

Juliana Figueira da Silva

**Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal
da toxina Tx3-4 do veneno da Aranha *Phoneutria
nigriventer* em camundongos**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas / Escola de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte 2009**

Juliana Figueira da Silva

**Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal
da toxina Tx3-4 do veneno da Aranha *Phoneutria
nigriventer* em camundongos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas/ Escola de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para o grau de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientador: Marcus Vinícius Gomez
Co-orientador: Juliano Ferreira

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas / Escola de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte 2009**

Apoio Institucional:

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Programa Instituto do Milênio-Processo 420109/2005-6

"Eu guardei muitas coisas em minhas mãos, e perdi todas;
mas as que coloquei nas mãos de Deus, essas eu possuo."

Martin Luther King Jr.

Parte dos resultados desta dissertação foi apresentada no seguinte encontro:

I CONGRESSO IBRO/LARC DE NEUROCIÊNCIAS DA AMÉRICA LATINA, CARIBE E PENÍNSULA IBÉRICA

Pôster: Evaluation of antinociceptive spinal activity in rodents of Tx3-4 a toxin purified from the spider *Phoneutria nigriventer* venom.

Silva JF, Gonçalves JM, De Souza AH, Junior CJC, Gomez MV, Ferreira J

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me direcionar e me capacitar a alcançar mais esta conquista.

A minha amada e querida mãe pelo amor, força e exemplo.

Ao meu irmão, amigo e exemplo pela presença constante, apoio incondicional e por ser meu porto seguro nos momentos de dúvida e insegurança.

À Vó Nair, Tio Ernani e Humberto pelas orações, presença, torcida e risadas, vocês são parte da minha felicidade.

Ao meu orientador, o Professor, Marcus Vinícius Gomez pela oportunidade, confiança, exemplo profissional e principalmente por ensinar e corrigir com amor. Mesmo com sua experiência, cada novo trabalho é recebido com o engajamento, entusiasmo e a alegria de um primeiro.

Ao meu co-orientador Juliano Ferreira, por aceitar o desafio da distância, pela paciência e pelo trabalho que tem desenvolvido comigo e com todos os seus orientados. Sou grata por me ensinar a encontrar as respostas certas e a entender que um pesquisador se forma a partir de suas perguntas e incertezas.

Aos professores Luiz Armando e Marco Aurélio pela disponibilidade e acolhida.

À Ana Cristina Pinheiro pela oportunidade, exemplo científico e por olhar para as pessoas, e enxergar seus sonhos e potenciais.

À Alessandra Hübner, o coração, pela oportunidade. Você acreditou, confiou e investiu em mim mesmo sem me conhecer, me ensinou no seu dia-a-dia e se alegrou comigo a cada resultado!

A minha colega Nanci por me ensinar com carinho e paciência mesmo quando se encontrava em dificuldade. Você é um exemplo de força, determinação e amor.

Aos meus companheiros de laboratório pela paciência, ensino e amizade: Julie, Célio, Luciene, Jomara, Bráulio, Iaci, Xavier, Gabriela Modenesi, Marco Paulo, Alexandre, Luiz Alexandre, Vítor, Patrícia e Karen.

Aos meus colegas do Rio Grande do Sul pela ajuda nos experimentos, alegria e companheirismo: Flávia, Cássia, Sara, Jardel, Mateus e Guilherme.

À Gerusa Dalmolin pela amizade, carinho e companheirismo durante os experimentos e vivências. Você foi o alívio para as angustias experimentais cotidianas e faz parte do meu crescimento científico e pessoal, sua amizade se tornou parte desta conquista.

À família Souza Medeiros, minha segunda família, pelo carinho, por estar sempre ao meu lado e torcer por mim com amor incondicional.

À Daiane, Keline, Danuza, Janice e Mirlene pela amizade, cumplicidade e companheirismo.

Às funcionárias: Adriane, Nívea, Shirley e Zélia. Vocês foram fundamentais para este trabalho.

Aos animais utilizados, meu respeito e gratidão.

À UFMG, UFSM e às entidades financiadoras CAPES, CNPq, FAPEMIG e Instituto do Milênio pelo suporte e incentivo na busca pela excelência da pesquisa brasileira.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor e Nocicepção	1
1.2 Classificação da Dor	2
1.3 Mecanismos Neurais da Dor	3
1.3.1 Transmissão periférica	5
1.3.2 Transmissão central	6
1.3.3 Mediadores químicos da via nociceptiva	7
1.4 Modalidades dolorosas clinicamente relevantes	10
1.5 Tratamento Farmacológico da Dor	12
1.6 Canais de Cálcio Sensíveis à Voltagem	13
1.6.1 Caracterização dos canais de cálcio sensíveis à voltagem	15
1.6.2 Canais de cálcio sensíveis à voltagem e nocicepção	17
1.7 <i>Phoneutria nigriventer</i>	19
1.8 Ação das toxinas purificadas do veneno da <i>Phoneutria nigriventer</i>	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Equipamentos	24

3.1.2 Fármacos e toxinas	24
3.1.3 Animais	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Administração intratecal (i.t)	26
3.2.2 Teste da placa quente	26
3.2.3 Teste da formalina	26
3.2.4 Efeitos adversos	27
3.2.4.1 Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)	28
3.2.4.2 Atividade exploratória (Campo aberto)	28
3.2.5 Modelo de nocicepção espontânea induzida por NMDA	29
3.2.6 Modelo de dor incisional	30
3.2.7 Avaliação da alodínia mecânica através dos filamentos de Von Frey	30
3.2.8 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de dor térmica transitória (Placa Quente)	32
4.2 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de nocicepção química persistente (Formalina)	34
4.3 Avaliação dos efeitos adversos	44
4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de nocicepção induzida pelo NMDA	48
4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de nocicepção Incisional	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	60
7 PERSPECTIVAS	61

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9 ANEXO	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ω -aga-IVA	Ômega-agatoxina-IVA
ω -ctx-MVIA	Ômega-conotoxina-MVIA
ω -ctx-MVIIC	Ômega-conotoxina-MVIIC
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
Ca^{2+}	Íons cálcio
CCSV	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm	Centímetros
DHPs	Dihidropiridinas
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EN	Neurônios específicos
g	Gramas
h	Horas
HVA	Canais de cálcio ativados por alta voltagem
i.t	Administração por via intratecal
K^+	Íon potássio
kDa	kDalton
LTP	Potenciação a longo prazo
LVA	Canais de cálcio ativados por baixa voltagem
Na^+	Íon sódio

NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
<i>P. nigriventer</i>	<i>Phoneutria nigriventer</i>
RVM	Medula rostroventromedial
s	Segundos
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
Tx3-4	Toxina Tx3-4
WDR	Neurônios de espectro dinâmico e amplo

LISTA DE FIGURAS

- Figura I:** Mecanismo de Transmissão e percepção da dor. 4
- Figura II:** Aspectos estruturais dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. 14
- Figura III:** Aranha “armadeira”, *Phoneutria nigriventer*. 20
- Figura 1:** Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -conotoxina-MVIIC (30 pmol/sítio) ou morfina (3000 pmol/sítio) no teste da placa quente. 33
- Figura 2:** Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da Tx3-4 (30 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. 35
- Figura 3:** Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da ω -conotoxina-MVIIC (30 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. 37
- Figura 4:** Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da ω -conotoxina-MVIIA (1 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. 39
- Figura 5:** Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Tx3-4 (3-30 pmol/sítio) ou ω -conotoxina-MVIIA (0,01-1 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina 1 hora antes da administração da mesma. 41

Figura 6: Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Tx3-4 (3-30 pmol/sítio), ω -conotoxina-MVIIC (0,03-30 pmol/sítio) ou ω -conotoxina-MVIIA (0,01-1 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina 9 minutos após a administração da mesma. 43

Figura 7: Avaliação do efeito da administração intratecal da toxina Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -conotoxina-MVIIC (30 pmol/sítio) ou ω -conotoxina-MVIIA (1 pmol/sítio) no teste de locomoção forçada em cilindro giratório. 45

Figura 8: Avaliação do efeito da administração intratecal da toxina Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -conotoxina-MVIIC (30 pmol/sítio) ou ω -conotoxina-MVIIA (1 pmol/sítio) no teste do campo aberto. 47

Figura 9: Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela coadministração intratecal da toxina Tx3-4 (3-30 pmol/sítio) ou do MK801 (30 nmol/sítio) com NMDA (3 nmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pelo NMDA. 49

Figura 10: Avaliação do efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Tx3-4 (3 pmol/sítio), ω -conotoxina-MVIIC (3 pmol/sítio) ou MK801 (30 nmol/sítio) no modelo de nocicepção incisional. 51

RESUMO

Os medicamentos utilizados atualmente no tratamento da dor estão frequentemente associados a efeitos colaterais graves e desenvolvimento rápido de tolerância e assim, existe a necessidade de novos fármacos mais seletivos. O bloqueio de canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSVs) no corno dorsal da medula espinhal tem se mostrado um alvo promissor, pois a redução dos níveis de cálcio intracelular é um dos mecanismos de modulação da informação nociceptiva. O objetivo deste estudo foi avaliar a possível atividade antinociceptiva da toxina Tx3-4, purificada do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, uma vez que já foi estabelecida sua afinidade por CCSVs do tipo-N, P/Q e -R e comparar sua ação com as ω -conotoxinas MVIIC e MVIIA. A phonotoxina foi administrada por via intratecal e apresentou efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção espontânea e inflamatória. A Tx3-4 inibiu a nocicepção induzida pela formalina na fase inflamatória tanto no pré quanto no pós-tratamento, apesar da ω -conotoxina-MVIIC inibir apenas o pós-tratamento e a ω -conotoxina-MVIIA apenas o pré-tratamento. Além disso, ela inibiu a nocicepção espontânea induzida pelo NMDA e a alodínia mecânica pós-operatória. Mostrou-se mais potente e eficaz em modelo clinicamente relevante e não alterou o padrão de resposta induzida na placa quente, mantendo assim os reflexos responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos. Houve aumento da potência terapêutica em modelo que envolvia sensibilização central, nocicepção pós-operatória, entretanto a Tx3-4 não alterou a coordenação e nem a atividade locomotora quando administrada em animais "naive". Assim, mais estudos fazem-se necessários para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos tanto na atividade antinociceptiva quanto na toxicidade induzida pela administração intratecal da toxina Tx3-4 em camundongos.

ABSTRACT

Existing medicines for the treatment of pain are often associated with serious side effects and rapid development of tolerance, thus, there is a need for new, more selective molecules. The inhibition of voltage-gated calcium channels (VGCCs) in the dorsal horn of the spinal cord has been shown an important target, once the reduction of intracellular levels of calcium is a mechanism of nociceptive transmission modulation. The objective of the present study was to investigate the possible antinociceptive activity of the toxin Tx3-4, purified from *Phoneutria nigriventer's* venom, since affinity for N-, P/Q and R-type VGCCs was established and compares activity with the ω -conotoxins MVIIC and MVIIA. The phonotoxin was intratecally injected and demonstrate an antinociceptive effect in behavioral response and inflammatory nociceptive models. The Tx3-4 was able to inhibit formalin induced nociception both pre- and pos-treatment in inflammatory phase, but ω -conotoxin-MVIIA actuated only in pre-treatment and ω -conotoxina-MVIIC only in pos-treatment. In addition, Tx3-4 inhibited behavioral response NMDA-induced and postoperative mechanical allodynia, and as so, it has been more powerfull and effective in clinic model and did not affect the response induced by hot-plate, without disturbing the reflexes that are responsible to protect the skin and body tissues. Furthermore, there was a rise of therapeutic potential in a central sensitization model, postoperative nociception, and Tx3-4 did not affect the motor coordination or motor locomotion when administered in naive animals. Thus, more studies are necessary to better clarify the mechanisms involved both, Tx3-4 toxin's antinociceptive effect, and toxicity in mice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

Dor, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor, pode ser conceituada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual atual ou potencial (Merskey e Bogduk, 1994).

Sendo assim, podemos dizer que ela representa uma experiência complexa e muitas vezes subjetiva incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos e manifesta-se com intensidade diferente entre indivíduos, variando de acordo com sexo, idade e estado de humor (Berkley, 1999; Chapman e Gavrin, 1999; Faucett e Levine, 1991; Ganong, 1988; Sharp, 2001).

Seu objetivo é alertar os indivíduos sobre a ocorrência de alterações na integridade e na funcionalidade do organismo, permitindo que mecanismos de defesa ou fuga sejam adotados (Millan, 1986; Traub, 1997) e em animais, as sensações dolorosas provocam comportamentos como lambar ou sacudir a região lesada.

Clínica e experimentalmente faz-se necessária a distinção entre dor percebida e a estimulação dos receptores nociceptivos (Basbaum e Jessel, 2002). A percepção de estímulos nocivos denominada por Sherrington (1906) de nocicepção, não significa o mesmo que dor. Esta além de uma sensação é uma experiência, enquanto nocicepção é a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até a medula dorsal (Basbaum e Jessel, 2002; Dubnet e Benner, 1983; Meyer *et al.*, 1994).

Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Assim, termos como dor e analgesia são apropriadamente utilizados para humanos e nocicepção para animais (Jones, 1992).

1.2 Classificação da Dor

A dor pode ser classificada de várias maneiras, uma das classificações possíveis seria quanto à sua origem. Ela pode ser classificada como dor nociceptiva, quando tem origem nos nociceptores localizados na pele, víscera e demais órgãos; como dor neurogênica, associada à lesão tecidual, quando tem origem na periferia ou no sistema nervoso central; como dor neuropática, quando tem origem em disfunção ou lesão de nervo ou feixes nervosos e como dor psicogênica, quando não apresenta uma fonte somática e associa-se a fatores psicológicos (Millan, 1999).

Outra classificação possível seria segundo a duração e para esta existem três tipos principais de dor. A dor transitória, que é provocada pela estimulação dos nociceptores na ausência de lesão tecidual e que tem como função proteger o organismo de lesões físicas que possam ser provocadas por agentes do ambiente ou por simples deformação dos tecidos corporais. Outro tipo é a dor aguda, que é provocada pela estimulação de nociceptores em resposta a um dano tecidual e caracteriza-se por ser de curta duração, podendo desaparecer antes da cura da lesão, e assim como a dor transitória, é de fácil identificação, tratamento e apresenta caráter protetor (Brennan *et al.*, 2007; Loeser e Melsack, 1999). Por último, temos a dor crônica que do mesmo modo que a aguda, também se origina de lesões ou doenças e pode permanecer mesmo após a recuperação do paciente, ou seja, pode permanecer quando o trauma ou lesão inicial foram resolvidos. Sua duração pode se estender por meses e até anos, sendo de difícil identificação e considerada por vezes como uma patologia que geralmente necessita de tratamento complexo (Brennan *et al.*, 2007; Tracey e Mantyh, 2007).

1.3 Mecanismos Neurais da Dor

Os mecanismos neurais da dor estão representados na figura I e serão discutidos a seguir, divididos nos tópicos: transmissão periférica, transmissão central e mediadores químicos da via nociceptiva.

1.3.1 Transmissão Periférica

O termo nociceptor (receptor da dor) foi introduzido por Sherrington, que definiu nociceptores como terminações livres das fibras aferentes primárias. Sua ativação ocorre na presença de diferentes estímulos, tais como mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão tecidual (estímulo nocivo mecânico), estímulos irritantes e hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico) (Julius e Basbaum 2001).

A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, cujos corpos celulares se encontram nos gânglios das raízes dorsais, pescoço, cabeça e nervos trigêmios e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula (Figura I). Esses estímulos nocivos ativam principalmente fibras aferentes primárias do tipo C e A δ . Além dessas, outro tipo de fibra que pode estar envolvida na transmissão do estímulo sensorial são as fibras do tipo A β , que normalmente responde a estímulos inócuos, aplicados à pele, que em condições especiais são capazes de conduzir o estímulo doloroso. As fibras do tipo C são delgadas, não mielinizadas e transmitem o estímulo nociceptivo de forma mais lenta (0,5-2,0 m/s). As fibras do tipo A δ são delgadas, pouco mielinizadas e de transmissão intermediária (12 a 30 m/s) enquanto que as fibras do tipo A β são de grande diâmetro, mielinizadas e de condução rápida (30-100 m/s) (Julius e Basbaum, 2001; Smith, 1984). É importante ressaltar que o estímulo, seja ele térmico, mecânico ou químico, deve exceder um certo limiar

para que seja interpretado pelo sistema sensorial como nociceptivo (Björkman, 1995).

Os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos desencadeiam o aparecimento do potencial de ação na fibra aferente primária (primeiro passo na percepção da sensação nociceptiva) têm sido amplamente estudados. Já existem evidências de que estímulos algogênicos induzem correntes de cátions através de estruturas protéicas especializadas, culminando na despolarização do aferente primário e na liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula (Besson, 1999; Bevan e Geppetti, 1994; Bonica, 1990; Kirchstein *et al.*, 1997; McGlone e Reilly, 2009).

A estimulação da fibra aferente primária desencadeia o reflexo de retirada, a condução do estímulo nociceptivo para os centros superiores e a liberação de neuropeptídeos e outras substâncias algogênicas pelos terminais axonais colaterais da própria fibra aferente primária, conferindo-lhe um papel eferente na transmissão do estímulo nociceptivo. Tais substâncias estimulam aferentes vizinhos, ativam células do sistema imunológico e aumentam a permeabilidade vascular, desencadeando uma resposta inflamatória que por ser secundária à ativação do aferente primário é denominada inflamação neurogênica (Millan, 1999).

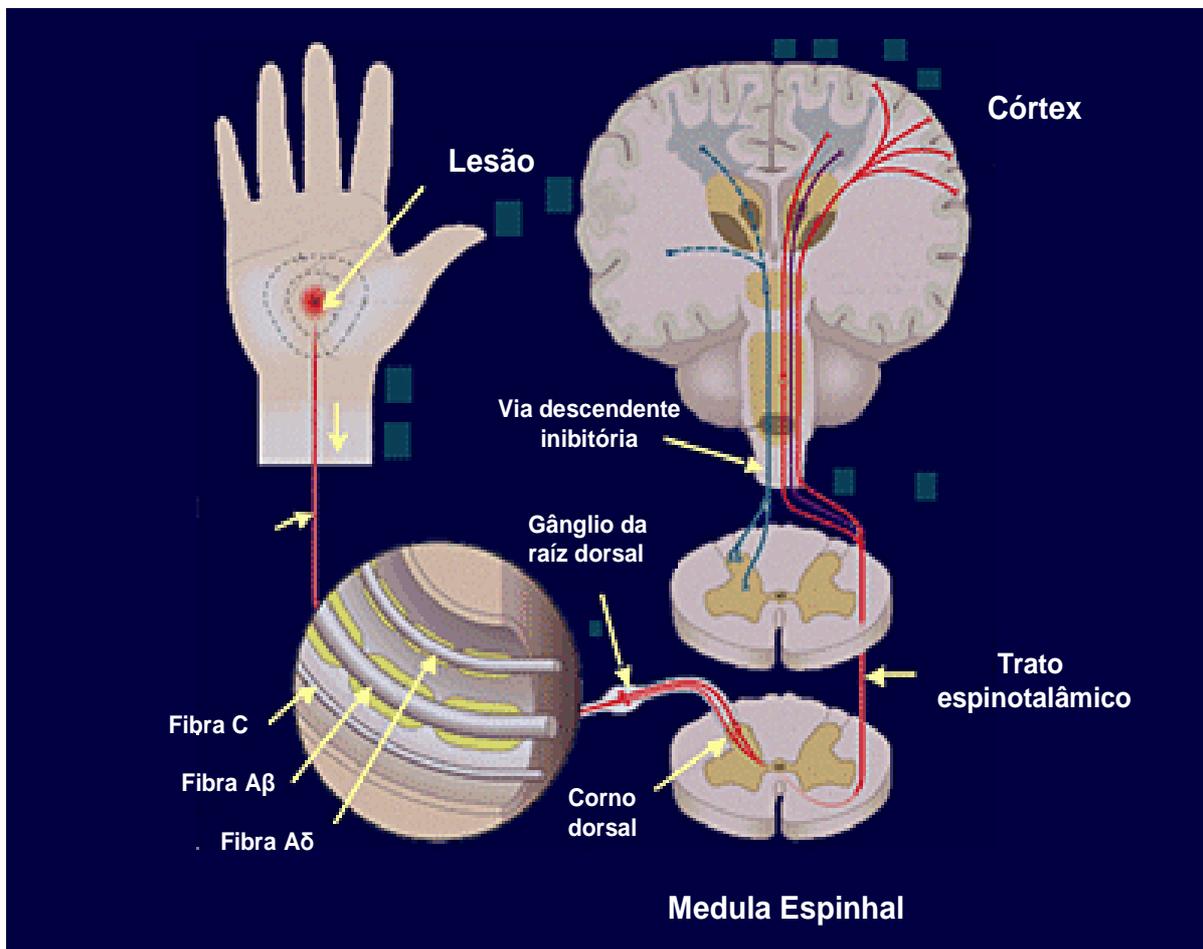


Figura I. Mecanismo de Transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático ilustrando as fibras aferentes primárias, a medula espinhal, córtex e via descendente.

Adaptado de: <http://img.medscape.com/slide/migrated/editorial/cmecircle/2006>

1.3.2 Transmissão Central

As fibras aferentes primárias do tipo C e Aδ transmitem a informação antinociceptiva da periferia até o corno dorsal da medula espinhal e suas terminações encontram-se principalmente na zona marginal (lâmina I) e substância gelatinosa (lâmina II) (Basbaum, 2003). A liberação de

neurotransmissores nociceptivos por estas fibras provoca a ativação de neurônios de segunda ordem, que formam as vias ascendentes e têm seus corpos celulares localizados no corno dorsal da medula. Eles recebem seus sinais sensoriais através da liberação de glutamato e substância P (SP) proveniente dos neurônios de primeira ordem e esse processo excitatório também envolve canais de cálcio, reguladores da liberação de neurotransmissores (Hill, 2001).

A via mais importante de transmissão do estímulo nociceptivo é o trato espinotalâmico ascendente, (figura 1) localizado na substância branca ventral, contralateral ao local da estimulação (Hall e Guyton, 2006; Bester, 2000) e como o próprio nome sugere as fibras espinotalâmicas projetam-se para o Tálamo, onde se dá a percepção da sensação nociceptiva. No Tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna do córtex somatosensorial, ocorrendo a somatização do estímulo nocivo e/ou emitindo axônios ao giro cingulado anterior, responsável pelo componente emocional da dor (Bear *et al.*, 2002, Hall e Guyton, 2006; Russo e Brose, 1998).

Tálamo e córtex são as estruturas de projeção final das vias de nocicepção, ficando a cargo do Tálamo, informar a presença de estímulo nociceptivo. O córtex, por sua vez, é responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por identificar (mesmo que de forma rudimentar) sua origem (Hall e Guyton, 2006).

A modulação nociceptiva ocorre não só através da via ascendente, mas também através de uma via descendente (figura 1). As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, Tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios,

interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (Millan, 2002). Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (Julius e Basbaum, 2001; Porreca *et al.*, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

Esse mecanismo também é conhecido como Teoria do Controle da Comporta. Este nome teve origem na função de “porteiro” dos interneurônios inibitórios presentes na lâmina II e foi proposto por Wall & Melzack em 1965 (Rang e Dale, 2003) . De acordo com esta concepção os interneurônios respondem tanto à atividade das fibras aferentes primárias quanto à atividade da via descendente inibitória, permitindo ou interrompendo a propagação do estímulo doloroso.

1.3.3 Mediadores Químicos da Via Nociceptiva

As substâncias algogênicas que são liberadas e/ou sintetizadas em elevada concentração no ambiente tecidual na decorrência de processos inflamatórios são conhecidas por mediar a atividade dos nociceptores (Cotran *et al.*, 1994). Tais substâncias endógenas, como o ácido araquidônico, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado. Elas estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios, facilitam a neurotransmissão e ainda sensibilizam o nociceptor (Björkman, 1995) para que se inicie os mecanismos periféricos neuronais da dor inflamatória (Ferreira *et al.*, 1978; Khasar *et al.*, 1999; Nakamura e Ferreira, 1987). A sensibilização dos nociceptores ocorre através da redução do limiar de ativação. Desta forma, há aumento da probabilidade de que esses disparem com estímulos de baixa intensidade, permitindo que estímulos inócuos possam tornar-se capazes de excitar as fibras aferentes primárias (Finnerrup e Jensen, 2004; Holden e Pizzi, 2003; Khasar *et al.*, 1999; Millan 1999). Estas, por sua vez, transmitirão os estímulos nociceptivos aos neurônios específicos para a nocicepção (EN) ou a neurônios que também transmitem

outras sensações como os neurônios de amplo espectro dinâmico (WDR) no corno dorsal da medula (Calixto *et al.*, 2000, 2001; Guieu *et al.*, 1996; Taiwo e Levine, 1991).

Já existem evidências do envolvimento do glutamato, aspartato e alguns peptídeos na transmissão do estímulo nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal (Battaglia e Rustioni, 1988, Bleakman *et al.*, 2006) e o glutamato é o principal neurotransmissor que está presente em todos os tipos de aferentes primários. Trata-se de um aminoácido excitatório, que pode ser encontrado em concentrações na faixa de μ molar na medula espinhal e origina-se de fibras aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas, interneurônios intrínsecos e de projeções de neurônios (Battaglia e Rustioni, 1988). O glutamato é liberado, junto a outros neuropeptídeos, de terminais aferentes primários. Esses neurotransmissores têm ações fisiológicas distintas nos neurônios pós-sinápticos e atuam de forma coordenada para regular as propriedades desses neurônios. Dados da literatura têm sugerido que a SP possa atuar prolongando as ações do glutamato (Kandel *et al.*, 2003).

As ações do glutamato são mediadas principalmente por receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA. Os receptores não-NMDA consistem de dois receptores, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato (Dickenson, 1995). O potencial de ação que se propaga através de fibras C, depois de estímulos agudos mecânicos ou térmicos, parece envolver somente os receptores AMPA, pós-sinápticos, para produzir excitações curtas e constantes. Uma vez que esses estímulos são mantidos e/ou sua frequência é aumentada pela liberação de outros mediadores, que também contribuem para a transmissão nociceptiva, o receptor NMDA é ativado, aumentando a resposta de hiperalgesia (Dickenson, 1995). Uma ação excitatória direta, do tipo retroalimentação positiva, do glutamato nas fibras aferentes primárias, seria consistente com a evidência que a ativação dos receptores NMDA causa a liberação de substância P por seus terminais centrais (Liu *et al.*, 1994). Essa ação do receptor NMDA pode ser mediada pelo óxido nítrico (NO) dos terminais das fibras aferentes primárias (Sorkin, 1993), e o NO

poderia também interferir nas ações periféricas mediadas pelas fibras aferentes primárias (Jackson *et al.*, 1995).

Já o sistema descendente inibitório estimula neurônios medulares a secretar opióides endógenos, que causariam a inibição pré-sináptica e pós-sináptica das fibras C e A δ (Besson, 1999), portanto, o mecanismo pelo qual provocam essa analgesia descendente envolve a liberação de opióides na medula espinhal. Os opióides endógenos se ligam aos receptores opióides, que são receptores acoplados à proteína G, com conseqüente inibição da atividade da adenilato ciclase, redução dos níveis de AMPc e atividade de quinases. Essas alterações promoverão abertura de canais de potássio, hiperpolarização e inibição da entrada de cálcio, o que resultará em inibição pré-sináptica impedindo a liberação de glutamato (Kuraishi *et al.*, 1985). Também parece provável que esse mesmo sistema de analgesia possa bloquear os impulsos em nível de núcleos reticulares do tronco encefálico e nos núcleos intralaminares do tálamo.

1.4 Modalidade dolorosa clinicamente relevante (Dor pós-operatória)

Um dos exemplos de dor clinicamente relevante e de interesse para o presente estudo é a dor pós-operatória, fenômeno freqüente resultante de alterações fisiológicas e emocionais, que se não adequadamente controlada pode prolongar o desconforto do paciente e o período de internação (Brennan *et al.*, 1996).

A dor pós-operatória é um dos sintomas clássicos de processo inflamatório que se caracteriza pelos quatro sinais: dor, calor, tumor e rubor. A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica de acordo com o tempo de duração e características patológicas (Sherwood e Toliverkinsky, 2004). A inflamação aguda, resultante da incisão pode apresentar duração de horas a dias e caracteriza-se pela presença de mediadores como o NO e as prostaglandinas que promovem vasodilatação.

As lesões induzidas pela cirurgia causam alterações nas respostas tanto do SN periférico e central, previamente descritas, com liberação de mediadores químicos que participam desta resposta dolorosa, entre as quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células do sistema imunológico, nervos simpáticos e sensoriais, entre outros. Como consequência da injúria tecidual, haverá uma reação inflamatória local, atraindo eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Essas células liberam mediadores inflamatórios como: cininas (bradicinina e calidina); produtos das células imunes (citocinas como as interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral); aminas (serotonina e histamina); e os prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos).

O recrutamento de células mononucleares como os macrófagos, linfócitos e plasmócitos caracterizam a progressão da resposta tecidual para inflamação crônica. Esta, por sua vez, estende-se de semanas a meses. Durante sua ocorrência, há presença tanto do processo inflamatório ativo quanto de

tentativas de reparo tecidual, com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (Sherwood e Toliverkinsky, 2004).

A possibilidade de progressão da dor, incluindo a pós-cirúrgica, do estado agudo para o crônico é motivo de preocupação do ponto de vista clínico, pois neste caso, o processo inflamatório perde seu caráter protetor e torna-se patológico (Woolf e Mannion, 1999; Mendell e Sahenk, 2003).

1.5 Tratamento Farmacológico da Dor

Os fármacos analgésicos “clássicos”, notadamente os opióides e os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) compõem o quadro de substâncias comumente utilizadas no combate a dor (Rang e Dale, 2003).

Os opióides atuam abolindo diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervoso central (SNC) através da ligação ao receptor opióide (Hoskin e Hanks, 1991; Yaksh, 1997), já os AINES atuam prevenindo a sensibilização de receptores nociceptivos periféricos ao inibir a síntese dos produtos derivados das vias das ciclooxigenases (Cashman, 1996).

Apesar de sua efetividade no combate a dores que não respondem a analgésicos menos potentes, os opióides como a codeína, morfina e derivados sintéticos apresentam efeitos indesejados tais como náusea, vômito, constipação, depressão respiratória, bradicardia, hipotensão, tolerância e dependência (Hoskin e Hanks, 1991; Martin e Sloan, 1977; McQueen, 1983; Nestler, 1993). Já os AINES, diclofenaco, AAS e indometacina, entre outros, estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo. São frequentemente prescritos para aliviar queixas musculoesqueléticas, mas são ingeridos sem prescrição para dores menores e devido a sua toxicidade gastrointestinal, podem causar morbidade e limitação de seu uso (Henry *et al.*, 1996).

Atualmente, existe grande interesse na busca por novos alvos moleculares e agentes terapêuticos capazes de inibir ou bloquear a transmissão do estímulo nocivo e em conjunto minimizar o aparecimento de efeitos colaterais (Schaible, 2009). Dentre estes novos alvos moleculares encontram-se os canais de cálcio sensíveis a voltagem (CCSVs) e dentre os novos agentes terapêuticos encontram-se os antagonistas dos CCSVs, objeto do presente estudo (Miljanich e Ramachandran, 1995; Schoroeder *et al.*, 1991; Wallace, 2000).

1.6 Canais de Cálcio Sensíveis à Voltagem

Os CCSVs são representados na figura II, com suas subunidades e classificação segundo a subunidade α , e serão discutidos a seguir, divididos nos tópicos: caracterização e canais de cálcio sensíveis à voltagem e nocicepção.

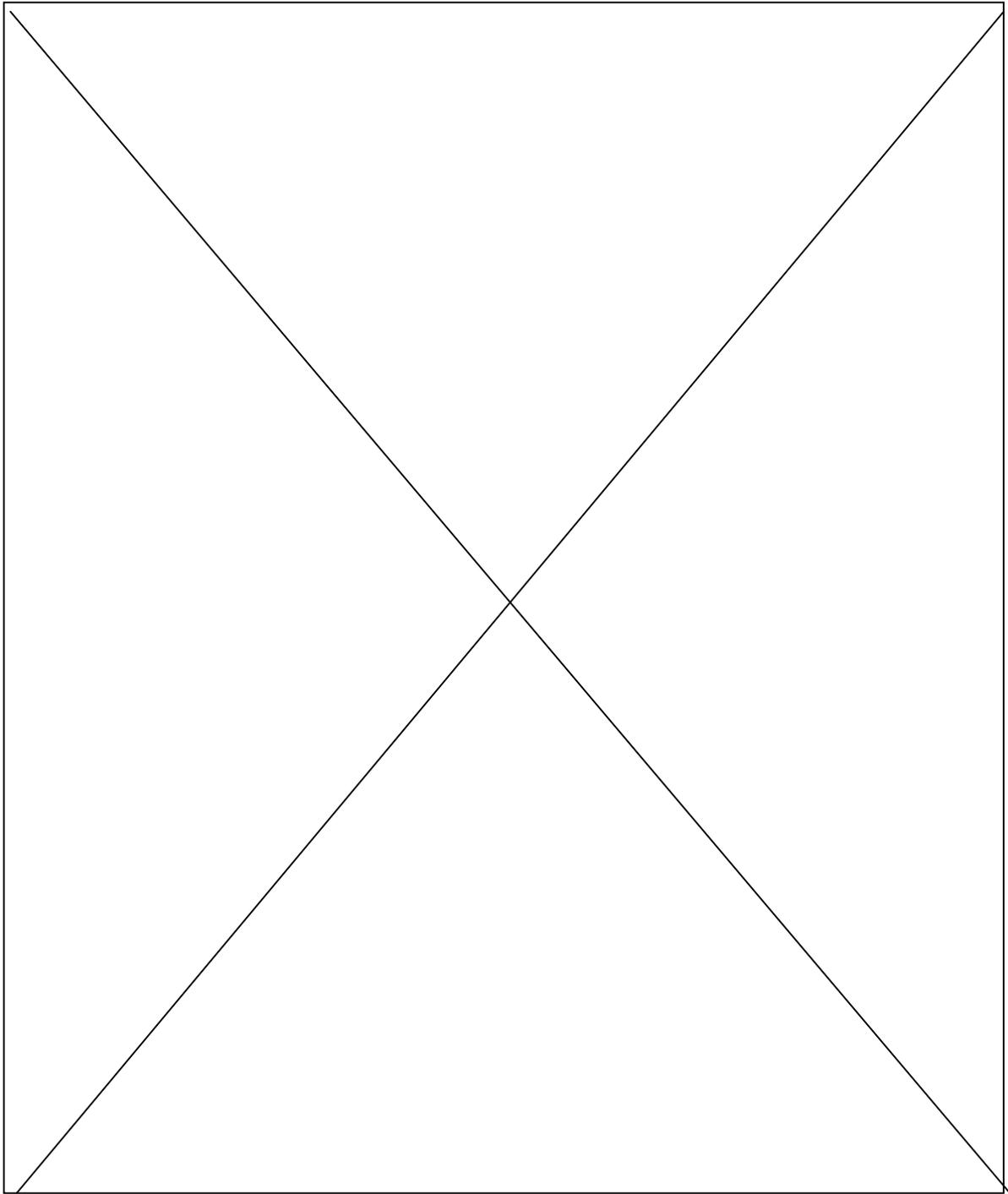


Figura II. Aspectos estruturais dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. Em virtude de direitos autorais, as imagem não foram liberadas para exibição.

1.6.1 Caracterização

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem são proteínas complexas compostas por 4 ou 5 subunidades distintas: α_1 , β_1 , $\alpha_2\text{-}\delta$, γ (figura II-A). São codificados por múltiplos genes e encontrados no sistema nervoso e em células especializadas como, por exemplo, os cardiomiócitos.

A subunidade α_1 é a maior das subunidades, com peso molecular de 190-250 kDa, e incorpora o poro condutor, o sensor de voltagem, o aparato de “gating” e os sítios de regulação do canal por segundos mensageiros, fármacos e toxinas (Herlitz *et al.*, 2003). Ela é estruturalmente organizada em quatro domínios homólogos (domínio I a IV), contendo 6 segmentos transmembrana (S1-S6), por domínio. O segmento S4 atua como sensor de voltagem e a alça do poro, entre os segmentos S5 e S6, determina a condutância iônica e a seletividade (figura II-C). Mudanças em três aminoácidos da alça do poro nos domínios I, III e IV tornam um canal de sódio seletivo ao cálcio (Catteral *et al.*, 2005; Herlitz *et al.*, 2003;).

Nove subtipos de canais de cálcio sensíveis à voltagem já foram identificados baseando-se na diversidade da subunidade α_1 . Esses subtipos de CCSVs são divididos em 3 famílias: genes Ca_v1 que codificam canais tipo-L, genes Ca_v3 que codificam canais tipo-T e genes Ca_v2 que codificam canais tipo-N, -P/Q e -R, com os canais do tipo-P e do tipo-Q surgindo como um rearranjo alternativo do gene $\text{Ca}_v2.1$ (Catteral, 2000) (Figura II-B).

Os CCSVs medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização de membranas e regulam processos intracelulares como a contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica de diferentes tipos celulares. O íon Ca^{2+} também penetra no meio intracelular através desses canais iniciando os processos celulares previamente citados. Recentemente, tem havido grande interesse no potencial dos CCSVs como alvos terapêuticos para o tratamento de dor crônica e dor neuropática (Snutch *et al.*, 2001).

Sabe-se que as correntes geradas pela ativação dos diferentes canais variam de acordo com a voltagem. Desta forma, os canais de cálcio ativados por

baixa voltagem (LVA, “low-voltage-activated”), são conhecidos por serem ativados por potenciais de ação ligeiramente superiores ao potencial de repouso (baixo limiar de ativação) e os canais de cálcio ativados por alta voltagem (HVA, “high-voltage activated”), por serem ativados por potenciais de ação substancialmente superiores ao potencial de repouso (alto limiar de ativação) (Snutch *et al.*, 2001).

A princípio, acreditava-se que existiam apenas dois tipos de CCSVs, os LVA e HVA e desta forma, iniciou-se a busca por ligantes específicos. Com a descoberta das dihidropiridinas (DHPs), evidenciou-se que estas bloqueavam alguns canais HVA e não bloqueavam LVA, e então houve a divisão dos canais HVA em DHP-sensíveis (CCSVs tipo-L) e DHP-insensíveis (CCSVs tipo-N). Os canais LVA, por sua vez, foram denominados CCSVs tipo-T (Nowycky *et al.*, 1985).

Posteriormente, um tipo adicional de CCSV foi encontrando em células de Purkinge. Ele foi denominado tipo-P e é bloqueado pela toxina peptídica ω -agatoxina-IVA (ω -aga-IVA) (Scott *et al.*, 1990). Sather e colaboradores (1993) expressaram os canais do tipo-P em oócitos e observaram que alguns deles apresentavam baixa sensibilidade a ω -aga-IVA (~200 nM) enquanto outros apresentaram sensibilidade bem maior (~2 nM). Diante disto, concluiu-se que haveria ainda um outro tipo de canal de cálcio do tipo HVA: o canal do tipo-Q, dificilmente distinguível do tipo-P (Zhang *et al.*, 1993).

Os CCSVs do tipo-R foram descobertos partindo do pressuposto que a utilização de um “coquetel” contendo bloqueadores dos canais HVA (L, N e P/Q) e uma despolarização pequena e prolongada do canal LVA (T), com o objetivo de inativar esse tipo de CCSV, aboliriam quase que por completo a entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular. Como é de conhecimento, alguma atividade residual de CCSVs permaneceu e esta foi atribuída aos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo-R. Estes são bloqueados por baixas concentrações de níquel e pelo peptídeo SNX-482, derivado do veneno da aranha tarântula africana, *Hysteroocrates gigas* (Newcomb *et al.*, 1998), e têm voltagem de ativação intermediária entre HVA e LVA (Zhang *et al.* 1993).

1.6.2 Canais de cálcio sensíveis à voltagem e nocicepção

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem também estão envolvidos na regulação da liberação de neurotransmissores, sendo que a proporção dos diferentes CCSVs variam de uma população de sinapses para a outra (Wheeler *et al.*, 1994). Eles são encontrados em terminais pré-sinápticos e permitem o influxo do íon cálcio necessário para exocitose de vesículas tanto de fibras nervosas centrais quanto periféricas, após uma despolarização (Miljanich e Ramachandran, 1995; Oliveira *et al.*, 1994).

Os diferentes subtipos de canais apresentam distribuição e função fisiológica diferentes, o que possibilita a administração variada de bloqueadores subtipo-específicos como agentes capazes de interromper a transmissão sináptica e serem utilizados no combate de algumas neuropatologias (Miljanich e Ramachandran, 1995).

A partir das propriedades citadas acima, várias características dos canais de cálcio do tipo-N sugeriam que este tipo de CCSV poderia ser importante no processamento sensorial da medula espinhal em geral e na transmissão nociceptiva em particular. Essas conclusões partiram da observação de que canais do tipo-N estavam envolvidos na liberação de CGRP e SP, por esta ser sensível aos ω -conopeptídeos (Holz *et al.*, 1988; Maggi *et al.*, 1990; Santicioli *et al.*, 1992), e da observação de que opióides e agonistas α_2 -adrenérgicos atuavam de maneira semelhante aos ω -conopeptídeos, reduzindo a liberação medular de CGRP e SP e que se dava através do bloqueio dos CCSVs tipo-N no terminal pré-sináptico (Malmberg e Yaksh, 1994).

Pesquisas realizadas na última década têm estudado consideravelmente o papel de inibidores de canais do tipo-N da medula espinhal para o desenvolvimento de novos medicamentos analgésicos (Altier e Zamponi, 2004). Os CCSVs tipo-N têm um importante papel na modulação da liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos como o glutamato e já foi demonstrado

que seus antagonistas, as ω -conotoxinas MVIIA e GVIA, podem prevenir e atenuar a nocicepção. É importante ressaltar que, a ômega-conotoxina-MVIIA (ω -ctx-MVIIA) obtida do veneno do *Conus magnus*, inibidora seletiva de CCSV tipo-N, foi a primeira molécula derivada de toxina a ser aprovada pelo FDA para o alívio de dor crônica intratável. Prialt[®] é o nome comercial da ω -ctx-MVIIA, também conhecida como SNX-111 e Ziconotida, e teve seu uso clínico aprovado nos Estados Unidos em dezembro de 2004 e na Europa em Fevereiro de 2005 (Hogg, 2006). Outra ω -ctx conhecida também derivada do *Conus magnus* é a ômega-conotoxina-MVIIC (ω -ctx-MVIIC), que apresenta maior afinidade por canais de cálcio do tipo-P/Q e 70 % de identidade com a ω -ctx-MVIIA.

Atualmente, já se sabe que os CCSVs do tipo-L e do tipo-N estão diretamente implicados na liberação de neurotransmissores e neuromoduladores nos neurônios sensoriais da medula espinhal. Sabe-se também que o bloqueio dos canais do tipo-N e P/Q, mas não do tipo-L, reduzem os sinais comportamentais da dor de origem neuropática em modelos animais de lesão nervosa e que os canais de cálcio do tipo-L, -N, -P/Q, -R e até mesmo o -T, estão envolvidos na nocicepção (Prado, 2001).

Infelizmente, a administração por via intratecal (i.t) de ω -ctx-MVIIA causa vários efeitos adversos (Penn e Paice, 2000) e ainda é difícil compreender as ações do Ca^{2+} nos processos de dor crônica, assim faz-se necessário a descoberta de novas moléculas bloqueadoras seletivas para os diferentes CCSVs (Matthews e Dickenson, 2001).

1.7 *Phoneutria nigriventer*

A aranha *Phoneutria nigriventer* pertence à família dos ctenídeos e é também conhecida como aranha armadeira por erguer as patas dianteiras para atacar (Figura III).

É altamente agressiva, quando incomodada pica diversas vezes, e é responsável por aproximadamente 42% dos casos de picadas por aracnídeos notificadas no país, perdendo apenas para a aranha marrom (Ministério da Saúde, 2001).

A aranha armadeira possui um corpo que varia de 3,5 a 5 cm, com pernas de até 17 cm de envergadura, não constrói teia e é encontrada desde o sul do Rio de Janeiro até o Uruguai (Eickstedt, 1983; Lucas, 1988).

As picadas da *P. nigriventer* podem ser bastante dolorosas além de causar sinais e sintomas como inchaço e vermelhidão, ao redor dos pontos de inoculação, câimbras, tremores, convulsão tônica, paralisia espástica, priapismo, arritmias, distúrbios visuais e sudorese (Lucas, 1988).

A associação entre sintomas observados em humanos e entre resultados de administrações intra-cérebro-ventriculares em animais de laboratório levou a constatação de que as várias toxinas presentes no veneno, apresentam atividade neurotóxica e parte deste efeito parece estar relacionado a sua ação sobre canais de sódio sensíveis à voltagem (Araújo *et al.*, 1993; Matavel *et al.*, 2002; Romano-Silva *et al.*, 1993). Enfim, o sucesso da *P. nigriventer* como predadora pode ser explicado pelas diversas toxinas presentes em seu veneno (Gomez *et al.*, 2002).



Figura III. Aranha “armadeira”, *Phoneutria nigriventer*.

Fonte: www.icb.ufmg.br/.../phoneutria_nigriventer.jpg

1.8 Ação das toxinas purificadas do veneno da *Phoneutria nigriventer*

A atividade das toxinas purificadas do veneno da *P. nigriventer* tem sido extensivamente investigada e cerca de dezessete peptídeos, com atividade tóxica já foram descritos na literatura (revisado por Gomez *et al.*, 2002). Elas são basicamente polipeptídeos com peso molecular que varia de 3500 a 9000 Da e já se sabe que algumas classes interagem com canais iônicos para os íons sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) (Grishin, 1999).

A caracterização bioquímica e farmacológica dessas toxinas possibilitaria seu uso como ferramentas de investigação das funções dos diferentes canais iônicos em nível molecular e celular (Diniz *et al.*, 1990; Araújo *et al.*, 1993; Romano-Silva *et al.*, 1993; Cassola *et al.*, 1998). Já o veneno bruto é investigado por sua habilidade em alterar sistemas fisiológicos (Costa *et al.*, 2002; Rapôso *et al.*, 2007).

Os peptídeos purificados do veneno foram divididos em várias famílias, sendo a família Tx2 conhecida por atuar em canais de Na^+ provocando a liberação de acetilcolina de sinaptosomas de córtex de ratos (Moura *et al.*, 1998), reduzindo sua cinética de inativação e conseqüentemente aumentando a condutância do íon sódio (Matavel *et al.*, 2002). Estudos publicados descrevem a ação de algumas toxinas de *P. nigriventer* na inibição das correntes geradas pelo influxo de íons Ca^{2+} (Cassola *et al.*, 1998) ou no bloqueio de seu influxo em terminais sinápticos (Guatimosim *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1998; Prado *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2003), sendo que nos últimos, das seis diferentes toxinas da família Tx3 (Tx3-1 a 6), pelo menos a metade delas, Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6 bloquearam o influxo de Ca^{2+} induzido por KCl. A partir disto, passou-se a especular que as últimas atuariam bloqueando CCSVs e portanto, se equiparariam as ω -toxinas. Posteriormente, verificou-se que a Tx3-2 era capaz de bloquear CCSVs tipo-L, parcialmente (Kalapothakis *et al.*, 1998) e que a Tx3-1 bloqueava correntes de canais de K^+ tipo-A reverssivelmente, e que este tipo de

corrente é um fator determinante da frequência de oscilações do íon Ca^{2+} em células GH3 não estimuladas (Kushmerick *et al.*, 1999).

Trabalhos contínuos com as toxinas demonstraram que a Tx3-4 bloqueia canais de cálcio tipo-N (Cassola *et al.*, 1998; Dos Santos *et al.*, 2002) e do tipo-P/Q com afinidade similar e tipo-R, com menor seletividade (Dos Santos *et al.*, 2002). Essa toxina parece ter afinidade por vários sítios de ligação, sendo parcialmente deslocada pelas ω -toxinas GVIA e/ou MVIIC (Dos Santos *et al.*, 2002) e possui um intrigante mecanismo de ação, uma vez que também reduz a liberação de glutamato, dependente e independente de Ca^{2+} em terminações nervosas de ratos (Reis *et al.*, 1999). Além disso, a Tx3-4 também inibe a exocitose de vesículas sinápticas evocada por KCl, dependente de Ca^{2+} (Junior *et al.*, 2008) e também inibe a degeneração neuronal, como comprovado em modelo de isquemia *in vitro* (Pinheiro *et al.*, 2006, 2009).

O efeito de bloquear os CCSVs do tipo-N e P/Q, envolvidos na transmissão nociceptiva (Malmberg *et al.*, 1994), com atuação equivalente às ω -ctxs e a Tx3-6 ou Ph α 1 β (Souza *et al.*, 2008), indica que a TX3-4 poderia apresentar potencial terapêutico no tratamento da dor.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ação antinociceptiva espinhal da toxina Tx3-4 em camudongos utilizando modelos de dor.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração intratecal da Tx3-4 sobre diferentes modelos de nocicepção;
- Investigar possíveis efeitos adversos produzidos pela administração intratecal da Tx3-4;
- Comparar as respostas antinociceptivas da Tx3-4 com as ω -ctxs MVIIC e MVIIA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos

-Cilindro Giratório (Rotarod)

Insight

-Placa Quente (Hotplate)

Insight

-Filamentos de Von Frey

Stoelting

-Monitor de Atividade

Accuscan Instruments

3.1.2 Reagentes e Toxinas

Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e NaCl , para preparo do PBS, foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (St. Louis, EUA). As ômega-conotoxinas MVIIA e MVIIIC foram adquiridas da Latoxan (Valence, França). O sulfato de morfina e o formaldeído, para preparo da formalina, do laboratório Cristália (São Paulo, Brasil) e a toxina Tx3-4 foi purificada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-35 g), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com livre acesso à água e comida e mantidos em ciclo 12 h luz/escuro com temperatura ambiente constante em $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram realizados em acordo com o Comitê Ético de uso de animais de experimentação (CETEA) da UFMG.

3.2 Métodos

3.2.1 Administração intratecal

As injeções por via intratecal (i.t.) foram realizadas de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980). O volume de 5 μ L foi administrado em animais não anestesiados com uma microseringa Hamilton, enquanto o animal foi gentilmente imobilizado para ser mantido na posição necessária para administração intratecal entre as vértebras L5-L6. A perfuração da dura-máter foi indicada comportamentalmente por um rápido movimento da cauda.

3.2.2 Teste da placa quente

Esse teste teve como finalidade avaliar a nocicepção aguda causada por estímulo térmico. O ensaio foi realizado conforme descrito por Malmberg and Yaksh (2001). Os animais receberam, por via i.t., veículo (PBS, 5 μ L/sítio), Tx3-4 (30 pmol/sítio), MVIIC (30 pmol/sítio) ou morfina (3000 pmol/sítio). O teste da placa quente foi realizado de 0,25 até 4 horas após a administração dos tratamentos, a uma temperatura de $55\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A resposta nociceptiva foi avaliada pela latência, em segundos (s), que os animais levaram para lambe as patas ou saltar da placa quente, estabelecendo-se um teto de 30 segundos para evitar lesão tecidual.

3.2.3 Teste da formalina

Esse teste foi realizado conforme procedimentos descritos por De Souza *et al.* (2001) com objetivo de investigar o efeito das toxinas em modelo de nocicepção neurogênica e inflamatória. Para avaliar se a toxina Tx3-4 previne o aparecimento da nocicepção, camundongos receberam 5 µL de Tx3-4 (3; 10 e 30 pmol/sítio), MVIIA (0,01; 0,1; 1 e 10 pmol/sítio), MVIIC (0,03; 0,3; 3 e 30 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5µL/sítio), 0,25; 0,5; 1; 2; 3, ou 4 horas antes da injeção subcutânea (s.c.) de formalina 2,5% (20 µL) na pata traseira direita. Já para verificar se a Tx3-4 pode reverter um processo nociceptivo já instalado, grupos de animais receberam Tx3-4 (3-30 pmol/sítio), MVIIA (0,01-10 pmol/sítio), MVIIC (0,3-30 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5 µL/sítio) 9 a 12 minutos após a injeção de formalina. Foi registrado o tempo de reação, em segundos (s), como o tempo de lambida da pata injetada ou sua retirada do chão, sendo esses os indicativos de nocicepção. Os animais foram observados durante 30 minutos, divididos em duas fases. A primeira foi avaliada de 0-5 minutos (Fase neurogênica) e a outra de 15-30 minutos (Fase inflamatória).

3.2.4 Efeitos adversos

A administração intratecal de bloqueadores de CCSVs do tipo-N e -P/Q pode causar vários efeitos adversos como movimentos de cauda, tremores, disfunções motoras severas e paralisia (Malmberg e Yaksh, 1994). Uma vez presentes, esses efeitos têm a capacidade de interferir na avaliação das respostas antinociceptivas já que estas dependem da integridade física do animal. A dose tóxica foi estimada a partir do Método de up-and-down (Dixon, 1965; Lichtman, 1998). Este é um procedimento reconhecido por reduzir o número de animais de laboratório necessários para determinar os valores de DT₅₀ (dose necessária para causar efeitos tóxicos em 50% dos animais) sem comprometer a reprodutibilidade. Para o presente estudo foram utilizados 6

camundongos, iniciou-se a administração intratecal da Tx3-4 com a dose de 30 pmol/sítio e manteve-se a escala farmacológica tanto com doses superiores quanto inferiores a dose inicial, de acordo com a resposta de cada animal. Caso o animal que recebeu a injeção de 30 pmol/sítio apresentasse algum dos efeitos motores acima citados, administraríamos uma dose 3,3 vezes inferior a inicial, senão administraríamos uma dose 3,3 vezes superior e assim se seguia para cada dose até o sexto camundongo. O cálculo do DT₅₀ e o Intervalo de Confiança 95% foram calculados segundo as seguintes fórmulas:

DT₅₀= log da última dose+ (k);

IC 95%= incremento da dose x $\sqrt{2/n}$ x 1.96;

K= constate baseada na tabela de Dixon.

3.2.4.1 Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)

Esse teste foi realizado com o objetivo de avaliar alterações sobre a coordenação motora dos animais devido à administração de Tx3-4, MVIIA ou MVIIC e verificar a possibilidade de um relaxamento muscular não específico ou efeito sedativo.

O procedimento foi realizado conforme descrito por Tsuda *et al.* (1996). Vinte e quatro horas antes do experimento, camundongos foram treinados no rotarod (3,7 cm de diâmetro, 12 rpm) por dois períodos de 60 segundos, com intervalo de 60 s entre eles. No dia do experimento, os animais foram injetados com 5 µL(i.t.) de veículo, Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω-ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) ou ω-ctx-MVIIA (1 pmol/sítio) e cada animal de cada grupo foi submetido ao cilindro giratório 15 e 60 minutos depois da administração. O número de quedas e a latência da 1ª queda foram registrados durante 4 minutos.

3.2.4.2 Atividade Exploratória (Campo Aberto)

Para avaliar o efeito da administração i.t. da toxina Tx3-4 sobre a atividade locomotora espontânea (exploração horizontal e vertical), os animais foram colocados em fotocélulas com 40X12X40 cm de dimensão, divididas em quatro partes, com 20X12X20 cm de dimensão (campo aberto para camundongos). A atividade motora foi medida através de um monitor de atividade que utiliza três detectores de luz infravermelha, cada um localizado em uma fotocélula (Sotnikova *et al.*, 2004). Os animais receberam administração intratecal de 5 µL de veículo (PBS), Tx3-4 (30 pmol/sítio), MVIIA (1 pmol/sítio) ou MVIIC (30 pmol/sítio) e em seguida, foram submetidos ao campo aberto e avaliados por 5 minutos nos intervalos de 15 e 60 minutos após a administração. Para avaliar a exploração horizontal foi medida a distância total percorrida em centímetros (cm) e para a exploração vertical o tempo de “rearings” em segundos (s).

3.2.5 Modelo de nocicepção espontânea induzida por NMDA

O procedimento foi realizado segundo Urca e Raigorodsky (1988), e seu objetivo foi avaliar a possível participação do receptor NMDA na inibição de respostas antinociceptivas induzidas pela toxina Tx3-4. Os camundongos foram submetidos à administração intratecal do bloqueador do PBS (veículo), do MK-801 (30 nmol/sítio, usado como controle positivo) e da Tx3-4 (3-30 pmol/sítio) co-administrados com NMDA (3 nmol/sítio). Foi registrado tempo de reação (em segundos, s) de mordida da cauda ou do movimento de coçar os quadris, sendo esses os indicativos de nocicepção. Os animais foram observados durante 3 minutos.

3.2.6 Modelo de dor incisional

Este teste teve como finalidade investigar o efeito antinociceptivo da Tx3-4 no modelo de dor pós-cirúrgica induzida por incisão na pata. O procedimento foi realizado conforme descrito por Pogatzki e Raja (2003). No dia do experimento os animais foram anestesiados previamente com halotano e receberam uma incisão longitudinal de 0,5 cm na pata. O músculo plantar foi elevado e a pele foi imediatamente suturada com fio cirúrgico 6-0. A nocicepção foi avaliada através da alodínia mecânica (Sensibilidade dolorosa a um estímulo anteriormente inócuo) por filamentos de Von-Frey (1,4; 0,4g; 0,16; 0,07 e 0,02, 1 aplicação durante 5 segundos), utilizando Método de “up-and-down” (Dixon, 1965; Dixon, 1982). Para avaliar se a Tx3-4 pode reverter um processo nociceptivo já instalado, verificado pela presença de alodinia mecânica, grupos de animais receberam Tx3-4 (3 pmol/sítio), ω -ctx-MVIIC (3 pmol/sítio), MK801 (30 nmol/sítio) ou veículo (PBS, 5 μ L/sítio) 10 min após a incisão avaliado-se a nocicepção 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após a administração dos tratamentos.

3.2.7 Avaliação da alodínia mecânica através dos filamentos de Von Frey

A alodínia mecânica foi avaliada nos modelos de dor inflamatória e neuropática, utilizando os filamentos de Von frey (Dixon, 1980). Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico sobre uma tela de metal e climatizados por, no mínimo, 1 hora antes do teste. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente a superfície plantar dos animais. Foram analisadas as respostas em relação à tensão-resposta aos vários filamentos que por sua vez produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva). As sessões em camundongos iniciaram com a aplicação do filamento de 0,4g (gramas). Caso a tensão-resposta fosse nociva, utilizava-se um

filamento com menor valor em (g) a partir da última resposta. Os filamentos de Von Frey foram aplicados por seis sessões e a retirada da pata foi registrada como porcentagem das respostas.

A fórmula utilizada para avaliar o limiar 50% no modelo de alodínia mecânica (filamento de Von Frey) é:

Limiar 50% = log do último fio + (k. média)

Sendo que: log do último fio = significa o valor do último filamento utilizado na série de seis aplicações dos filamentos de Von Frey;

K = constante baseada na tabela de Dixon;

Média das diferenças da força dos filamentos em log para camundongos = 0,44.

3.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M, $I_{m\acute{a}x}$ e DI_{50} (dose das toxinas que reduz as respostas nociceptivas na ordem de 50% em relação às inibições máximas). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni ou pelo teste de Student Newman-Keuls e por Teste t de Student, quando apropriado. Valores de p menores que 0,05 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram considerados como indicativos de significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de dor térmica transitória (Placa quente)

A administração intratecal de Tx3-4 ou ω -ctx-MVIIC nas doses de 30 pmol/sítio, não produziu antinocicepção no teste da placa quente, ou seja, não houve aumento significativo da latência de resposta ao estímulo térmico em nenhum dos intervalos observados (Fig. 1A e B). A dose de 30 pmol foi escolhida por ser a maior dose testada para a qual não observamos efeitos colaterais. Já os animais que receberam morfina (3000 pmol/sítio), modelo clássico padronizado para o teste da placa quente, apresentaram resposta antinociceptiva com efeito de $60\pm 19\%$, que se iniciou 2 horas após sua aplicação e durou 1 hora (Fig. C), doses menores de morfina não apresentaram efeito significativo.

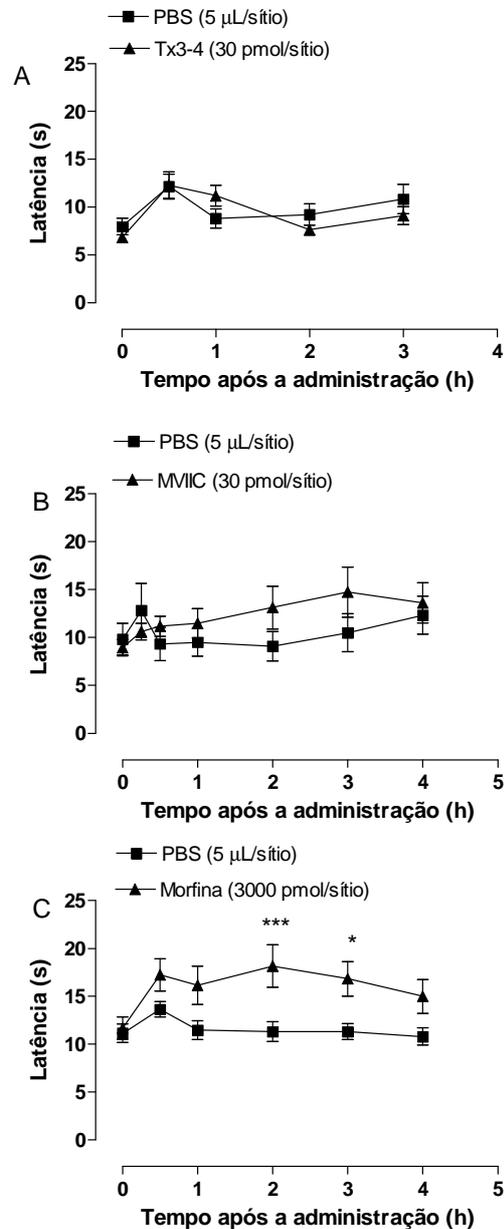


Figura 1. Efeito antinociceptivo em modelo de dor aguda térmica produzida pela injeção intratecal de A) toxina Tx3-4 (30 pmol/sítio), B) ω -ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) e C) Morfina (3000 pmol/sítio). 0h representa os valores basais obtidos antes da administração dos tratamentos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de 8-13 animais, dependendo do grupo. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ representam o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

4.2 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de dor química persistente (Formalina)

Ao contrário do observado no teste da placa quente, a administração intratecal prévia de Tx3-4 na dose de 30 pmol/sítio causou antinocicepção na fase inflamatória quando injetada 30 minutos (0,5 h) ou 1 hora antes da injeção de formalina (Fig. 2B). A inibição da nocicepção 1 hora após a injeção da Tx3-4 foi de $60\pm 8\%$. Já na fase neurogênica, não houve efeito antinociceptivo detectável (Fig. 2A).

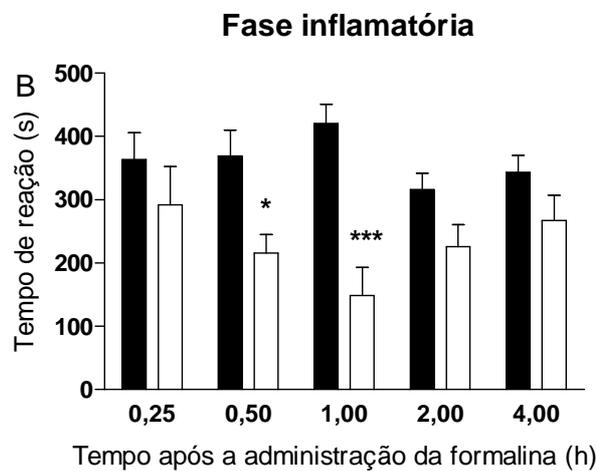
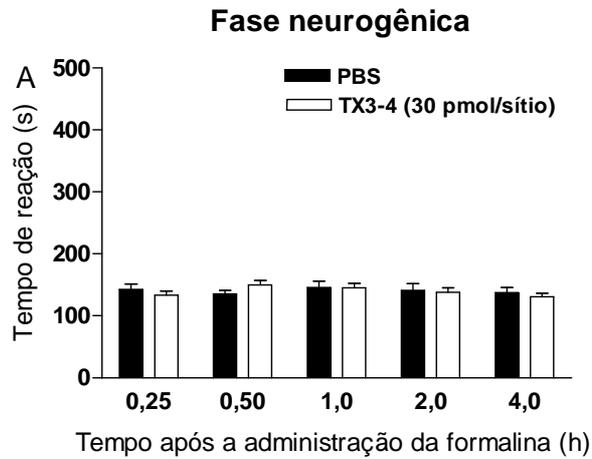


Figura 2. Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina TX3-4 (30 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 8-10 animais. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ representam o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

A administração intratecal da ω -ctx-MVIIC, na dose de 30 pmol/sítio, não causou efeito antinociceptivo na fase neurogênica ou inflamatória quando administrados 0,25; 0,5; 1 e 2 horas antes da injeção de formalina (Fig. 3A e B).

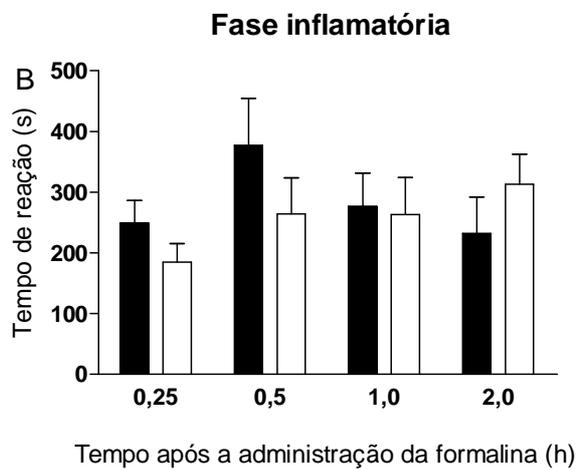
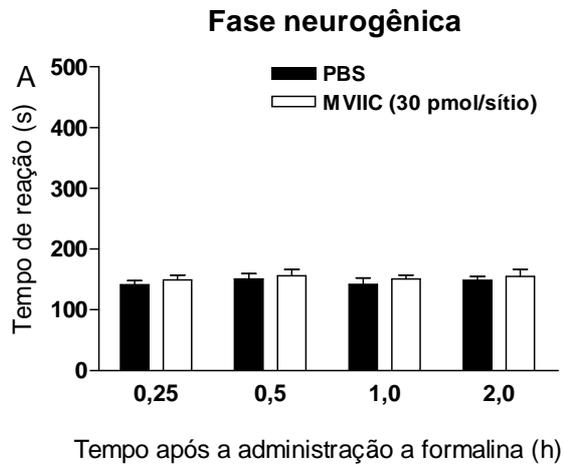


Figura 3. Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da ω -ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 8-9 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

Em vista da ausência de atividade antinociceptiva da ω -ctx-MVIIC, realizou-se administração intratecal da ω -ctx-MVIIA, na dose de 1 pmol/sítio, para fins de comparação e esta não apresentou efeito antinociceptivo na fase neurogênica (Fig. 4A). Já na fase inflamatória, a ω -ctx-MVIIA apresentou ação antinociceptiva quando administrada 1 hora antes da injeção de formalina (Fig. 4 B) com inibição de $58 \pm 10\%$.

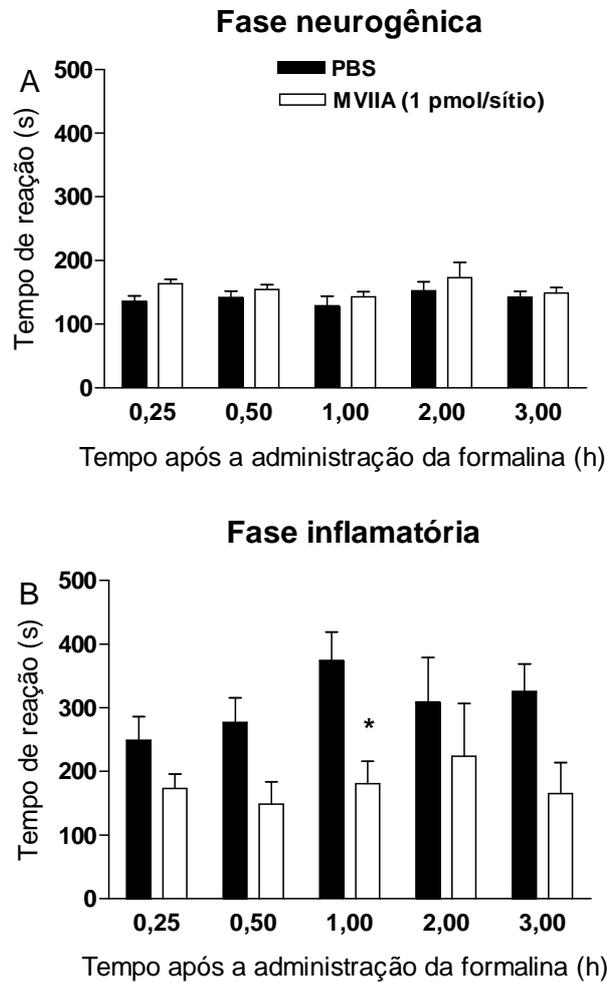


Figura 4. Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da ω -ctx-MVIIA (1pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 8-11 animais. * $p < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

Para avaliar a potência antinociceptiva da Tx3-4 e da ω -ctx-MVIIA no teste da formalina, foram construídas curvas-dose resposta para estas toxinas 1 hora após sua administração (Fig. 5). Nenhuma das doses de Tx3-4 (3-30pmol/sítio) testadas 1 hora antes da administração de formalina apresentou efeito na fase neurogênica (Fig. 5A). O contrário se observa na fase inflamatória, na qual houve redução significativa da latência de resposta comparada ao controle (Fig. 5B), com DI_{50} calculada de 11 (6-20) pmol/sítio e inibição de $55\pm 7\%$. Doses maiores que 50 pmol/sítio não puderam ser testadas em virtude de produzirem efeitos adversos motores.

A administração intratecal da ω -ctx-MVIIA (0,01-1 pmol) produziu efeito assim como a Tx3-4 (Fig. 5C e D). A DI_{50} calculada foi de 0,01 (0,001-0,2 pmol/sítio) e a inibição de $49\pm 10\%$. Doses maiores que 3 pmol/sítio não puderam ser testadas em virtude de produzirem efeitos adversos (Malmberg *et al.*, 2003).

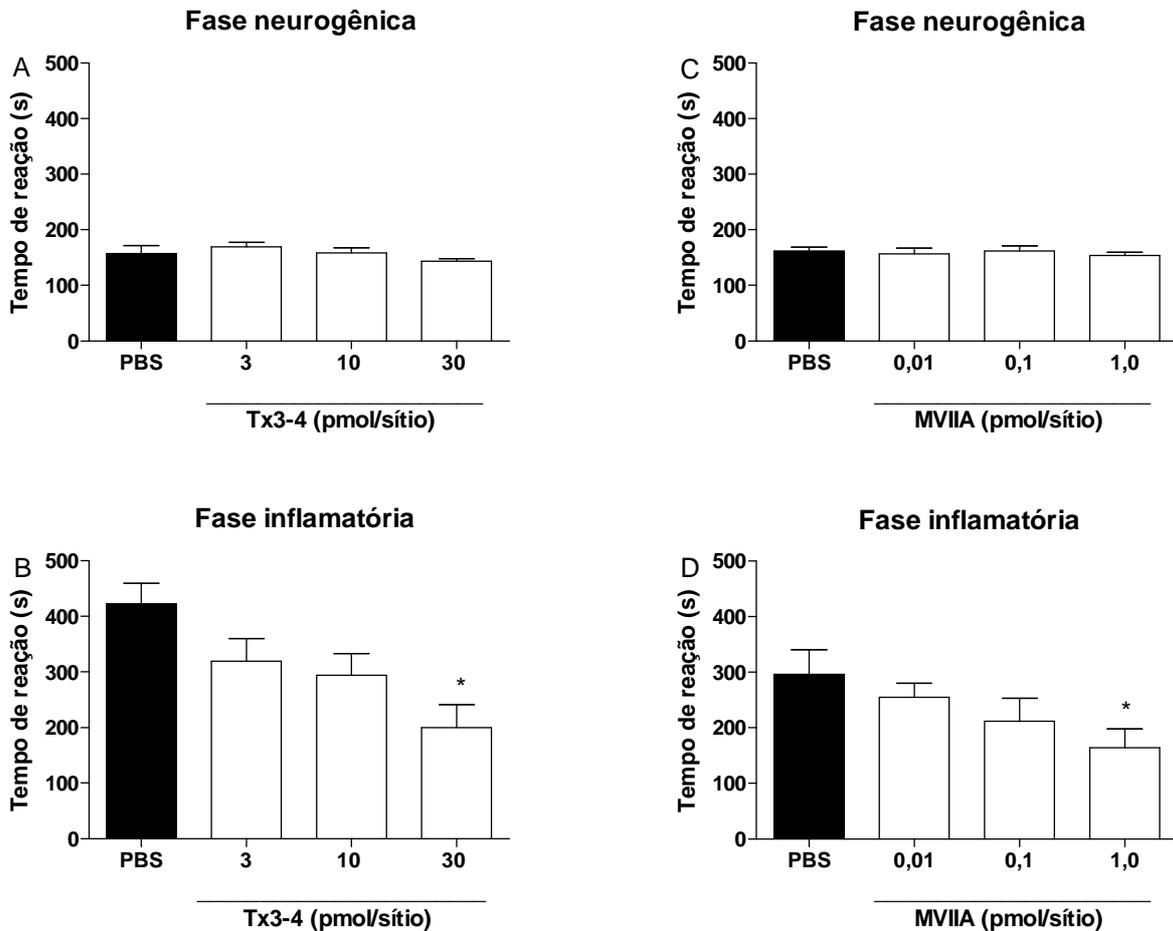


Figura 5. Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Tx3-4 (3-30 pmol/sítio) e de ω -ctx-MVIIA (0,01-1 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina 1 hora antes de sua administração (s.c) nas patas traseiras direita. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 8-10 animais, dependendo do grupo. * $p < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newmann-Keuls em B e Teste t em D).

Posteriormente, investigou-se a capacidade da Tx3-4, da ω -ctx-MVIIC e ω -ctx-MVIA de reverter um quadro nociceptivo já instalado. A administração intratecal da Tx3-4 (3-30pmol/sítio) 9 minutos após a injeção da formalina foi capaz de reduzir a latência de resposta sendo a resposta significativa apenas para a dose de 30 pmol/sítio (Fig. 6A). A DI_{50} calculada foi de 8 (3 a 22) e inibição de $60\pm 9\%$.

A administração intratecal da ω -ctx-MVIIC (0,03-30 pmol/sítio), 9 minutos após a injeção de formalina foi capaz de reduzir a fase inflamatória (Fig. 6B), com DI_{50} calculada de 0,06 (0,01 a 0,3) e inibição de $48\pm 12\%$. Já a administração da ω -ctx-MVIA (0,01-1 pmol/sítio) não foi capaz de exercer efeito antinociceptivo como pós-tratamento (Fig. 6C).

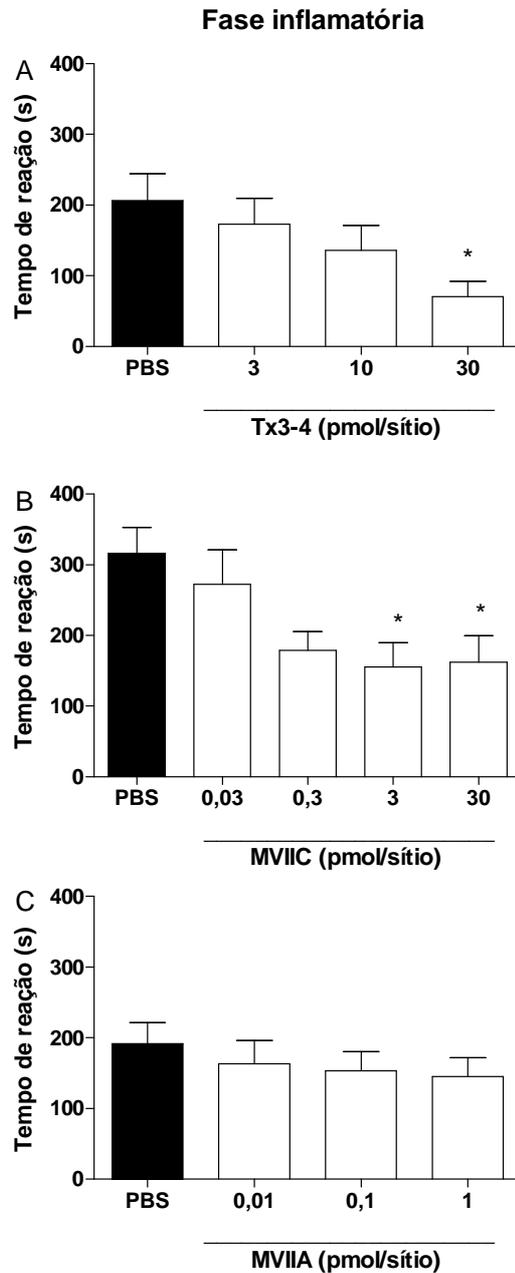


Figura 6. Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal de A) Tx3-4 (3-30 pmol/sítio, B) ω -ctx-MVIIC (0,03-30 pmol/sítio) e C) ω -ctx-MVIA (0,01-1 pmol/sítio) 9 minutos após a administração da formalina. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 8-11 animais. * $p < 0,05$ representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newmann-Keuls).

4.3 Avaliação dos efeitos adversos

A administração intratecal das maiores doses de Tx3-4 induziu sinais indicativos de toxicidade, especialmente paralisia flácida e dificuldade respiratória. A dose tóxica 50 (DT_{50}) calculada foi de 38 (12-120) pmol/sítio em animais controle. Como a dose terapêutica (DI_{50} para o efeito antinociceptivo) foi de 11 pmol/sítio, assim o índice terapêutico encontrado foi baixo, de aproximadamente 3 vezes.

A avaliação da atividade locomotora forçada em cilindro giratório foi avaliada através dos parâmetros Latência da 1ª queda e Número de quedas. Os animais receberam administração prévia intratecal de Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) ω -ctx-MVIIA (1 pmol/sítio) e foram avaliados nos intervalos de 0,25 e 1 hora, horários próximos ao pico de ação das toxinas no teste da formalina.

Podemos observar que as doses de Tx3-4, ω -ctx-MVIIC e ω -ctx-MVIIA não provocaram sedação ou redução significativa no desempenho motor nos intervalos observados. Ou seja, não causaram alteração na latência da 1ª queda (Fig. 7A e B) e nem no número de quedas (Fig. 7C e D).

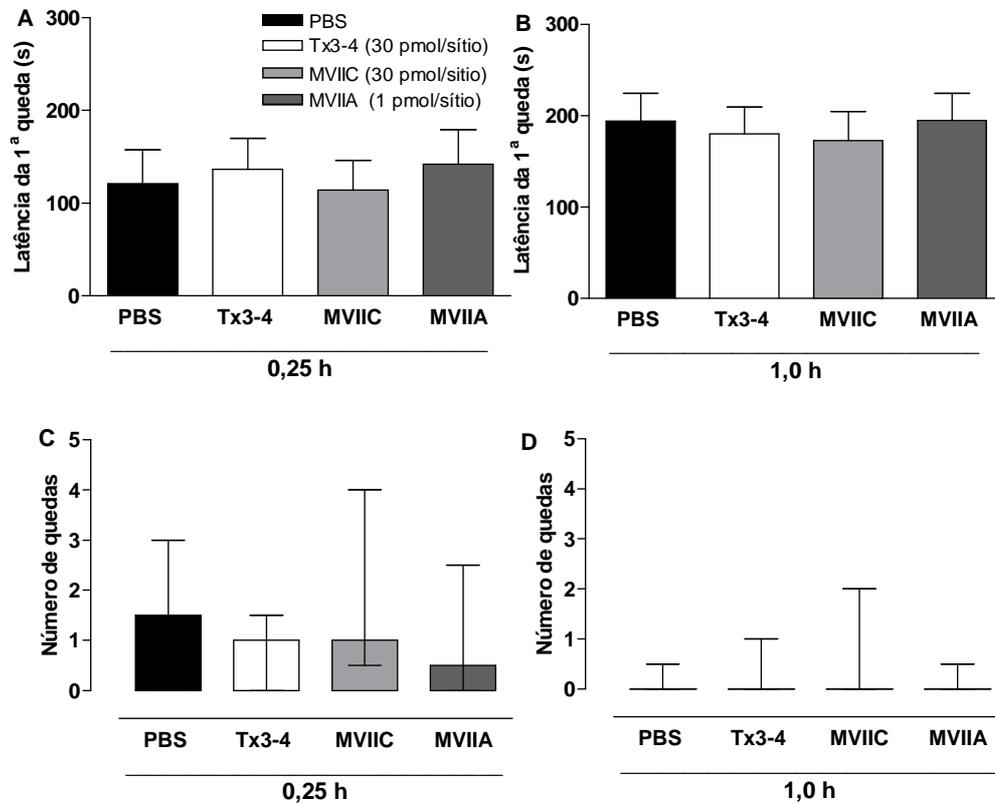


Figura 7. A) e B) latência da 1ª queda aos 15 minutos e 1 hora após a administração de PBS (5 μ L/sítio), Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) ou ω -ctx-MVIA (1 pmol/sítio). Cada grupo representa a média \pm erro padrão de 7-8 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls). C) e D) número de quedas aos 15 minutos e 1 hora após a administração do PBS e toxinas. Cada grupo representa mediana \pm intervalo interquartil 75% de 7-8 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis).

A avaliação da atividade exploratória foi realizada com as mesmas doses nos mesmos intervalos da avaliação da atividade locomotora em cilindro giratório. Os parâmetros avaliados foram “Rearing” em segundos (s) e a distância total percorrida em centímetros (cm).

Nota-se que a ω -ctx-MVIIC induziu hiperatividade em 15 minutos, ou seja, alterou o tempo de “rearing” e a distância total percorrida comparado à Tx3-4 e à ω -ctx-MVIA (Fig. 8A e C). O mesmo ocorreu em 1h, com diferença significativa detectável apenas para distância percorrida (Fig. 8D).

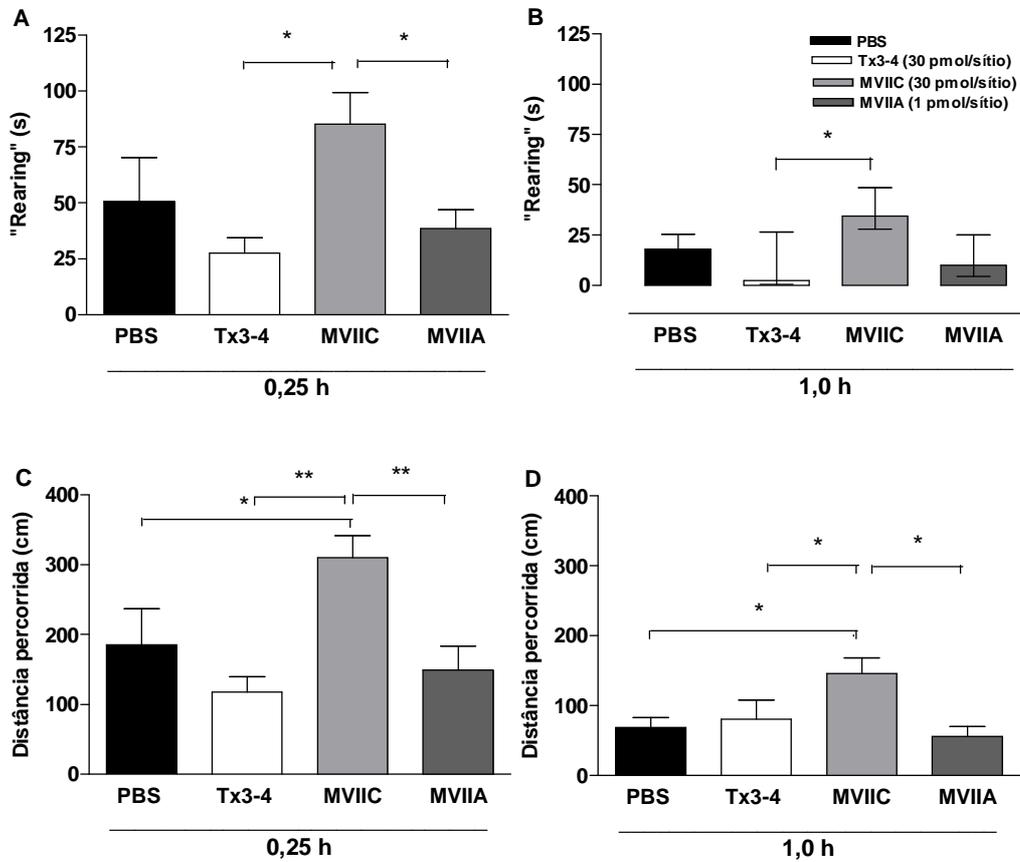


Figura 8. A) e B) Tempo de “rearing” aos 15 minutos e 1 hora após administração de PBS (5 μ L/sítio), Tx3-4 (30 pmol/sítio), ω -ctx-MVIIC (30 pmol/sítio) ou ω -ctx-MVIIA (1 pmol/sítio). C) e D) Distância total percorrida aos 15 minutos e 1 hora após a administração do PBS e toxinas. Em A), C) e D) cada grupo representa a média \pm erro padrão de 7-8 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam o nível de significância (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newmann-Keuls). Em B) cada grupo representa a mediana \pm intervalo interquartil 75% de 7-8 animais (Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunns).

4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de nocicepção espontânea induzida por NMDA

O perfil antinociceptivo da toxina 3-4 (inibição somente da segunda fase e eficácia semelhante no pré ou pós-tratamento) diferiu das ω -conotoxinas, sugerindo que outro alvo farmacológico diferente dos CCSV poderia ser responsável pelo efeito antinociceptivo da Tx3-4. Estudos prévios do nosso grupo indicaram que esta toxina pode interagir com o sistema glutamatérgico (Reis *et al.*, 1999). Sabendo que o sistema glutamatérgico, especialmente o receptor NMDA é um importante mediador da nocicepção em nível medular (Haley *et al.*, 1990; Ren *et al.*, 1992; Ferreira e Lorenzetti, 1994), testamos o potencial antinociceptivo da toxina em um modelo de nocicepção espontânea induzida por um agonista do receptor NMDA. Tanto o bloqueador do receptor NMDA MK801 (30 nmol/sítio) quanto a Tx3-4 (10 e 30 pmol/sítio) reduziram significativamente a nocicepção induzida por NMDA com inibição de 78 ± 9 para MK801 e de 64 ± 12 para Tx3-4 (Fig. 9).

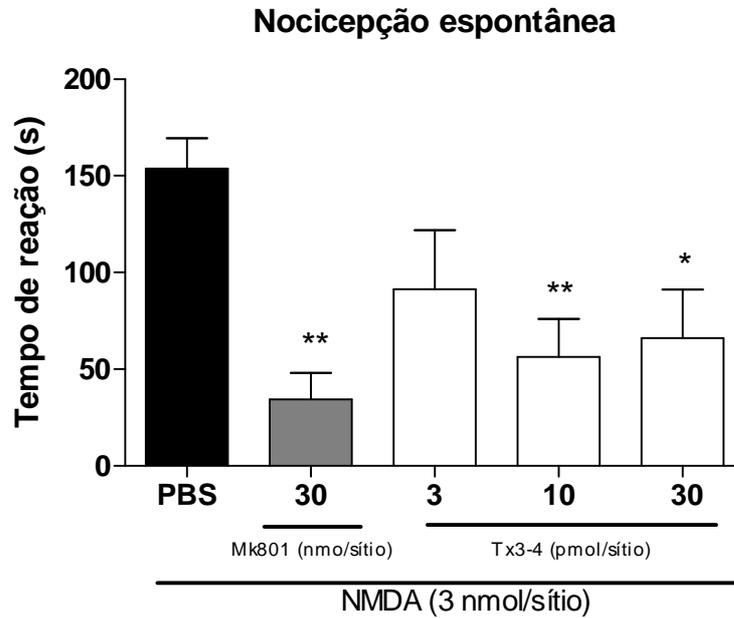


Figura 9. Efeito produzido pela injeção intratecal de MK801 (30 nmol/sítio) co-administrado com NMDA (3 nmol/sítio) e de Tx3-4 (3-30 pmol/sítio) co-administrada com NMDA (3 nmol/sítio). Cada barra representa a média \pm erro padrão de 5-6 animais. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ representam o nível de significância quando comparado aos animais tratados somente com NMDA (3 nmol/5 μ L) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newmann-Keuls).

4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelo de nocicepção incisional (Nocicepção pós-operatória)

Este teste teve como objetivo avaliar a capacidade da toxina Tx3-4 de reverter um quadro nociceptivo previamente instalado em modelo de nocicepção clinicamente relevante. Inicialmente, verificamos que a incisão na pata de camundongos induz uma intensa alodínia mecânica, caracterizada como uma redução no limiar de detecção do estímulo mecânico em relação aos valores basais (Fig. 10). Observou-se a ação da Tx3-4 (3 pmol/sítio), ω -ctx-MVIIC (3 pmol/sítio) e MK801 (30 nmol/sítio) de 0,25 a 4 horas após sua administração. A ω -ctx-MVIIA não foi incluída no presente experimento uma vez que já existem estudos utilizando a mesma em modelo de nocicepção pós-operatória (Wang *et al.*, 2000).

Tanto a Tx3-4, ω -ctx-MVIIC e MK801 foram capazes de reverter a alodínia mecânica previamente instalada com efeito de $80\pm 12\%$ para Tx3-4 e de $69\pm 16\%$ para MK801 em 1 hora e de $65\pm 10\%$ para ω -ctx-MVIIC em 0,25 h (Fig 10). Pode-se observar que a Tx3-4 e a ω -ctx-MVIIC apresentaram efeito antinociceptivo com doses até 10 vezes menores em relação àquelas utilizadas no teste da formalina, com pico de ação em intervalos de tempo próximos aos observados neste mesmo teste.

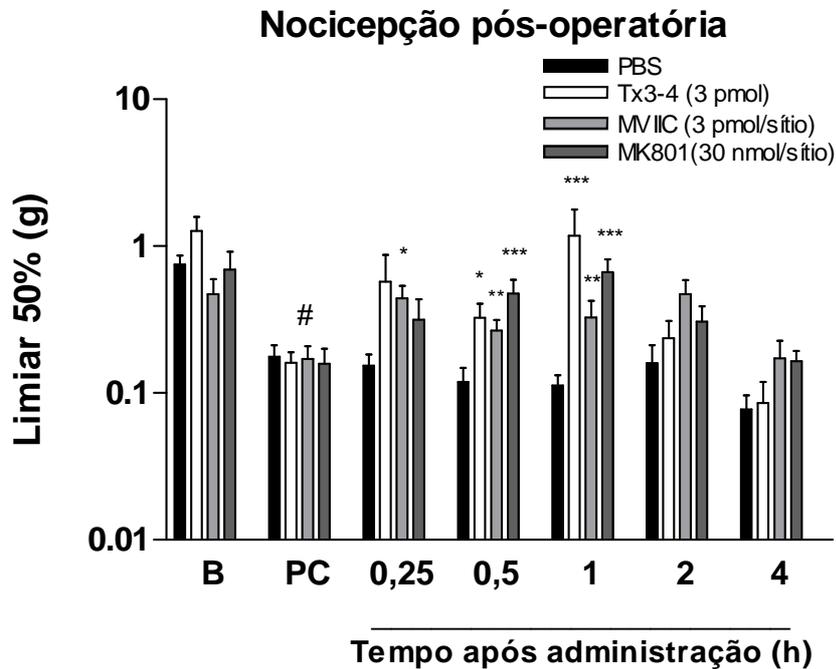


Figura 10. Efeito produzido pela injeção intratecal de Tx3-4 (3 pmol/sítio), MVIIIC (3 pmol/sítio) e MK801 (30 nmol/sítio). **B**, basal e **PC**, pós-cirurgia. Cada barra representa a média \pm erro padrão de 6-8 animais. $p < 0,01$ para interação (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni). # $p < 0,05$ representa o nível de significância logo após a cirurgia quando comparado ao respectivo basal (Teste t de Student). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ representam o nível de significância quando comparado aos animais tratados somente com PBS (5 μ L/sítio) para cada intervalo de tempo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newmann-Keuls).

5. DISCUSSÃO

As síndromes dolorosas persistentes provocam sofrimento e estresse e seus mecanismos ainda não foram completamente elucidados (Woolf e Mannion, 1999). Seu controle ainda é um grande desafio porque algumas modalidades são refratárias aos analgésicos disponíveis, havendo assim a necessidade de novos fármacos, mais seletivos que não induzam tolerância ou dependência e que sejam capazes de tratar dores de difícil tratamento como, por exemplo, as neuropatias (Hogg, 2006).

É de conhecimento que os opióides são considerados os fármacos mais potentes utilizados no tratamento de dores agudas e crônicas, entretanto causam vários efeitos adversos como constipação, dependência, tolerância e depressão respiratória, o que restringe seu uso (Hoskin e Hanks, 1991; Martin e Sloan, 1977; McQueen, 1983; Nestler, 1993).

Este estudo teve como objetivo investigar a ação antinociceptiva da toxina Tx3-4, um peptídeo purificado do veneno da *P. nigriventer*, e avaliar seu potencial como possível agente analgésico. Sabe-se que um de seus mecanismos de ação é através da inibição de correntes de CCSVs principalmente do tipo-N e -P/Q e também -R (Dos Santos *et al.*, 2002) e que o influxo de cálcio através dos CCSVs está envolvido na liberação de neurotransmissores e modulação da excitabilidade de membranas celulares (Zamponi e Snutch, 1998). Além disso, estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e moleculares indicam que estes canais exercem importante papel no controle de processos nociceptivos na medula espinhal (Altier e Zamponi, 2004).

Os canais do tipo-N são conhecidos por sua atividade pró-nociceptiva nas duas fases do teste da formalina enquanto os do tipo-P/Q atuam principalmente na segunda fase (Malmberg e Yaksh, 1994). Este envolvimento dos CCSVs citados com nocicepção está em conformidade com a distribuição do tipo-N principalmente em dendritos e corpos celulares das lâminas II a IV e do tipo-P/Q

em terminações nervosas de fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula e em dendritos e corpos celulares dos neurônios motores (Murakami *et al.*, 2004). Assim, toxinas que interferem em CCSVs podem ser utilizadas para modular a liberação de neurotransmissores em condições dolorosas (Miljallich *et al.*, 1995).

O veneno da *P. nigriventer* contém um coquetel de toxinas que afetam os canais iônicos, sendo os CCSVs alvo das toxinas Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6, derivadas da fração PhTx3 (revisado por Gomez *et al.*, 2002). E assim justifica-se sua ação sobre vários sistemas fisiológicos, em particular aqueles relacionados com dor e inflamação (Costa *et al.*, 2002, Souza *et al.*, 2008).

Vários modelos de nocicepção foram utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva da toxina Tx3-4, e ressalta-se que estes apresentam características próprias que devem ser consideradas tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados e possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (Besson, 1999; Le Bars *et al.*, 2001).

Iniciamos os experimentos através do teste da placa quente por este ser um teste simples e de curta duração. Seu objetivo é mensurar a resposta nociceptiva a um estímulo térmico breve que ativa nociceptores que transmitem a informação nociva ao corno dorsal da medula e posteriormente a centros corticais, produzindo uma resposta organizada (Mogil e Adhikari, 1999). A placa quente é um dos modelos mais utilizados no estudo de fármacos analgésicos, principalmente de substâncias que possuem ação no SNC, como os opióides (Le Bars *et al.*, 2001).

Apesar da incapacidade de bloqueadores de canais tipo-P/Q atuarem no teste da placa quente, acreditava-se que Tx3-4 poderia ter efeito uma vez que bloqueadores de CCSVs do tipo-N apresentaram efeito ao inibir o estímulo nocivo térmico (Hatakeyama *et al.*, 2001; Malmberg e Yaksh, 1994). A Tx3-4 não apresentou efeito antinociceptivo no presente teste assim como a ω -ctx-MVIIC, o que já era esperado para bloqueadores seletivos tipo-P/Q. Essa conotoxina foi escolhida em detrimento a ω -ctx-MVIIA uma vez que sua atividade como bloqueadora seletiva de canais tipo-N já foi confirmada neste modelo para

camundongos assim como da $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (Souza *et al.*, 2008). Desta forma, optamos por utilizar a morfina tanto como controle positivo quanto como forma validar esses achados. Uma das possíveis explicações para ausência de efeito da Tx3-4 seria a alta temperatura, $55\pm 0,5^\circ\text{C}$, disfunções motoras leves ou pequena participação do bloqueio de CCSVs tipo-N. A temperatura foi escolhida uma vez que peptídeos derivados de animais são utilizados para substituir opióides ao tratar dores refratárias aos mesmos (Hogg, 2006), sendo esta última, a única classe de fármacos conhecida capaz de apresentar efeito a estímulo térmico de tal intensidade. Já quanto aos efeitos motores, doses de Tx3-4 e ω -ctx-MVIIC inferiores a 30 pmol/sítio foram administradas (dados não mostrados) e também se mostraram igualmente ineficazes para aumentar a latência dos animais testados. Assim resta a última possibilidade, o que não deporá contra o potencial terapêutico da Tx3-4, pois o tipo de nocicepção induzida pela placa representa uma importante função protetora na manutenção da integridade dos tecidos e deve ser evitado em certas circunstâncias.

Diante da ineficiência das duas toxinas no teste anterior, partimos para o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, que é uma das ferramentas mais utilizadas na triagem de novos compostos com potencial analgésico (Hunskar e Hole, 1987; McNamara *et al.*, 2007). O teste da formalina é caracterizado por produzir um comportamento bifásico, com transição da fase neurogênica, primeira fase, para a fase inflamatória, segunda fase ou estado de nocicepção persistente. Trata-se de um teste de nocicepção por estímulo químico, sendo que a fase neurogênica envolve principalmente a participação de fibras aferentes do tipo C (Tjolsen *et al.*, 1992) e a fase inflamatória envolve o estímulo contínuo proveniente da primeira fase além da liberação de mediadores neuroativos (Ji e Woolf, 2001; Vanegas e Schaible, 2004). Já o período entre as duas fases, que se estende aproximadamente de 5 a 15 minutos após a injeção da formalina, apresenta perfil de redução do comportamento nociceptivo devido a ativação de vias descendentes inibitórias (Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

A diferença entre os mecanismos de nocicepção das fases aguda e inflamatória pode permitir caracterização do perfil de um novo fármaco, por exemplo, os AINES que ficaram conhecidos por atuarem na segunda fase do teste da formalina, o que indicava potencial terapêutico em dores de origem inflamatória. Hoje já se sabe que seu mecanismo de ação analgésica é devido a inibição da síntese de prostaglandinas, presente na fase inflamatória do teste e em outros estados de inflamação (Dirig *et al.*, 1997). Realizamos administração prévia de Tx3-4, de ω -ctx-MVIIC, como controle para ativação de CCSVs tipo-P/Q, e de ω -ctx-MVIA como controle para ativação de CCSVs do tipo-N, e todas as toxinas, com exceção da segunda, apresentaram ação na fase inflamatória no pré-tratamento. Já no pós-tratamento, apenas a Tx3-4 e a ω -ctx-MVIIC apresentaram efeito na fase inflamatória.

Normalmente, bloqueadores de canais tipo-N inibem a fase neurogênica em concentrações superiores as necessárias para inibir a fase inflamatória (Diaz e Dickenson, 1997; Malmberg and Yaksh, 1994) e apresentam preferência pelo CCSV tipo-N no estado inativado (Stocker *et al.*, 1997). Ressalta-se a opção por uma dose baixa de ω -ctx-MVIA neste estudo, uma vez que doses superiores a 3 pmol/sítio já apresentariam potencial para alterar as respostas motoras de camundongos no teste do “rotarod” (Malmberg *et al.*, 2003). Assim, a atividade da ω -ctx-MVIA apenas na segunda fase do pré-tratamento no teste da formalina condiz com os achados de outros autores e justifica-se pela baixa dose administrada e por sua preferência por canais inativados.

Sabe-se que bloqueadores de canais do tipo-P/Q quando pré-administrados, até dez minutos antes da injeção de formalina, atuam principalmente na fase inflamatória, e a eles credita-se função de manutenção da nocicepção (Diaz e Dickenson, 1997; Malmberg and Yaksh, 1994) o que indica a participação deste tipo de CCSV nesta fase. Assim, sugere-se que uma justificativa plausível para ação da ω -ctx-MVIIC apenas no pós-tratamento seria que nesta condição, haveria aumento da proporção de CCSVs em estado aberto disponíveis para ligação com este peptídeo.

A toxina Tx3-4 apresentou perfil intermediário entre as ω -ctxs MVIIIC e MVIIA, com inibição das fases inflamatórias tanto no pré- quanto no pós-tratamento, demonstrando potencial analgésico em modelos de nocicepção inflamatória. Entretanto, optamos primeiramente por determinar o DT_{50} da Tx3-4 e excluir possíveis comprometimentos motores em animais que receberam as doses mais altas desta, ω -ctx-MVIIIC e ω -ctx-MVIIA antes de continuar a investigar seu potencial terapêutico.

Como previamente descrito, observamos que doses superiores a 50 pmol/sítio causavam paralisia flácida da cauda e patas traseiras, e alteração discreta do padrão respiratório. Sugerimos que isto tenha ocorrido através do bloqueio de CCSVs do tipo-P/Q presentes nos corpos celulares e dendritos de neurônios motores das lâminas ventrais da medula (Murakami *et al.*, 2004), e que esta resposta seria localizada. Entretanto, não é possível afirmar se a Tx3-4 poderia se difundir e alcançar estruturas superiores do SNC. Assim, estudos com marcação fluorescente e acompanhamento da difusão das moléculas de Tx3-4 fazem-se necessários para esclarecer os mecanismos para o desenvolvimento de toxicidade em altas doses.

O cálculo do DT_{50} revelou um baixo índice terapêutico, entretanto a Tx3-4 não apresentou efeitos colaterais como incoordenação motora ou alteração da atividade locomotora em um campo aberto com a dose testada (30 pmol/sítio). O contrário se observou para ω -ctx-MVIIIC, que provocou alterações no campo aberto comparada ao PBS, Tx3-4 e até ω -ctx-MVIIA. Segundo Malmberg (1994), os bloqueadores de CCSV do tipo-N causam principalmente tremor e serpenteado de cauda enquanto os do tipo-P/Q causam paralisia flácida da cauda e patas traseiras. Apesar da alta afinidade da Tx3-4 tanto pelos CCSVs tipo-N quanto -P/Q (Dos Santos *et al.*, 2002), credita-se aos últimos o aparecimento de paralisia flácida, uma vez que camundongos homozigotos com mutação espontânea que reduz a sensibilidade de ativação destes canais, “rolling mouse Nagoya”, apresentam incoordenação motora das patas traseiras (Fukamoto *et al.*, 2009).

Excluídos os efeitos colaterais nas doses testadas, investigamos o perfil farmacológico da Tx3-4 e concluímos que sua atividade antinociceptiva coincidia com estados de sensibilização central. Sabe-se que a atividade do receptor NMDA contribui para manutenção deste processo (Ferreira e Lorenzetti, 1994; Haley *et al.*, 1990; Ren *et al.*, 1992) que também está presente no teste da formalina. Além disso, observamos que o perfil da Tx3-4 se assemelha ao do MK801, inibidor não-competitivo do receptor NMDA (Hamada *et al.*, 2001). Então, testamos o efeito da phonotoxina em modelo de nocicepção induzida pela administração intratecal do NMDA, utilizamos MK801 como controle e observamos que a Tx3-4 não só apresentou efeito, mas com dose de 10 pmol/sítio. Esses achados sugerem que a Tx3-4 poderia apresentar afinidade por outros alvos além dos CCSVs, o que não seria surpresa, pois Reis e colaboradores (1999) evidenciaram que esta inibe a liberação de glutamato pela reversão do transportador, mecanismo independente de Ca^{2+} , em terminações nervosas de ratos. Uma possibilidade seria uma interação direta com o receptor NMDA já que a ω -conotoxina-GVIA e a ω -agatoxina-VIA (1 a 10 pmol/sítio), bloqueadoras de CCSVs tipo-N e -P/Q respectivamente, falharam neste modelo (Kato *et al.*, 2002) e já existe uma toxina, a conotoxina-G, capaz de bloquear os receptores NMDA que contém a subunidade NR2B (Hama e Sagen, 2009; Malmberg *et al.*, 2003). Entretanto, não se pode excluir de todo a participação dos CCSVs tipo-P/Q no modelo de nocicepção por NMDA pois a ω -agatoxina-IVA se liga a uma região que envolve o aparato de “gating” mas que não se sobrepõe à região de ligação dos bloqueadores do poro como a ω -ctx-MVIIC (Mcdonough *et al.*, 2002). Assim, faz-se necessária a utilização da conotoxina no presente modelo para excluir a participação dos CCSVs citados e realização de experimentos “*in vitro*”, como “binding” em receptor NMDA, para esclarecer se este alvo está envolvido no mecanismo de ação da Tx3-4.

Como a Tx3-4 apresentou efeito antinociceptivo em modelos em que havia envolvimento de sensibilização central, o próximo passo seria testá-la em modelos semelhantes que fossem clinicamente relevantes. O modelo de dor induzida por incisão plantar se adequaria a esta proposta por ser uma

ferramenta amplamente utilizada em estudos experimentais de nocicepção pós-operatória já que é bastante similar a dor pós-cirúrgica e uma vez que as variáveis podem ser melhor controladas em modelos experimentais animais. (Brennan *et al.*, 1996; Pogatzki e Raja, 2003).

A resposta nociceptiva pode ser mensurada através do aumento da sensibilidade dolorosa a estímulos nocivos, hiperalgesia, ou a estímulos inócuos, alodínia. Estes fenômenos ocorrem devido à ação direta e/ou indireta de um conjunto de mediadores inflamatórios sendo que a hiperalgesia inflamatória é resultante do aumento da excitabilidade (sensibilização) das fibras aferentes primárias nocivas enquanto a alodínia resulta da interpretação do estímulo mecânico como nocivo pelas fibras A β , de baixo limiar mecânico. Sabe-se que administração oral de antiinflamatórios não-esteroidais reduz a hiperalgesia e a alodínia mecânica induzida pela incisão plantar em ratos (Whiteside *et al.*, 2004) e que neste modelo, o perfil farmacológico de diferentes analgésicos parece ser muito similar ao encontrado na clínica.

A administração da Tx3-4 reverteu a alodínia mecânica decorrente da incisão, com perfil farmacológico semelhante ao do teste da formalina, apesar de ter sido 10 vezes mais potente. Sua eficácia foi superior à da ω -ctx-MVIIC, e do MK801, o que corrobora para a atividade em diferentes alvos. A ω -ctx-MVIIC, por sua vez, apresentou pico de ação aos 15 minutos e esta perdurou até 1 hora e baseando-se em estudos prévios (Stocker *et al.*, 1997) seria difícil associar essa atividade a afinidade por CCSVs do tipo-N em estados ativadas. A partir dos resultados obtidos no modelo de nocicepção optamos por usar o MK801 como novo controle e este apresentou perfil farmacológico semelhante a Tx3-4. Estes achados foram um tanto quanto surpreendentes, uma vez que o próprio autor do modelo de nocicepção pós-cirúrgica constatou através de estudos em ratos, que o receptor NMDA não contribuiria para manutenção das respostas nociceptivas desenvolvidas (Zahn *et al.*, 1998).

Chamamos atenção para o fato de que este estudo foi realizado com camundongos e muitas das fontes consultadas utilizaram outras espécies além de roedores tanto “in vivo” quanto “in vitro”. A potência terapêutica e a toxicidade

podem variar entre as diferentes espécies e sabe-se que os efeitos adversos de vários fármacos são verificados de maneira mais precisa em cães do que em roedores (Greaves *et al.*, 2004). Outro ponto a ser ressaltado é que toxinas como a Ph α 1 β e a Tx3-4 poderão, no futuro, ser ferramentas úteis no combate a dores refratárias à morfina assim como a ω -ctx-MVIA (Ziconotida), que já é utilizada no tratamento da dor associada ao câncer e ao vírus da SIDA, sendo 1000 vezes mais potente que a morfina além de não causar tolerância nem dependência associada aos opióides (Hogg, 2006).

6. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados apresentados pode-se concluir que:

-A toxina Tx3-4 não apresenta efeito antinociceptivo no teste de nocicepção térmica transitória, placa quente;

-A toxina Tx3-4 produziu efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química persistente, nocicepção espontânea induzida por NMDA e nocicepção incisional;

- A toxina não altera a coordenação ou atividade locomotora de camundongos nas doses testadas.

7. PERSPECTIVAS

Para melhor elucidar os mecanismos da atividade antinociceptiva e da toxicidade apresentada pela Tx3-4 faz-se necessário a realização de mais experimentos com os seguintes objetivos:

- Avaliar a atividade da ω -ctx-MVIIC no modelo de nocicepção induzida pelo NMDA;
- Verificar a possível afinidade da toxina pelo receptor NMDA através de experimento de “binding”;
- Avaliar efeito antinociceptivo da toxina em outros modelos clinicamente relevantes (dor relacionada à neuropatia e ao câncer);
- Realizar marcação fluorescente das moléculas de Tx3-4 e verificar sua possível difusão pelo líquido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altier C, Zamponi GW (2004). Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci.* **25**:465-469.

Andre E, Ferreira J, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB (2004). Evidence for the involvement of vanilloid in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol in rats. *Neuropharmacol.* **46**:590-597.

Araújo DAM, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirão OS (1993). Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **347**:205-208.

Baron R (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol.* **2**:95-106.

Basbaum AI, Jessel TM (2003). A Percepção da Dor. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Princípios da neurociência.* 4ª ed. São Paulo: Manole, p. 473-491.

Battaglia G, Rustioni (1988). The coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. *J Comp Neurol.* **277**:302-312.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2002). *Neurociência- desvendando o sistema nervoso.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed.

Berkley K J (1999). Sex differences in pain. *Behav Brain Sci* **20**: 371-380.

Besson JM (1999). The neurobiology of pain. *Lancet.* **353**:1610-1615.

Bester H, Chapman V, Besson JM (2000). Physiological properties of the lamina I spinobrachial neurons in the rat. *J Neurophysiol.* **83**:2239-2259.

Bevan S, Geppetti P (1994). Protons: small stimulants of capsaicin-sensory nerves. *Trends Neurosci.* **17**:504-512.

Björkman R (1995). Central antinociceptive effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. *Acta Anesthesiol Scand.* **39 (supplement 103)**:1-44.

Bleakman D, Alta A, Nisebaum ES (2006). Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol.* **17(5)**:592-604.

Bonica JJ (1990). Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: Bonica K, Loeser JD, Chapman CR, Fordyce WE. *The management of pain.* 2nd ed. Philadelphia-London: Lea Forbiger.

Brennan F, Carr DB, Cousins M (2007). Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg.* **105**:205-221.

Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM (2005). Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiology Clin N Am.* **23**:1-20

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart G (1996). Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* **64**: 491-493.

Budde T, Meuth S, Pape HC (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 873-883.

Calixto JB, Cabrine DA, Ferreira J, Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**:1-5.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2001). Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anesthesiol.* **14**:519-526.

Cashman JN (1996). The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs* **52**:13-23.

Cassola AC, Jaffe H, Fales HM, Castro Afeche S, Magnoli F, Cipolla-Neto J (1998). Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch.* **436**:545-552.

Catterall WA, Reyes-Perez E, Snutch TP, Striessnig J (2005). International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**:411-25.

Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:521-555.

Chapman CR, Gavrin J (1999). Suffering: the contributions of persistent pain. *Lancet.* **353**: 2233-2237.

Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET (1995). Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guard behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **185**:5-8.

Costa SK, Moreno RA, Esquisatto LC, Juliano L, Brain SD, De Nucci, Antunes E (2002). Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neurosci. Lett.* **318**:158-162.

Cotran C, Kumar T, Robbins A (1994). Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p. 35-71.

Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* **72**:359-371.

De Souza FR, Figuera MR, Lima TTF, Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE, Oliveira MR, Bonacorso HG, Flores AE, Mello CF (2001). 3-Methyl 5 hidroxy-5-trichloromethyl-1*H*- pyrazolcarboxyamide (MPCA) índices antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.* **68**:525-530.

Dickenson A H (1995). Central acute pain mechanisms. *Ann. Med.* **27**:223-227.

Diaz A, Dickenson AH (1997). Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain.* **69**:93-100.

Diniz CR, Cordeiro MN, Junior LR, Kelly P, Fischer S, Reimann F, Oliveira EB, Richardson M (1990). The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxic Tx1 from the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *FESB Lett.* **263**:251-253.

Dirig DM, Konin GP, Isackson PC, Yaksh TL (1997). Effect of cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test an in vitro prostaglandin E2 release. *Eur J Pharmacol.* **331**:155-160.

Dixon WJ (1982). Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**:441-462.

Dixon WJ (1965). The up-and-down method for small samples. J Amer Stat Assoc. **60**:967-978.

Dos Santos RG, Van Renterghem C, Martin-Moutot N, Mansuelle P, Cordeiro MN, Diniz CR, Mori Y, De Lima ME, Seagar M (2002). Phoneutria nigriventer omega-phonetoxin II A blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. J. Biol. Chem. **277**:13856-13862.

Dubner R, Bennett GJ (1983). Spinal mechanisms of nociception. Ann Rev Neurosci. **6**:11-43.

Eickstedt VRD (1983). Considerações sobre a sistemática das espécies amazônicas de Phoneutria (Araneae, Ctenidae). Brasil Zoologia **1**:183-191.

Faucett JA, Levine J (1991). The contributions of interpersonal conflict to chronic pain in the presence or absence of organic pathology. Pain **44**: 35-43.

Ferreira SH, Lorenzetti BB (1994). Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. Neuropharmacol. **33(11)**:1478-1485.

Ferreira SH, Nakamura M, De Abreu Castro MS, (1978). The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. Prostaglandins **16**: 31-37.

Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM (2006). Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M. (eds). Walls, Melzack . Textbook of pain. 5^a ed. Edinburg: Churchill Livingstone, **cap** 125-142.

Finnerup, NB, Jensen, TS (2004). Spinal cord injury pain- Mechanisms and treatment. Eur. J. Neurol. **11**:73-82.

Fukamoto N, Obama Y, Kitamura N, Niimi K, Takahashi E, Itakura C, Shibuya I (2009). Hypoalgesic behaviors of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channel mutant mouse, rolling mouse Nagoya. *Neuroscience* **160**:155-173

Ganong W (1998). The stress response: a dynamic overview. *Hosp. Prac.* **23**:155-190.

Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA (2002). *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**:579-588.

Greaves P, Williams A, Eve M (2004). First dose of potential new medicines to humans: How animals help. *Nat Rev Drug Discov.* **3**:227-236.

Grishin E (1999). Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur. J. Biochem.* **264**: 276-280.

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

Guieu R, Peragut JC, Roussel P, Hassani H, Sampieri F, Bechis G, Gola R, Rochat H (1996). Adenosine and neuropathic pain. *Pain.* **68**:271-274.

Halley JE, Sullivan AF, Dickenson AH (1990). Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* **518**:218-226.

Hall JE, Guyton AC (2006). Tratado de fisiologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Hama A, Sagen J (2009). Antinociceptive effects of the marine snail peptides conantokin-G and conotoxin-MVIIA alone and in combination in rat models of pain. *Neuropharmacol.* **56**:556-563.

Hamada F, Noutsuka H, Hamada Y, Godo H (2001). Comparison of the spinal anti-nociceptive effects of ES-242-1 e MK801, two different NMDA antagonists, in rat. *Neurosc Res.* **40**:61-66.

Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S (2001). Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha (1B) subunit of N-type $Ca^{(2+)}$ channels. *Neuroreport.* **12**:2423-2427.

Henry D, Lim LLY (1996). Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *Br. Med. J.* **312**:1563-1566.

Herlitz S, Xie M, Han J, Hümer A, Melnik-Martinez KV, Monero R, Maerk MD (2003). Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca^{2+} channels. *J. Bionerg. Biomembr.* **35**: 621-637.

Hill RG (2001). Molecular basis for the perception of pain. *Trends Neurosci.* **7**:282-292.

Hogg RC (2006). Novel approaches to pain relief using venom-derived peptides. *Curr. Med. Chem.* **13**:3191-3201.

Holden JE, Pizzi JA (2003). The challenge of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**: 935-948.

Holz IV GG, Dunlap K, Kream RM (1988). Characterization of the electrically evoked release of substance P from the dorsal root ganglion neurons: methods and dihydropyridine sensitivity. *J. Neurosci.* **8**:463-471.

Hoskin PJ, Hanks GW (1991). Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs* **41**:326-344.

Hunskar S, Hole K (1987). The formalin test: association between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30**:103-114.

Hylden JL, Wilcox GL (1980). Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol.* **67**: 313-316.

Ji RR, Stritchartz G (2004). Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Science* **252**:1-19.

Ji RR, Woolf CJ (2001). Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neuron: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurol. Dis.* **8**:1-10.

Jones SI (1992). Anatomy of pain. In: Sinatra RS, Hord AH, Ginsberg B, Preble L. *Acute Pain: Mechanisms & Management*. St. Louis: Mosby-Year Book.

Julius D, Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**:203-210.

Junior CJ, Pinheiro AC, Guatimosim C, Cordeiro MN, Souza HA, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, Gomez MV (2008). Tx3-4 a toxin from the venom

of the spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. *Neurosci. Lett.* **439**:170-172.

Kalapothski E, Penaforte CL, Beirão PSL, Romano-Silva MA, Cruz JS, Prado MAM, Guimarães PEM, Gomez MV, Prado VF (1998). Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon.* **36**:1843-1850.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2003). *Princípios da Neurociência*. 4ª ed. São Paulo: Manole.

Kato A, Ohkubo T, Kitamura K (2002). Algogen-specific pain processing in mouse spinal cord: differential involvement of voltage-dependent Ca²⁺ channels in synaptic transmission. *B J Pharmacol.* **135**:1336-1342.

Khasar SG, McCarter G, Levine JD (1999) Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and *in vitro* sensitization of rat nociceptors. *J. Neurophysiol.* **81**:1104-1112.

King ET, Barr GA (2007). Spinal cord ionotropic glutamate receptors function in formalin-induced nociception in preweaning rats. *Psychopharmacol.* **192**:489-498.

Kirchstein T, Büselberg D, Treede RD (1997). Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **231**:33-36.

Kuraishi Y, Hirota N, Sota Y (1985). Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. *Br. Res.* **359**: 177-182.

Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirão PSL, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MAM (1999). *Phoneutria nigriventer* toxin tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. J Neurochem. **72**:1472-1481.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001). Animal models of nociception. Pharmacol. **53**:597-652.

Lichtman AH (1998). The up-and-down method substantially reduces the number of animals required to determine antinociceptive ED₅₀ values. J Pharmacol Toxicol Methods. **40**:81-85.

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI (1994). Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **91**:8383-8387.

Loeser JD, Melzack R (1999). Pain: An Overview. Lancet **353**:1607-1609.

Lucas S (1988). Spiders in Brazil. Toxicon **26**:759-772.

MacFarlane BV, Wright A, O'Callagan J, Benson HA (1997). Chronic neuropathic pain and its control by drugs. Pharmacol. Ther. **75**:1-19.

MacMahon SB, Caferty WB, Marchand F (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. Exp. Neurol. **192**:444-462.

Maggi CA, Tramontana M, Cecconi R, Santicoli P (1990). Neurochemical evidence for the involvement of the N-type calcium channels in transmitter secretion from peripheral endings of sensory nerves in guinea pigs. Neurosci. Lett. **114**: 203-206.

Malmberg A, Gilbert H, McCabe RT, Basbaum AI (2003). Powerful antinociceptive effects of cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptors antagonists conantokin G and T. *Pain* **101**:109-116.

Malmberg A, Basbaum AI (1998). Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and correlates. *Pain* **76**: 215-222.

Malmberg A, Yaksh TL (1994). Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neurosci.* **14**:4882-4890.

Martin WR, Sloan JW (1977). Neuropharmacology and neurochemistry of subjective effects, analgesy, tolerance and dependence produced by narcotic analgesics. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag.

Matavel A, Cruz JS, Penaforte CL, Araújo DA, Kalapothakis E, Prado VF, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirão OS (2002). Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin Phtx2-6. *FEBS Lett.* **523**: 219-223.

Matthews EA, Dickenson AH (2001). Effects of ethosuximide, a T-type Ca⁽²⁺⁾ channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **415**:141-149.

McDonough SI, Boland LM, Mintz IM, Bean BP (2002). Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J Gen Physiol.* **119**:313-328.

McGlone F, Reilly D (2009). The cutaneous sensory system. *Neurosci Biobehav Rev.* **Aug 25**

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (2007). TRPA1 mediate formalin-induced pain. *Proc Nat Acad Sci USA*. **104(33)**:13525-13530.

McQueen, DS (1983). Opioid peptide interactions with the respiratory and the circulatory systems. *Br Med Bull*. **39**:77-82.

Mendell JR, Sahenk Z (2003). Painful sensory neuropathy. *N Engl J Med*. **348**: 1243-1255.

Merskey H, Bogduk N (1994). Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: IASP Press.

Meyer RA, Campbell JN, Raja SN (2006). Peripheral Mechanisms of Pain. In: Wall PD, Melzak R. Textbook of pain. 5th ed Edinburg: Churchill Livingstone. p.1-34.

Miljanich GP, Ramachandran J (1995). Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **35**:707-34.

Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. **66**: 3474-3555.

Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. **57**:1-164.

Millan MJ (1986). Multiple opioid systems and pain: a review. *Pain* **26**:303-349.

Ministério da Saúde (2001). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2^a ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. **ISBN** 8573460148.

Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Dinis CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, Prado MAM, Gomez MV (1998). *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. *Neuroreport*. **9**:1371-1373.

Mogil JS, Adhikari SM(1999). Hot and cold nociception are genetically correlated. *J Neurosci*. **19**:21-25.

Moura JR, Prado MA, Gomez MV, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA (1998). Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* o the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. *Toxicon*. **36**:1189-1192.

Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-no K, Sasano H, Tadano T, IijimaT (2004). Antinociceptive effects of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel $\alpha 1$ subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Br Res*. **1024**:122-129

Nakamura M, Ferreira SH (1987). A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*. **135**:145-156.

Nestler EJ (1993). Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Crit Rev Neurobiol*. **7**:23-39.

Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates Gigas*. *Biochemistry*. **44**:15353-15362.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**:440-443.

Oliveira BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem.* **63**:823:867.

Penn RD, Paice JA (2000). Adverse effects associated with the intrathecal administration of ziconotide. *Pain* **85**:291-296.

Pinheiro AC, da Silva AJ, Prado MA, Cordeiro MN, Richardson M, Batista MC, de Castro Junior CJ, Massensini AR, Guatimosim C, Romano-Silva MA, Kushmerick C, Gómez, MV (2009). Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus* **15**.

Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco LA, Gómez, MV (2006). Neuroprotective effect on injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int.* **49**:543-547.

Pogatzki EM, Raja SN (2003). A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* **99**:1023-1027.

Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* **25**:319-325.

Prado WA (2001). Involvement of calcium in pain and nociception. *Braz J Med Biol Res.* **34**:449-461.

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

Quintão NL, Balz D, Santos AR, Campos MM, Calixto JB (2006). Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumor necrosis factor alphas. *Neuropharmacol.* **50**:614-620.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2003). Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. In: *Farmacologia*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier p. 277-295.

Rapôso C, Zago GM, Silva GH, Höfling MAC (2007). Acute blood-brain barrier permeabilization in ratas after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Res.* **1149**: 18-29.

Reis HJ, Prado MAM, Kalapothakis E, Cordeiro MN, Diniz CR, De Marco LA, Gomez MV, Romano-Silva MA (1999). Inhibition of glutamate uptake by a polypeptide toxin (*Phoneutriatoxin 3-4*) from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J.* **343**:413-418.

Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R (1992). The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain.* **50**:331-344.

Romano-Silva MA, Ribeiro Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN e Brammer MJ (1993). Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using

the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochem J.* **296**:313-319.

Russo CM, Brose WG (1998). Chronic pain. *Annu Rev Med.* **49**: 123-333.

Santicioli P, Del Bianco E, Tramontana M, Geppetti P, Magi CA (1992). Release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity induced by electrical field stimulation from rat spinal afferents is mediated by conotoxin-sensitive calcium channels. *Neurosci Lett.* **136**:161-164.

Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* **11**:291-303.

Schaible RS (2009). Epidemiology and pathophysiology of pain-new targets for pain therapy. *Med Monatsschr Pharm.* **32**:164-71.

Schroeder JE, Fischbach PS, Zheng D, McCleskey EW (1991). Activation of μ -opioid receptors inhibits transient high and low-threshold Ca^{2+} currents, but spares a sustained current. *Neuron* **6**:13-20.

Scott RH, Dolphin AC, Bindokas VP, Adams ME (1990). Inhibition of neuronal Ca^{2+} channel currents by the funnel web spider toxin omega-Aga-IA. *Mol. Pharmacol.* **38**:711-718

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**:205-218

Sharp TJ (2001). Chronic pain: a reformulation of cognitive-behavioral model. *Behav Res Ther.* **39**:787-800.

Sherrington CS (1906). The integrative action of nervous system. Scribner, New York.

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammation response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* **18**:385-405.

Smith TW (1984). The mechanisms of pain and opioid-induced analgesia. *Mol Aspect Med.* **7**:509-545.

Snutch TP, Sutton KG, Zamponi GW (2001). Voltage-dependent calcium channels-beyond the dihydropyridine antagonists. *Curr Opin Pharmacol.* **1**:11-16.

Sorkin LS, Mcdoo DJ, Willis WD (1993). Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of aminonacids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Res.* **618**:95-108

Sotnikova TD, Budygin EA, Jones SR, Dykstra LA, Caron MG, Gainetdinov RR (2004). Dopamine transporter-dependent and -independent actions of trace amine beta-phenylethylamine. *J. Neurochem.* **91**:362-373.

Souza HA, Ferreira J, Cordeiro MN, Vieira LB, De Castro CJ, Trevisan G, Reis H, Souza IA, Richardson M, Prado MA, Prado VF, Gomez MV (2008). Analgesic effects in rodents of native end recombinant Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* **140**:115-126.

Stocker JW, Nadasdi J, Aldrich RW, Tsien RW (1997). Preferential interaction of ω -conotoxins with inactivated N-type Ca²⁺ channel. *J Neurosci.* **17(9)**:3002-3013.

Taiwo YO, Levine JD (1991). Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of AMP_c-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neurosci.* **44**:131-135.

Tjolsen A, Berge O, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**:5-17.

Tracey J, Mantyh PW (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* **55**: 377-91.

Traub, RJ (1997). The spinal contribution of the induction of the central sensitization. *Brain Res.* **778**: 34-42.

Tsuda M, Suzuki T, Misawa M, Nagasa H (1996). Involvement of opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *Eur J Pharmacol.* **307(1)**:7-14.

Urca G, Raigorodsky G (1988). Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol.* **153**:211-220

Vanegas H, Scheible (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev.* **46**:295-309.

Vieira LB, Kushmerick C, Reis HJ, Diniz CR, Cordeiro MN, Prado MA, Kalapothakis E, Romano-Silva MA, Gomez MV (2003). PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int.* **42**:277-282.

Wallace MS (2000). Calcium and sodium channel antagonists for the treatment of pain. *Cin. J Pain* **16(2 Suppl)**:S80-5.

Wang YX, Pettus M, Gao D, Phillips C, Bowersox SS (2000). Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Pain* **84**:151-158.

Wheeler DB, Sather WA, Randall A, Tsien RW (1994). Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in the central nerve system. *Adv. Second Messenger phosphoprotein Res.* **ISSN: 1040-7952**, 29:155-171.

Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S, Walker K (2004). Pharmacological characterization of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol.* **141**:85-91.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999). Neuropathic pain: etiology symptoms, mechanisms and management. *Pain* **353**:1959-1964.

Yajima Y, Narita M, Shimamura M, Narita M, Kubota C, Suzuki T (2003). Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. *Brain Res.* **992**:288-293.

Yaksh TL (1997). Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand.* **41**:94-111.

Yamamoto T, Yaksh TL (1992). Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology.* **77(4)**:757-763.

Zamponi GW, Snutch TP (1998). Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**:351-356.

Zahn PK, Umali E, Brennan TJ (1998). Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain*. **74**:213-223.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Tanabe T, Schwartz TL, Tsien RW (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**:1075-1088.

Zimmermann M (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. **429**:23-37.

