, n. 6103, p. 445–447, Feb. 1987.
- HOHMANN, A. G. et al. **Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord.** Brain Res, Amsterdam, v. 822 , n. 1-2, p. 17–25, Mar, 1999.
- HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L. **Endocannabinoid mechanisms of pain modulation.** AAPS Journal, 8: E693–E708, 2006.
- HÖLLT, V. **Precursors of opioid peptides and their gene regulation.** Clin Neuropharmacol. 15(Suppl 1 Pt A):50A–1A, 1992.
- HUANG, S. M. et al. **An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors.** Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC), v. 99, n. 12, p. 8400–8405, Jun. 2002.

IASP. Parte III: Termos de dor, uma lista atual com definições e notas de uso" (pp 209-214) Classificação da Dor Crônica, Segunda Edição, Força Tarefa da IASP sobre Taxonomia, editada por H. Merskey e N. Bogduk, IASP Press, Seattle, © 1994. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain> acesso 04/01/2019.

INGRAM, S. L.; WILLIAMS, J. T. **Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase.** Neuron 13:179–86, 1994.

JACOB, A.; TODD, A. R. **Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol.** J. Chem. Soc., 649–653, 1940.

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.

JONSSON, A. P. **Mass spectrometry for protein and peptide characterization.** CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 58: 868-884, 2001.

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

KANDEL, E. et al. **Principles of Neural Science.** 4th edition. New York: McGraw Hill, 2000.

KANDEL, E.R. et al **Princípios da Neurociência.** São Paulo: Manole. p. 73-491, 2003.

KEISER, M. J. et al. **Relating protein pharmacology by ligand chemistry.** Nat Biotech. 25 (2), 197-206, 2007.

KEYSERLING, E. 1891. **Die spinnen amerikas. Brasilianische spinnen.** 3: 1-278. Nürnberg.

KIM, J. et al. **Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus.** J Neurosci, Washington (DC), v. 22, n. 23, p. 10182–10191, Dec. 2002.

KING, G. F. et al. **A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals.** Toxicon, 52, 264–276, 2008.

KING, G. F. **Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics.** Expert Opin Biol Ther, London, v.11, n. 11, p. 1469-84, Nov. 2011.

LAW, P. Y. et al. **Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling.** Annu Rev Pharmacol Toxicol, Palo Alto (CA), v. 40, p. 389 -430, 2000.

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. et al. **Animal Models of Nociception**. Pharmacological Reviews. 53, 597-652, 2001.

LI, Y. et al. **Anti-nociceptive effect of neuropeptide Y in the nucleus accumbens of rats: an involvement of opioid receptors in the effect**. Brain Res. 940:69–78, 2002.

LIN, S. et al. **Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors and metabolic stability**. J Med Chem 41: 5353–5361, 1998.

LIU, T. et al. **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.

LUTZ, B. **Molecular biology of cannabinoid receptors**. Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids, Edinburgh, v. 66, n. 2-3, p. 123–142, Feb.-Mar. 2002.

MACHADO, F. C. et al. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine. Br. J. Pharmacol. 171, 961–972, 2014.

MACKIE, K. **Cannabinoid receptors as therapeutic targets**. Ann Rev Pharmacol Toxicol, Palo Alto (CA), v. 46, p. 101–22, 2006.

MACKIE, K. et al. **Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor**. J Neurosci, Washington (DC), n. 15, v. 10, p. 6552– 6561, Oct. 1995.

MACKIE, K.; HILLE, B. **Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells**. Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC), n. 89, v. 9, p. 3825–3829, May 1992.

MAFRA, R. A. et al. **PhTx4, a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes**. Brain Res. in press, 1999.

MAGALHÃES, B. L. E. **Efeito antinociceptivo da toxina PnTx4(6-1), isolada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MARTIN, W. R. **Pharmacology of opioids**. Pharmacol Ver, 35:283-303, 1983.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. **Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice**. Neurosci. Lett. 482, 45–50, 2010.

- MARTIN-EAUCLAIRE, M-F. et al. **A surface plasmon resonance approach to monitor toxin interactions with an isolated voltage-gated sodium channel paddle motif.** J. Gen. Physiol. Vol. 145 No. 2 155–162, 2015.
- 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. et al. **Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics.** Biochemistry. (Easton), v. 48, p. 3078-3088, 2009.
- MATSUDA, L. A. **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** Nature, London, v. 346, n.6284, p. 561–564, Aug. 1990.
- MCDONALD, J.; LAMBERT, D. G. **Opioid receptors.** Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. v. 5, n. 1, p. 22-25, 2005.
- MCGIVERN, J. G. **Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain.** Neuropsychiatr. Dis. Treat. 3, 69–85, 2007.
- MECHOULAM, R. et al. **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** Biochem Pharmacol, Oxford, v. 50, n. 1, p. 83–90. Jun. 1995.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. **Pain mechanisms: a new theory.** Science, Washington (DC), v. 150, n. 3699, p. 971-979, Nov. 1965.
- MESTRE, C. et al. **A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats.** J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 32:197-200, 1994.
- MEUNIER, J. C. et al. **Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor.** Nature, London, v. 377, n.6549, p. 532-535. Oct. 1995.
- MILJANICH, G. P. **Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain.** Curr Med Chem, Schiphol (Netherlands), v. 11, n. 23, p. 3029-3040, Dec. 2004.
- MILLAN, M. J. **Descending control of pain.** Prog. Neurobiol, Oxford, v. 66, p. 3474-555, Apr. 2002.
- MOTTA, P. G. et al. **Modulation of peripheral inflammatory pain thresholds by m₁ and nicotinic receptor antagonists.** Pharmacology. 88:309–315, 2011.
- MUNRO, S. et al. **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** Nature, London, v. 365, n. 6441, p. 61–65, Sep. 1993.

NOCK, B. **κ and ϵ Opioid receptor binding.** In *The Pharmacology of Opioid Peptides* (Tseng, L.F., ed.), pp. 29–56, Harwood Academic Publishers GMBH. 1995.

NORTH, R. A. et al. **Mu and delta receptors belong to a family of receptors that couple to potassium channels.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington (DC)*, v. 84, n. 15, p. 5487–5491, Aug.1987.

O'SHAUGHNESSY, W. B. **On the preparations of the Indian hemp (*Cannabis indica*); their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases.** *Transactions of the Medical and Physical Society, Bengal* 71– 102, 421–426, 1840.

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. et al. **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.

OLIVEIRA, L. C. et al. **β/δ -PrIT1, a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria reidyi* (F.O. Pickard-Cambridge, 1897).** *Toxicon* 104, 73e82, 2015.

PACHECO, D. F. et al. **A spider derived peptide, PnPP-19, induces central antinociception mediated by opioid and cannabinoid systems.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22:34, 2016.

PACHECO, D. F. et al. **Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist, but not κ - or δ -, is mediated by cannabinoid CB₁ receptor.** *Br J Pharmacol, London*, v. 158, p. 225-231, Sep. 2009.

PACHECO, D. F. et al. **The μ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors.** *Br J Pharmacol, London*, v. 154, p. 1143-1149, May 2008.

PACHECO, D. F. et al. **δ -Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via δ 1 and δ 2 receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway.** *Life Sciences*, 78: 54 – 60, 2005.

PAIVA, A. L. et al. **Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels.** *Biochimie*, 121, 326–335, 2016.

PATACCHINI, R.; MAGGI, C. A. **Tachykinin receptors and receptor subtypes**. Arch. Int. Pharmacodyn. 329, 161–184, 1995.

PERTWEE, R. G. **The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol**. In Cannabinoids (Di Marzo, V., ed.), pp. 32–83, Kluwer- Plenum. 2004.

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.

PORTER, A. C. et al. **Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor**. J Pharmacol Exp Ther, Bethesda (MD), v. 301, n. 3, p. 1020–1024, Jun. 2002.

PORTO, C. C. **Exame Clínico: Bases para a prática médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAJENDRA, W. et al. **Toxins in anti-nociception and anti-inflammation**. Toxicon, Oxford, v. 44, n. 1, p. 1-17, 2004.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. **A method for measurement of analgesid activity on inflamed tissues**. Arch Int Pharmacodyn Ther, Ghent (Belgium), v.111, n. 4, p. 409-419, Sep. 1957.

RANG, H.P. et al. **Analgesic drugs** – Rang and Dales Pharmacology. 4th Ed. London: Churchill Livingstone, p. 589–602, 1995.

RAUCK, R. L. et al. **A randomized, double-blind, placebo-controlled study of intrathecal ziconotide in adults with severe chronic pain**. J Pain Symptom Manage; 31: 393–406, 2006.

REIS, G. M. L. **Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide**. Life Sciences 85, 351–356, 2009.

RESENDE JR, L. et al. **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.

RHEE, M. H. et al. **Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes**. J Neurochem, Oxford, v. 71, n. 4, p. 1525–1534, Oct. 1998.

- RHIM, H.; MILLER, R. J. **Opioid receptors modulate diverse types of calcium channels in the nucleus tractus solitaries of the rat.** J. Neurosci, Washington (DC), v. 14, n. 12, p. 7608–7615, Dec.1994.
- RICHARDSON, M. et al. **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.
- ROCHA, A. P. C. et al. **Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central.** Ver. Bras. Anesthesiol, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.
- ROZENFELD, R. et al. **Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons.** PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 1, e29239, 2012.
- RUSSO, E. B. **Cannabinoids in the management of difficult to treat pain.** Therapeutics and Clinical Risk Management. 4(1) 245–259, 2008.
- RUSSO, E. **History of cannabis as a medicine.** In The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids, ed. GW Guy, BA Whittle, PJ Robson, pp. 1–16. London/Chicago: Pharmaceutical. 2005.
- RYBERG, E. et al. **Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB₁ receptor.** FEBS Lett, Amsterdam, v. 579, n. 1, p. 259–264, Jan. 2005.
- SALAMON, Z. et al. **Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes [S.I.], v. 1331, n. 2, p. 117-129, 1997.
- SANFORD, M. **Intrathecal ziconotide: a review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics.** CNS Drugs, 27, 989-1002, 2013.
- SCHMID, F-X. **Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry.** ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2001.
- SCHMID, P. C. et al. **Metabolism on N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type.** J Biol Chem, Baltimore (MD), v. 258, n. 15, p. 9302–9306, Aug. 1983.
- SCHMIDT, R. et al. **Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin.** Journal of Neuroscience. 15, 333–341, 1995.
- SCHMIDTKO, A. et al. **Ziconotide for treatment of severe chronic pain.** Lancet. 375(9725): 1569–77, 2010.

SHARMA, S. K. et al. **Opiate dependent modulation of adenylate cyclase activity.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington (DC), v. 74, n. 8, p. 3365–3369, Aug. 1977.

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 nervous system.** 1st ed. New York: C Scribner and Sons. 436p. 1906.

SHIRE, D. et al. **An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing.** J Biol Chem, Baltimore (MD), v. 270, v. 8, p. 3726–3731, Feb. 1995.

SILVA, A. P. et al. **Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets.** Clin Chim Acta. 326:3–25, 2002.

SILVA, F. R. et al. **The *Phoneutria nigriventer* spider toxin, PnTx4-5-5, promotes neuronal survival by blocking NMDA receptors.** Toxicon, 112, 16–22, 2016.

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.

SUGIURA, T. et al. **2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.** Biochem Biophys Res Commun, New York, v. 215, n. 1, p. 89–97, Oct. 1995.

SUIGIURA, T.; WAKU, K. **2-Arachidonoylglycerol and cannabinoid receptors.** Chem Phys Lipids. 108:89–106, 2000.

SWARTZ, K. J. **Sensing voltage across lipid membranes.** Nature [S.I.], v. 456, n. 7224, p. 891-897, 2008.

SZEKELY, J. I. et al. **Attenuation of morphine tolerance and dependence by alpha-melanocyte stimulating hormone Žalpha-MSH.** Life Sci. 24, 1931–1938, 1979.

TAN, Z-Y. et al. **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.

TSENG, L. F. **Evidence for epsilon opioid receptor-mediated h-endorphin-induced analgesia.** Trends Pharmacol. Sci. 22, 623– 630, 2001

TSENG, L. F. **Mechanisms of β-endorphininduced antinociception.** In The Pharmacology of Opioid Peptides (Tseng, L.F., ed.), pp. 249–269, Harwood Academic Publishers GMBH. 1995.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. **Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?** Brain Res, Amsterdam, v. 46, p. 295–309, 2004.

VARMA, N. et al. **Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in the hippocampus.** J Neurosci, Washington (DC), v. 21, n. 24, p. 1-5, Dec. 2001.

VRINTEN, D. H. et al. **Antagonism of the melanocortin system reduces cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats.** J Neurosci. 20:8131–7, 2000.

WALDHOER, M. et al. **Opioid Receptors.** Annu Rev Biochem, Palo Alto (CA), v. 73, p. 953 - 990, 2004.

WARTMANN, M. et al. **The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide.** FEBS Lett, Amsterdam, v. 359, n. 2-3, p. 133–136, Feb. 1995.

WITTING, A. et al. **P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells.** Proc Natl Acad Sci USA, Washington (DC), v. 101, n. 9, p. 3214–3219, Mar. 2004.

YUAN F. et al. **Current Research on Opioid Receptor Function.** Curr Drug Targets. February; 13(2): 230–246, 2012.

ZAMBELLI, V. O. et al. **Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crocophine in Rats.** PLOS ONE, Volume 9, Issue 3, e90576, 1 March 2014.

ZAVERI, N. et al. **Characterization of opiates, neuroleptics, and synthetic analogs at ORL1 and opioid receptors.** Eur J Pharmacol, Amsterdam, v. 428, n. 1, p. 29-36, Sep. 2001.

ZHU et al. **Target-Driven Positive Selection at Hot Spots of Scorpion Toxins Uncovers Their Potential in Design of Insecticides.** Mol Biol Evol. 33 (8): 1907-1920, 2016.

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

Anexos



Article

δ -Ctenitoxin-Pn1a, a Peptide from *Phoneutria nigriventer* Spider Venom, Shows Antinociceptive Effect Involving Opioid and Cannabinoid Systems, in Rats

Bruna Luiza Emerich¹, Renata C. M. Ferreira², Marta N. Cordeiro³, Márcia Helena Borges³, Adriano M. C. Pimenta¹, Suely G. Figueiredo⁴, Igor Dimitri G. Duarte² and Maria Elena de Lima^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil; brunaemerich@gmail.com (B.L.E.); apimenta@icb.ufmg.br (A.M.C.P.)

² Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,

Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil; recmferreira@gmail.com (R.C.M.F.); dimitri@icb.ufmg.br (I.D.G.D.)

³ Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Belo Horizonte, MG 30510010, Brazil; martadonascimento.phoneutria@gmail.com (M.N.C.); mhborgesb@gmail.com (M.H.B.)

⁴ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Vitória, ES 29040-900, Brazil; suelygf@gmail.com

* Correspondence: melenalima@icb.ufmg.br or lima.mariaelena@gmail.com; Tel.: +55-31-3409-2659

Academic Editor: Greta Binford

Received: 29 January 2016; Accepted: 5 April 2016; Published: 12 April 2016

Abstract: PnTx4(6-1), henceforth renamed δ -Ctenitoxin-Pn1a (δ -CNTX-Pn1a), a peptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom, initially described as an insect toxin, binds to site 3 of sodium channels in nerve cord synaptosomes and slows down sodium current inactivation in isolated axons in cockroaches (*Periplaneta americana*). δ -CNTX-Pn1a does not cause any apparent toxicity to mice, when intracerebroventricularly injected (30 μ g). In this study, we evaluated the antinociceptive effect of δ -CNTX-Pn1a in three animal pain models and investigated its mechanism of action in acute pain. In the inflammatory pain model, induced by carrageenan, δ -CNTX-Pn1a restored the nociceptive threshold of rats, when intraplantarly injected, 2 h and 30 min after carrageenan administration. Concerning the neuropathic pain model, δ -CNTX-Pn1a, when intrathecally administered, reversed the hyperalgesia evoked by sciatic nerve constriction. In the acute pain model, induced by prostaglandin E₂, intrathecal administration of δ -CNTX-Pn1a caused a dose-dependent antinociceptive effect. Using antagonists of the receptors, we showed that the antinociceptive effect of δ -CNTX-Pn1a involves both the cannabinoid system, through CB₁ receptors, and the opioid system, through μ and δ receptors. Our data show, for the first time, that δ -Ctenitoxin-Pn1a is able to induce antinociception in inflammatory, neuropathic and acute pain models.

Keywords: spider toxin; δ -Ctenitoxin-Pn1a; PnTx4(6-1); *Phoneutria nigriventer*; spider venom; antinociception

1. Introduction

The word pain derives from the Latin *poena*, which means “penalty” [1], and treating pain has always been a challenge to mankind since ancient times. Nowadays, the International Association for the Study of Pain describes it as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with real or potential tissue damage”. Further understanding on the mechanisms by which pain signals are interpreted, transmitted and maintained will improve pain treatment strategies.

ANEXO B – Artigo *Buthus occitanus* – Trabalho realizado durante o estágio sanduiche e submetido à publicação.

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicon
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Comparative analyses and implications for antivenom serotherapy of four Moroccan scorpion *Buthus occitanus* venoms: subspecies *tunetanus*, *paris*, *malhommei*, and *mardochei*.

Article Type: SI: Immunity-InflammationPain

Keywords: *Buthus occitanus* dimorphism; RP-HPLC, MALDI-TOF mass spectrometry; scorpion; antivenom serotherapy

Corresponding Author: Dr. Pierre Edouard Bougis, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Aix Marseille Université

First Author: Bruna Luiza Emerich

Order of Authors: Bruna Luiza Emerich; Maria Elena De Lima; Marie-France Martin-Eauclaire; Pierre Edouard Bougis, Ph.D.

Abstract: ABSTRACT

Temporary passive immunity such as serotherapy against venoms requires the full knowledge of all venom's components. Here, four venoms from Moroccan common yellow scorpions belonging to *Buthus occitanus*, subspecies *tunetanus*, *paris*, *malhommei*, and *mardochei*, all collected in four different restricted areas, were analysed in deep. They were fractionated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and their molecular mass profile determined by off-line MALDI-TOF mass spectrometry. Characterisation of their main components was achieved by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific immunsera against the major lethal scorpion toxins identified so far, i.e. voltage-gated sodium channels (Nav) modulators α - and β -toxins, as well as diverse potassium channel pore blocker toxins. For molecular masses with identical RP-HPLC retention times, we observe that their relative quantities show big differences. Moreover, identical masses present simultaneously in the four venoms are infrequent. ELISAs show that the majority of the RP-HPLC compounds cross-react with the immunserum against the " α -like" toxin Bot I, which has been previously identified in the Algerian *Buthus occitanus tunetanus* venom. Moreover, minor fractions were recognised by the immunserum against the highly lethal "classical" α -toxin of reference AaH II from the *Androctonus australis* venom. As such, our results bring new sights for further improving scorpion venom serotherapy in Morocco.

LIMA, M. E.; TORRES, F. S.; MAGALHÃES, B. L. E.; FREITAS, A. C. N. Perspectivas inovadoras para o uso terapêutico de toxinas da aranha "armadeira" *Phoneutria nigriventer* (KEYSERLING, 1891) na dor e na disfunção erétil. *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. 1ed. São Paulo: Blücher, 2015, v. 1, p. 532.

18

CAPÍTULO

PERSPECTIVAS INOVADORAS PARA O USO TERAPÊUTICO DE TOXINAS DA ARANHA "ARMADEIRA" *Phoneutria nigriventer* (KEYSERLING, 1891) NA DOR E NA DISFUNÇÃO ERÉTEL

Maria Elena de Lima
Fernanda Silva Torres
Bruna Luiza Emerich Magalhães
Ana Cristina Nogueira Freitas.

18.1 INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de animais evoluiu utilizando a peçonha como estratégia para defesa e predação. Muitos destes animais apresentam um aparato especializado (dente, ferrão, aguilhão) para a inoculação de peçonha.

XI Congress of the Pan-American Section of the International Society on Toxinology
XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology
Envenomation by poisonous animals: a neglected disease
November 3-8, 2013
Copa Grande Hotel
Guarujá - SP - Brazil

CERTIFIED

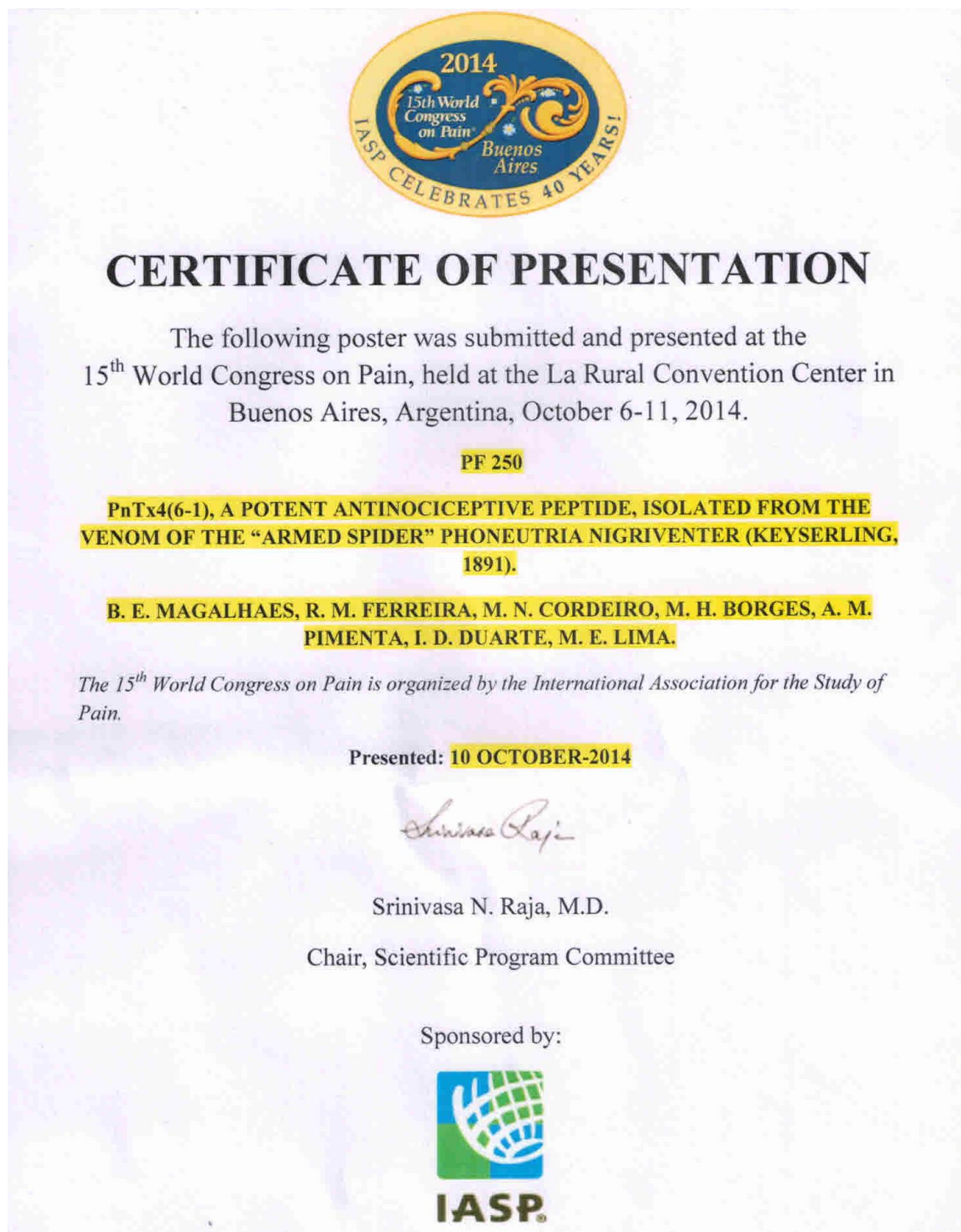
We hereby certify that the scientific papers entitled
ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF PNTX4(6-1), A PEPTIDE ISOLATED FROM THE VENOM OF THE "ARMED SPIDER" PHONEUTRIA NIGRIVENTER (KEYSERLING, 1891)

with the authors
BRUNA LUIZA EMERICH MAGALHÃES; RENATA CRISTINA MENDES FERREIRA; MARTA DO NASCIMENTO CORDEIRO; MÂRCIA HELENA BORGES; ADRIANO MONTEIRO CASTRO PIMENTA; IGOR DIMITRI GAMA DUARTE; MARIA ELENA DE LIMA.

was presented as ORAL PRESENTATION in the
XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology
and the **XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology**
from 3 to 8 November 2013, in Guarujá, São Paulo

Denise V. Tambourgi
DENISE V. TAMBOURGI
PAN-AMERICAN SECTION/IST AND SBTX
PRESIDENT

ORGANIZED BY:
IST INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGIST
SBTX Sociedade Brasileira de Toxinologia
SUPPORTED BY:
INSTITUTO BUTANTAN
INCTTOX



Pep13, a peptide that shows antinociceptive effect involving opioid and cannabinoid systems, in rats

Bruna Luiza Emerich¹, Ricardo Andrez Machado de Avila³, Igor Dimitri G. Duarte² and Maria Elena de Lima^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil; brunaemerich@gmail.com; apimenta@icb.ufmg.br

² Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil; recmferreira@gmail.com (R.C.M.F.); dimitri@icb.ufmg.br

³ Universidade do Extremo Sul Catarinense, Reitoria, Unidade Acadêmica Ciências da Saúde. Avenida Universitária, 1105. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC - Bloco S - Sala 21; r_andrez@yahoo.com.br

* Correspondence: melenalima@icb.ufmg.br or lima.mariaelena@gmail.com; Tel.: +55-31-3409-2659

Abstract: PnTx4(6-1), a peptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom, initially described as an insect toxin, binds to site 3 of sodium channels in nerve cord synaptosomes and slows down sodium current inactivation in isolated axons in cockroaches (*Periplaneta americana*). PnTx4(6-1) does not cause any apparent toxicity to mice, when intracerebroventricularly injected (30 µg). Subsequently, was demonstrated that PnTx4(6-1) has antinociceptive effect in three pain models: inflammatory, evoked by carrageenan; nociceptive, evoked by prostaglandin E₂ and neuropathic, evoked by constriction of the sciatic nerve. Using diverse antagonists from receptors, we showed that the cannabinoid system, via the CB₁ receptor, and the opioid system, through the µ and δ receptors, are both involved in the antinociceptive effect of PnTx4(6-1). In the present work, we synthesized a peptide, named Pep13, based on the amino acid sequence of PnTx4(6-1) in order to try to reproduce the analgesic effect of the toxin, with a simpler molecule. As the toxin, the Pep13 has antinociceptive activity, when intrathecally administered, and this effect is also related to the cannabinoid and opioide systems. In addition, when we evaluated the peripheral effect of Pep13, by intraplantar administration, this peptide was able to

reverse the hyperalgesic threshold, evoked by PGE₂. Differently from the native toxin, the peptide caused no apparent effect when administered in flies (*Musca domestica*). Therefore, we suggest that Pep13 plays the antinociceptive effects of PnTx4(6-1) without however, present toxicity to insects.

Keywords: analgesic peptide; antinociception; δ -Ctenitoxin-Pn1a; PnTx4(6-1); Pep13.

1. Introduction

A number of novel approaches using animal toxins to relieve pain have been investigated (Rajendra et al., 2004; Pineda et al., 2014; King 2014; Castro Jr et al., 2015; Diochot et al., 2015; De Lima et al., 2015). A successful example is the drug (Prialt[®]) derived from ω -conotoxin MVIIA, a peptide from *Conus magus* snail venom, known to have a pronounced analgesic effect resulting from the inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channels (Wallace, 2006; McGivern, 2007).

It is also known that analgesia can be achieved by modulation of opioid and cannabinoid pathways (Parolaro et al., 2010; Desroches & Beaulieu, 2010). Some peptides that have their mechanism of action based on this modulation have been characterized. One example is Crotalphine, an antinociceptive peptide based on the natural analgesic factor, isolated from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* [19], that has its analgesic effect mediated by the release of peripheral dynorphin A, an endogenous agonist of κ -opioid receptors, and this release is dependent on cannabinoid receptor CB₂ activation (Machado et al., 2014). Additionally, our group showed that a synthetic peptide called PnPP-19, derived from another toxin of the spider *Phoneutria nigriventer*, exhibits antinociception in rats via opioid and cannabinoid systems (Freitas et al., 2016).

Another interesting group of peptides isolated from the venom of *P. nigriventer* comprises the insect toxins (Figueiredo et al., 1995, Figueiredo et al., 2001; Oliveira et al., 2003; De Lima et al., 2007; Paiva et al., 2016), which include PnTx4(6-1), a toxin previously characterized to target insect sodium channels (De Lima et al., 2002). PnTx4(6-1) is a 48-amino-acid polypeptide, with 5 disulfide bridges (MW 5244.6 Da) (Figueiredo et al., 1995). This toxin binds to site 3 of sodium channels in cockroach nerve cord synaptosomes (*Periplaneta americana*) (De Lima et al., 2002). Indeed, although PnTx4(6-1) slows down the inactivation of sodium currents in cockroach-isolated axons, it does not affect the currents in rat skeletal muscle (rNa_v1.4/rSKM1) or brain (rNa_v1.2/rBIIA) (De Lima et al., 2002). Moreover, at a high

concentration (30 µg) it does not cause apparent toxicity to mice, when intracerebroventricularly (i.c.v) injected (Figueiredo et al., 1995). However, an action of this toxin in other sub-types of Navs from mammals cannot be discarded, as we recently demonstrated for the recombinant PnTx4(5-5) another insect toxin from *P. nigriventer* venom, which shows 63 % of identity with Pep13 (Paiva et al., 2016). rPnTx4(5-5) was able to inhibit sodium currents on all mammalian Nav channels tested (Nav1.2 to Nav1.6), with the highest current inhibition on Nav1.3 (38.43 ± 8.04 %, IC₅₀ = 1.5 µM). Despite its apparent lack of toxicity to mammals, we previously showed that PnTx4(5-5) native reversibly inhibited the current of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurons (Figueiredo et al., 2001). In addition, we demonstrated that this toxin causes antinociception when peripherally injected in rats [38]. Additionally, it was recently shown that PnTx4(5-5) promotes neuroprotection under insults of high levels of glutamate, in primary-cultured corticostriatal neurons from wild type mice, as well as from a mouse model of Huntington's disease (Silva et al., 2016). It is well known that NMDA receptors are involved in nociception and that NMDA antagonists can produce antinociception (Bleakman et al., 2006; Chizh, 2007). Was demonstrated that PnTx4(6-1) was able to produce antinociception in three diferente pain models: inflammatory, neurophatic ahn nociceptive pain, in the last model the analgesic effect of the toxin involved the opioid and cannabinoide systems.

This work aims at propose a peptide to reproduce the antinociceptive effect of PnTx4(6-1) and investigate the mechanisms underlying its analgesic properties.

2. Results

2.1. Central Effect of Pep13 on Prostaglandin E₂-Induced Hyperalgesia

PGE₂ is known to decrease the nociceptive threshold of nociceptors, exerting a critical role in the generation and maintenance of nociception (Kuhn & Willis, 1973). We investigated the effect of Pep13 on PGE₂-induced hyperalgesia and showed that this peptide increased, in a dose-dependent manner, the nociceptive threshold of rats. The highest tested dose (20 µg) induced a potent antinociception, which persisted for all the time of the experiment, 1 hour. This effect was less durable for the other tested doses (2, 1, and 0.5 µg). The lower dose tested (0.25 µg) doesn't have a antinociceptive effect (Figure 1).

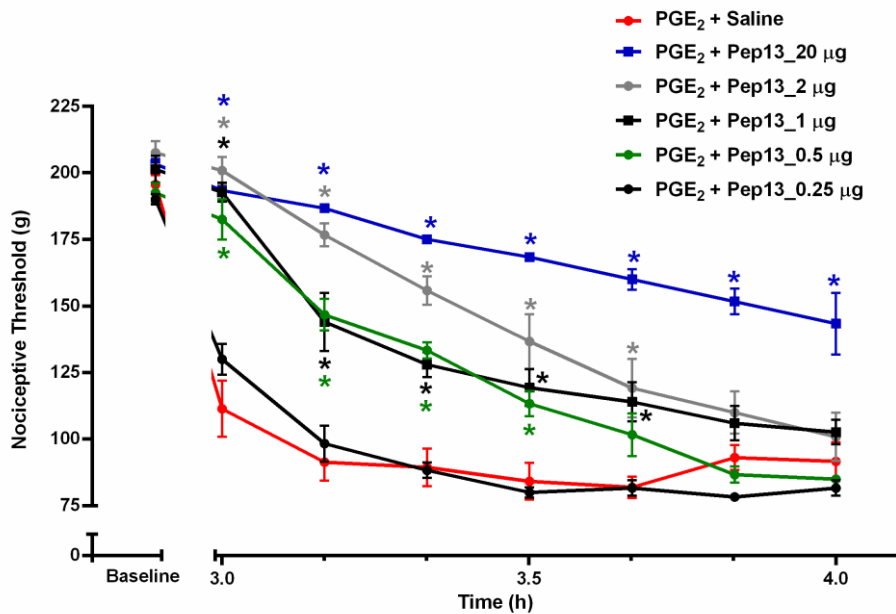


Figure 1. Pep13 antinociceptive effect following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Prostaglandin E₂ (PGE₂) (2 µg/paw) was administered through intraplantar injection. Rats received 0.25, 0.5, 1, 2 and 20 µg of Pep13 or saline (control) through intrathecal administration, 2 h and 55 min after PGE₂ injection. Nociceptive threshold was measured every 10 min, starting 5 min after peptide or saline injections. Each symbol represents MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA, and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*).

2.4. Involvement of Cannabinoid and Opioid Systems in Central Pep13 Antinociceptive Effect

The mechanism underlying Pep13 effect on the hyperalgesia induced by the inflammatory mediator PGE₂ was also investigated. For this, we verified the possible effect of Pep13 on the cannabinoid and opioid pathways. In order to investigate the involvement of the cannabinoid system, animals were treated with AM251 (80, 160 and 320 µg), a selective CB₁ receptor antagonist, or AM630 (100 µg), a selective CB₂ receptor antagonist, both administered 10 min before the peptide. AM251 reversed, in a dose-dependent manner, the antinociceptive effect of Pep13, intrathecally administered (i.t.), on PGE₂-induced hyperalgesia (Figure 2a). On the other hand, 100 µg of AM630 showed no significant effect on Pep13 antinociceptive effect (Figure 2b).

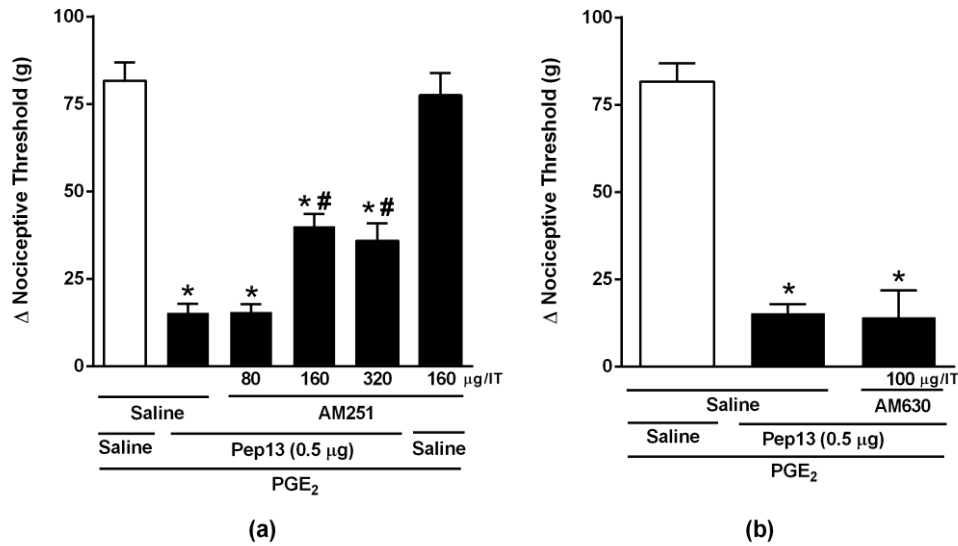


Figure 2. Effect of cannabinoid antagonists on Pep13 antinociception following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Rats received AM251 (a) or AM630 (b) through intrathecal route 2 h and 45 min after prostaglandin E₂ (PGE₂) injection (2 µg/paw). Pep13 (0.5 µg) or saline (control) were intrathecally injected 10 min after the antagonists. Nociceptive threshold was measured 5 min after peptide or saline injection. Vertical bars represent MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*) or PGE₂ + Pep13 + Saline (#).

In order to explore the involvement of the opioid system, animals were treated with opioid receptor antagonists. The non-selective opioid antagonist, naloxone, reversed the antinociceptive effect of Pep13 (Figure 3).

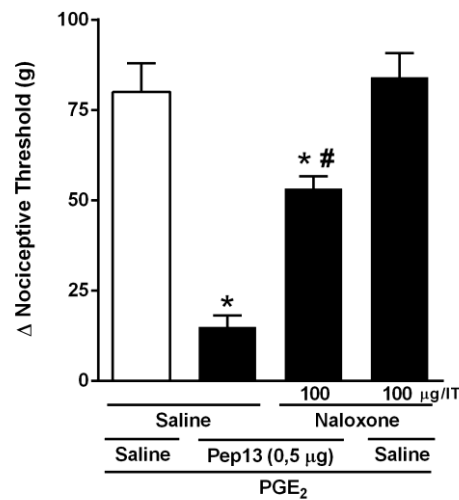


Figure 3. Effect of opioid antagonists on Pep13 antinociception following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Rats received Naloxone through intrathecal route 2 h and 25 min after prostaglandin E₂ (PGE₂) injection (2 μg/paw). Pep13 (0.5 μg) or saline (control) were intrathecally injected 30 min after the antagonists. Nociceptive threshold was measured 5 min after toxin or saline injection. Vertical bars represent MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*) or PGE₂ + Pep13 + Saline (#).

2.1. Peripheral Effect of Pep13 on Prostaglandin E₂-Induced Hyperalgesia

In order to explore the peripheral antinociceptive effect of the peptide, Pep13 was administered by intraplantar injection (2.5, 5, 10 and 20 μg) in the paw of the animals 3 hours after PGE₂ injection. Was found that Pep13 has a dose duration dependent effect (Figure 4).

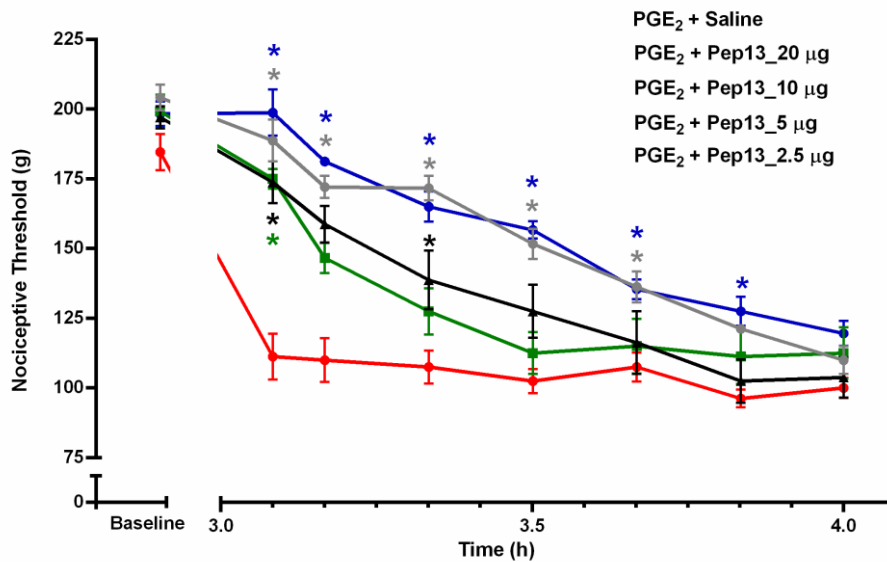


Figure 4. Pep13 antinociceptive effect following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Prostaglandin E₂ (PGE₂) (2 µg/paw) was administered through intraplantar injection. Rats received 2.5, 5, 10 and 20 µg of Pep13 or saline (control) through intraplantar administration, 3 h after PGE₂ injection. Nociceptive threshold was measured every 10 min, starting 5 min after peptide or saline injections. Each symbol represents MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA, and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*).

Further assays showed that the antinociceptive effect of Pep13 (20 µg/paw) was peripheral, because its effect was restricted to the peptide-treated paw (right paw; Figure 5).

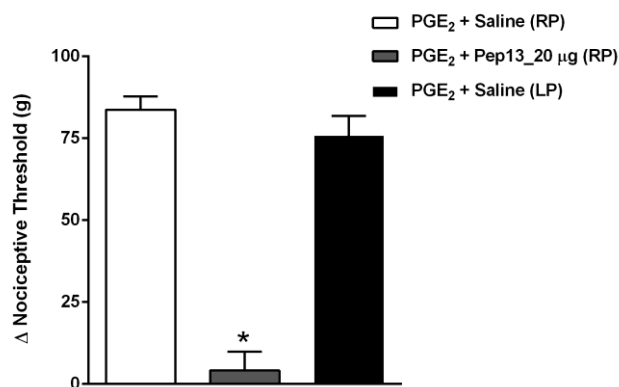


Figure 5. Exclusion of outside antinociceptive effect of Pep13 at a dose of 20 µg. Peptide or saline were injected into right (RP) 3 hours after administration of PGE₂ (2 µg/paw) in both hind paws (RP/LP). Each column represents the mean ± S.E.M. of Δ of nociceptive threshold (g) for 4 animals. * Indicated statistical significance (*P* < 0.05) from the group control (Cg + saline (RP)).

2.4. Involvement of Cannabinoid and Opioid Systems in Peripheral Pep13 Antinociceptive Effect

Once we saw the involvement of the cannabinoid system in the central antinociceptive effect of Pep13, we used the same antagonist, AM251 e AM630, for test the peripheral involvement of this system in the peripheral effect of the peptide. AM251, but not AM630, was able to antagonise the analgesic effect of Pep13, indicating the participation of the CB₁ cannabinoid receptor (Figure 6).

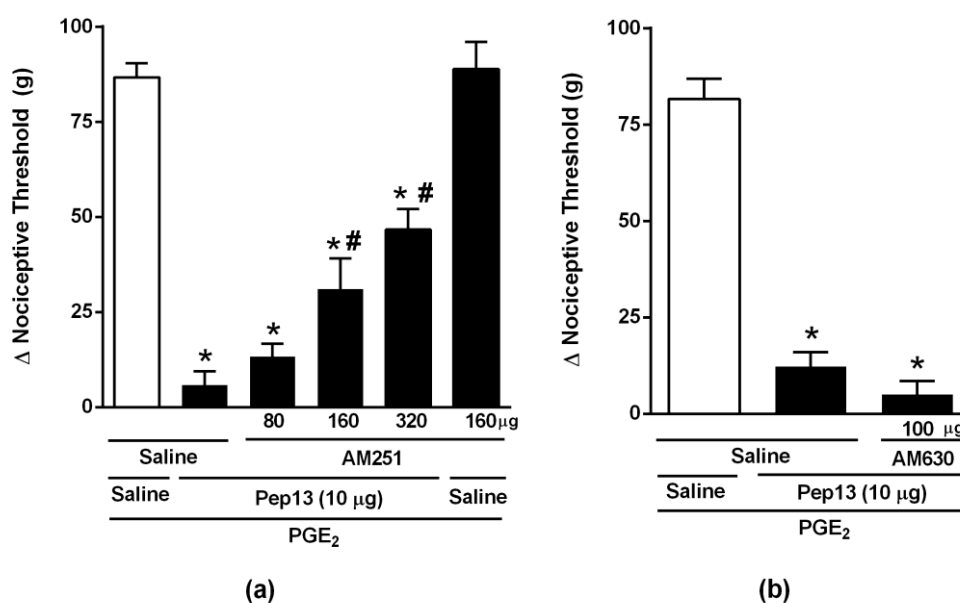


Figure 6. Effect of cannabinoid antagonists on Pep13 antinociception following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Rats received AM251 (a) or AM630 (b) through intraplantar route 2 h and 45 min after prostaglandin E₂ (PGE₂) injection (2 µg/paw). Pep13 (10 µg) or saline (control) were intraplantar injected 10 min after the antagonists. Nociceptive threshold was measured 5 min after peptide or saline injection. Vertical bars represent MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*) or PGE₂ + Pep13 + Saline (#).

In the same way, a non specific opioid antagonist, naloxone, was able to prevent the peripheral effect of Pep13 (Figure 7).

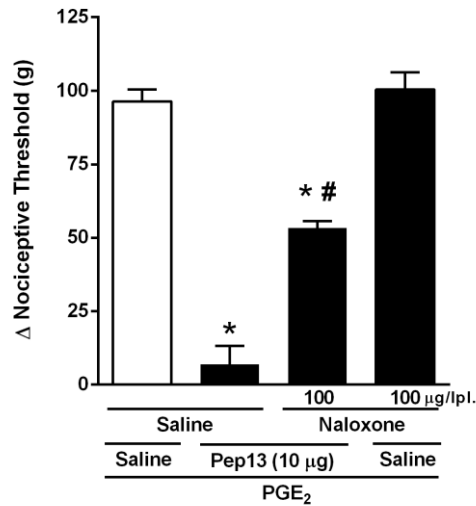


Figure 7. Effect of opioid antagonists on Pep13 antinociception following prostaglandin E₂-induced hyperalgesia. Rats received Naloxone through intraplantar route 2 h and 25 min after prostaglandin E₂ (PGE₂) injection (2 μg/paw). Pep13 (10 μg) or saline (control) were intraplantar injected 30 min after the antagonists. Nociceptive threshold was measured 5 min after toxin or saline injection. Vertical bars represent MEAN ± SEM. *n* = 4 rats per group. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni post-test. *p* < 0.05 compared to PGE₂ + Saline (*) or PGE₂ + Pep13 + Saline (#).

Because Pep13 induces activation of CB₁ receptors, we used MAFP, an inhibitor of the major anandamide metabolizing enzyme, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and the anandamide uptake inhibitor VDM11 to confirm the potentiation of the effects of Pep13 on the nociceptive pathway. Both MAFP (0.5 μg per paw; Figure 8 (a)) and VDM11 (2.5 μg per paw; Figure 8 (b)) enhanced the antinociception induced by a low dose of Pep13 (2.5 μg per paw). MAFP and VDM11 given alone did not induce any effect.

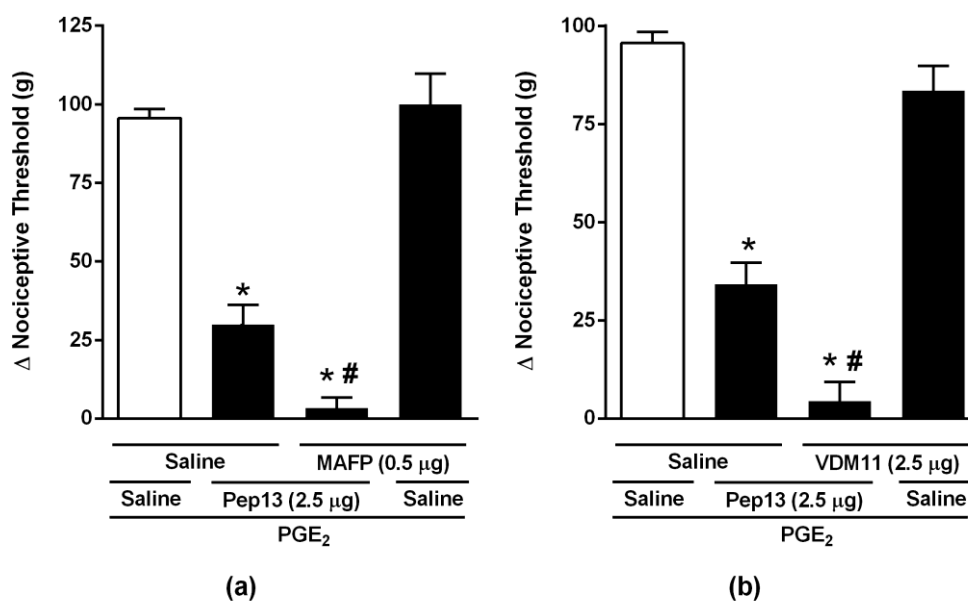


Figure 8. Potentiation of Pep13-induced antinociception by the FAAH inhibitor MAFP and anandamide uptake inhibitor VDM11. The MAFP (0.5 µg/paw) and VDM11 (2.5 µg/paw) were administered 10 min prior to Pep13 (2.5 µg/paw). Pep13 was administered at 2 h and 55 min after local administration of PGE₂ (2 µg/paw). Nociceptive threshold was measured 5 min after toxin or saline injection. Vertical bars represent MEAN ± SEM. $n = 4$ rats per group. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni post-test. $p < 0.05$ compared to PGE₂ + Saline (*) or PGE₂ + Pep13 + Saline (#).

3. Discussion

Our results show the central and peripheral analgesic effect of Pep13 in nociceptive *in vivo* pain model. Moreover, we reveal that the antinociceptive effect of Pep13 involves both opioid and cannabinoid endogenous systems. It is well known that these receptors are involved in antinociceptive pathways. However, there are few studies regarding the effect of animal toxins on these receptors. Here, we show that only AM251, a selective CB₁ receptor antagonist, antagonizes the antinociceptive effect of Pep13 in PGE₂-induced hyperalgesia. Using naloxone, a nonselective opioid receptor antagonist, the antinociceptive effect of Pep13 was reverted.

Pnpp19, a peptide synthesized by our group, in addition to potentiating erectile function in rats, showed antinociceptive activity against PGE₂ hyperalgesia through activation of μ and δ opioid, and CB₁ cannabinoid receptors. This peptide also seems to be able to indirectly induce antinociception through inhibition of a neuronal endopeptidase responsible for the cleavage of the endogenous opioid peptide enkephalin (Freitas et al., 2016). Different from these findings, Crotalphine peptide reduced PGE₂-induced hyperalgesia through an increased activation of both

κ -opioid and CB₂ cannabinoid receptors, being this effect mediated by dynorphin A (Machado et al., 2014). This result reinforces the interaction between cannabinoid and opioid systems, as observed in our work and highlights the complexity of the nociceptive pathways.

Other studies are in progress to try to clarify the mechanism of action of the peptide Pep13.

4. Conclusions

In the present study, we reveal that Pep13, a peptide based on the toxin PnTx4(6-1) isolated from the venom of *Phoneutria nigriventer* spider, shows a clear analgesic effect in the nociceptive *in vivo* pain model. Moreover, we show the involvement of CB₁ cannabinoid receptor and opioid receptors in the antinociceptive effect of Pep13. Taken together, our results may contribute for the development of novel therapeutic agents of a wide spectrum to manage pain, although studies are still necessary to better clarify the mechanisms involved in the effects of Pep13.

5. Material and Methods

5.1. Animals

Male adult Wistar rats weighing 180–200 g were kept in a home cage environment with free access to water and food. Room temperature was maintained at $22 \pm 2^\circ$ C with a 12–12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Animals were acclimatized and familiarized with the experimental room for at least 1 day before testing. All experiments were carried out according to the current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983), and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (protocol number: 102/2012, 04-07-2012).

5.2. Drugs

The following drugs and chemicals were used: Pep13 was purified by a combination of preparative reverse phase HPLC (RP-HPLC), ion exchange HPLC and analytical reverse phase HPLC as previously described (Richardson et al., 2006). Prostaglandin E₂ (Enzo Life Sciences, USA), AM251 (*N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide; Tocris, USA), AM630 (6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl(4-ethoxyphenyl) methanone; Tocris), Naloxone (Sigma, USA), MAFP (acid

(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil- fosfonofluorídrico metil ester) (Tocrisolve, EUA), VDM11 [(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4- Hidroxi-2- metilfenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida] (Tocrisolve, EUA) were dissolved as follows: PGE₂ (2 % ethanol in saline); AM251 and AM630 (12 % DMSO in saline); Pep13, Naloxone, MAFP, VDM11 (saline).

5.3. Drug Treatments

Pep13 (0.25-20 µg/site), AM251 (80–320 µg/site), AM630 (100 µg/site), Naloxone (100 µg/site) were administered through intrathecal (i.t.) route, according to Mestre and co-authors. The i.t. injections were delivered in a volume of 20 µL/site per rat. Prostaglandin E₂ (2 µg/site) were administered through intraplantar route (ipl.) in a volume of 100 µL. Pep13 (2.5-20 µg/site), AM251 (80–320 µg/site), AM630 (100 µg/site), Naloxone (100 µg/site), MAFP (0.5 µg/site), VDM11 (2.5 µg/site) were administered through intraplantar route (ipl.) in a volume of 50 µL.

5.4. Prostaglandin E₂-Induced Nociceptive Hyperalgesia

Male rats received a 100 µL intradermal injection of PGE₂ (0.02 mg/mL of PGE₂, stored in ethanol, diluted in isotonic saline) into the right hind paw. Pep13 (0.25, 0.5, 1, 2 and 20 µg/site) was intrathecally administered 2 h and 55 min after PGE₂ injection. For the peripheral assays the peptide was intraplantar administered 3h after PGE₂ injection, in the doses of 2.5, 5, 10 and 20 µg/site. The nociceptive threshold was evaluated after Pep13 administration, every ten minutes.

5.5. Nociceptive Test

The nociceptive threshold was measured according to the rat paw pressure test described by Randall and Selitto in 1957. We used an analgesimeter (Ugo Basile, Varese, Italy) with a cone-shaped paw presser with a rounded tip, which applies a linearly increasing force to the rat's hind paw. The weight (g) required to elicit a nociceptive response (paw flexion) was determined as being the nociceptive threshold. A cutoff value of 300 g was used to minimize damage to the paws. The nociceptive threshold was measured in the right paw and determined as the average of three consecutive trials recorded before and various times after injection of the hyperalgesic agents. The same nociceptive thresholds were measured by two different experimenters.

5.6. Statistical Analysis

Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni's test. The minimum level of significance considered was $p < 0.05$. All graphics and analyses were performed using Prisma 5.0. (GraphPad Software, Inc.)

Acknowledgments: This study received financial support from INCTTox (INCTTOX 573790/2008-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Capes-Toxinologia (Capes 063/10-23038.006280/2011-07), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We would like to acknowledge Dr. Marie France Martin Eaucleire for reviewing this manuscript.

Author Contributions: Maria Elena de Lima proposed the project and, together with Igor Dimitri G. Duarte, supervised the research and revised this paper. Ricardo Andrez Machado de Avila contributed with the sequence of the peptide. Bruna Luiza Emerich performed the nociceptive experiments and data analyses, besides writing the paper. All authors contributed extensively to the work presented in this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Rajendra, W.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* **2004**, *44*, 1–17.
2. Pineda, S.S.; Undheim, E.A.; Rupasinghe, D.B.; Ikonopoulou, M.P.; King, G.F. Spider venomics: Implications for drug discovery. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1699–1714.
3. King, G. The future of venoms-based drug discovery: An interview with Glenn King. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1613–1615.
4. Castro Jr.; Dalmolin, G.D.; da Silva, J.F.; Gomez M.V. Uso de Toxinas Animais para o Tratamento da Dor: Fundamentos e Aplicações. In *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações*, 1st ed.; Resende, R.R., Soccol, C.R., Eds.; Publisher: Blucher, Brazil, 2015; Volume 1, pp. 575–609.
5. Diochot, S. Pain-Modulating Peptides in Spider Venoms: Good and Evil. In *Spider Venom*, 1st ed.; Corso, G., de Lima M.E., Diego Garcia, E., Eds.; Springer: City, The Neterlands 2015; Volume 1, pp. 121–154.
6. De Lima, M.E.; Torres, F.S.; Magalhães, B.L.E.; Freitas, A.C.N. Perspectivas inovadoras para o uso terapêutico de toxinas da aranha “armadeira” *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) na dor e na

- disfunção erétil. In *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações*, 1st ed.; Resende, R.R., Soccol, C.R., Eds.; Blucher: city, Brazil, 2015; Volume 1, pp. 539–572. (in Portuguese)
7. 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. *J. Insect Physiol.* **2002**, *48*, 53–61.
 8. Wallace, M.S. Ziconotide: A new nonopioid intrathecal analgesic for the treatment of chronic pain. *Expert. Rev. Neurother.* **2006**, *6*, 1423–1428.
 9. McGivern, J.G. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, *3*, 69–85.
 10. Parolaro, D.; Rubino, T.; Viganò, D.; Massi, P.; Guidali, C.; Realini, N. Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 393–405.
 11. Desroches, J.; Beaulieu, P. Opioids and cannabinoids interactions: Involvement in pain management. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 462–473.
 12. Machado, F.C.; Zambelli, V.O.; Fernandes, A.C.; Heimann, A.S.; Cury, Y.; Picolo, G. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 961–972.
 13. Freitas, A.C.; Pacheco, D.F.; Machado, M.F.; Carmona, A.K.; Duarte, I.D.; de Lima, M.E. PnPP-19, a spider toxin analogue, induces peripheral antinociception through opioid and cannabinoid receptors and inhibition of Neutral endopeptidase. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *7*, doi:10.1111/bph.13448.
 14. 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* **1995**, *33*, 83–93.
 15. Figueiredo, S.G.; de Lima, M.E.; Cordeiro, M.N.; Diniz, C.R.; Pattend, D.; Halliwell, 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* **2001**, *39*, 309–317.
 16. 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* **2003**, *42*, 793–800.
 17. 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.* **2007**, *146*, 264–279.
18. Paiva, A.L.; Matavel, A.; Peigneur, S.; Cordeiro, M.N.; Tytgat, J.; Diniz, M.R.V.; de Lima, M.E. Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. *Biochimie* **2016**, *121*, 326–335.
 19. Silva, F.R.; Batista, E.M.L; Gomez, M.V.; Kushmerick, C.; da Silva, J.F.; Cordeiro, M.N.; Vieira, L.B.; Ribeiro, F.M. The *Phoneutria nigriventer* spider toxin, PnTx4-5-5, promotes neuronal survival by blocking NMDA receptors. *Toxicon* **2016**, *112*, 16–22.
 20. Bleakman, D.; Alt, A.; Nisenbaum, E.S. Glutamate receptors and pain. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2006**, *17*, 592–604.
 21. Chizh, B.A. Low dose ketamine: A therapeutic and research tool to explore *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J. Psychopharmacol.* **2007**, *21*, 259–271.
 22. Kuhn, D.C.; Willis, A.L. Proceedings: Prostaglandin E2, inflammation and pain threshold in rat paws. *Br. J. Pharmacol.* **1973**, *49*, 183–184.
 23. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16*, 109–110.
 24. Randall, L.O.; Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacody* **1957**, *111*, 409–419.
 25. JONSSON, A.P. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 868-884, 2001.