

**Alessandra Hübner de Souza**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA ESPINHAL DA TOXINA Ph $\alpha$ 1 $\beta$   
ISOLADA DO VENENO DA *Phoneutria nigriventer* EM ROEDORES**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular**

**BELO HORIZONTE**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Alessandra Hübner de Souza**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA ESPINHAL DA TOXINA Ph $\alpha$ 1 $\beta$   
ISOLADA DO VENENO DA *Phoneutria nigriventer* EM ROEDORES**

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Marcus Vinícius Gomez

Co-Orientador: Juliano Ferreira

**BELO HORIZONTE  
2008**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do ICB-UFMG com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Instituto do Milênio

*“Sedare Dolorum Opus Divinum Est”*

**Hipócrates (460-377 a.C)**

**Dedico essa tese**

**A minha família, principal incentivadora de meus estudos...**

**Aos meus pais Edson e Marlene  
e meus irmãos Adriana e Eduardo**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por reproduzir em cada um de nós sua manifestação criadora. Eu te amo!

Aos meus Pais, pelo apoio incondicional, amor, paciência, força, otimismo.

Aos meus irmãos, pela lição de amor e alegria diária.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcus Vinícius, pela oportunidade que me deu para o meu crescimento profissional, mas também pessoal, fundamentais para alcançar essa conquista. Sua maneira de conduzir a pesquisa faz com que todas as pessoas ao seu redor tornem-se apaixonadas pelo mundo científico! Obrigada por tudo!

Ao professor Juliano, que me auxiliou e demonstrou boa vontade, e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e discussões científicas !

Ao Professor Helton Reis, pela sua contribuição científica e pela amizade!

Ao Professor Marco Antônio Máximo Prado pela sua contribuição científica!

Ao meu grande amor, Fernando, pelo amor, cuidado, carinho e tranquilidade! Você chegou para que eu pudesse descobrir o que é ser amada de verdade...Eu te amo muito!!!!

À Julie pelo carinho de irmã e pela ajuda científica...

Ao Célio, pela amizade sincera, pelo carinho e pela ajuda científica...

As minhas colegas de apartamento, Renatinha e Camila, verdadeiras irmãs, agradeço pela alegria diária e paciência...

A Maira, minha amiga de laboratório, obrigada pela ajuda científica e interesse em ajudar-me.

Aos meus amigos queridos de laboratório, que me receberam tão bem, em especial ao grupo de neurofarmacologia, por valiosas discussões sobre os projetos: Fabi,

Bráulio Marcone, Monalise Costa Batista, Adriane Pereira, Nanci, Cristina Martins, Cristiane Menezes, Gabriela, Patrícia, Flávia .

A Danuza e Jomara pela amizade verdadeira.

As amigas do RS, Flávia, Sara, Carine, Mariane e Gerusa obrigada pela dedicação a esse trabalho e amizade.

Às minha colega da analgesia Juliana, pessoa que não mediu esforços para ajudar-me nos experimentos.

A minha amigona Luciene, à qual não tenho palavras para agradecer a amizade sincera, o companheirismo, a alegria e o convívio diário.

Aos animais utilizados nesse trabalho, meu respeito e gratidão.

Por fim, à UFMG e UFSM e às entidades financiadoras CNPq, FAPEMIG, CAPES e Instituto do Milênio, por propiciarem uma pós-graduação de tão elevado nível no Brasil.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dor e nocicepção	2
1.2. Classificação da dor	3
1.3. Mecanismos neurais da dor	5
1.4. Mediadores químicos na via nociceptiva	10
1.5. Dor inflamatória	12
1.6. Dor neuropática	14
1.7. Analgésicos	16
1.8. Canais de cálcio sensíveis à voltagem	18
1.9. Subunidades moleculares dos canais de cálcio	22
1.10. Canais de cálcio sensíveis à voltagem e nocicepção	22
1.11. <i>Phoneutria nigriventer</i>	25
1.12. Ação das toxinas purificadas do veneno da <i>Phoneutria nigriventer</i>	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Materiais	33
3.1.1. Drogas e Toxinas	33
3.1.2. Animais	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Administração intratecal (i.t)	34
3.2.2. Teste da placa quente	34
3.2.3. Teste da formalina	35
3.2.4. Dosagem de glutamato no líquor	35
3.2.5. Nocicepção Inflamatória Crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF)	36
3.2.6. Modelo de dor Incisional	37
3.2.7. Avaliação da alodínia mecânica através dos filamentos de Von Frey	38
3.2.8. Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático em camundongos	39
3.2.9. Avaliação dos efeitos adversos em ratos	40
3.2.10. Avaliação Neurológica	40
3.2.11. Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)	42
3.2.12. Teste do campo aberto	42
3.2.13. Força de agarre	43
3.2.14. Registro dos Efeitos da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$ sobre a Frequência Cardíaca (FC)	43
3.2.15. Registro dos Efeitos da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$ sobre a Pressão arterial média (PAM)	44
3.2.16. Preparação de sinaptossomas	44
3.2.17. Liberação de glutamato em sinaptossomas	45
3.2.18. Medida da concentração de cálcio intracelular [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	45

3.3. Análise estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Efeito antinociceptivo em modelo de dor térmica aguda em camundongos (placa quente)	49
4.2. Efeito antinociceptivo em modelo de dor química persistente em ratos (formalina)	53
4.3. Dosagem <i>ex- vivo</i> de glutamato no líquido de rato	61
4.4. Efeito antinociceptivo em modelo de dor crônica inflamatória em ratos (ACF)	64
4.5. Efeito antinociceptivo em dor incisional em camundongos	66
4.6. Efeito anti-alodínico em modelo de dor parcial neuropática em camundongos	70
4.7. Efeitos adversos em ratos	72
4.8. Avaliação Neurológica	74
4.9. Efeitos Adversos em camundongos	75
4.10. Efeito sobre a Frequência Cardíaca (FC) e Pressão Arterial Média (PAM) em ratos	77
4.11. Efeito das toxinas bloqueadoras de canal de cálcio na liberação de glutamato em sinaptossomas de rato induzida por capsaicina	80
4.12. Efeito das toxinas bloqueadoras de canal de cálcio na medida da concentração do cálcio intracelular em sinaptossomas de rato.	82
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
8. ANEXOS	129

## Lista de Abreviaturas

$\omega$ -CTx-MVIA	$\omega$ - Conotoxina-MVIA
ACF	Adjuvante completo de Freund
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CCSV	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EGTA	Etilenoglicol-bis- $\beta$ -aminoetil éster
EGTA-AM	Etilenoglicol- <i>bis</i> ( $\beta$ -aminoetil)-N,N,N',N'- tetraacetoximetil Éster
EN	Neurônios específicos
FaPs	Fibras aferentes primárias
FCE	Fluído cérebro espinhal
FURA -2AM	Fura-2-acetoximetiléster
HVA	Canais de cálcio ativado por alta voltagem
K <sup>+</sup>	Íons potássio
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
LVA	Canais de cálcio ativado por baixa voltagem
min	minutos
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
NMR	Núcleo magno da rafe
NO	Óxido nítrico

<i>P. nigriventer</i>	<i>Phoneutria nigriventer</i>
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAM	Pressão arterial média
RVM	Medula rostro medial
s	segundos
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
TRP	Receptor vanilóide

## Lista de Figuras

Figura I: Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônio sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC	6
Figura II: Mecanismo de transmissão e percepção da dor	9
Figura III: Aspectos estruturais dos canais de $Ca^{2+}$ regulados por voltagem	21
Figura IV: aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	26
Figura 1: Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina $Ph\alpha 1\beta$ , $\omega$ -conotoxina MVIIA ou da morfina em camundongos no teste da placa quente	50
Figura 2: Efeito antinociceptivo avaliado na curva-dose resposta na administração intratecal da toxina $Ph\alpha 1\beta$ ou $\omega$ -conotoxina MVIIA em camundongos no teste da placa quente	52
Figura 3: Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina em ratos	54
Figura 4: Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina $\omega$ -conotoxina MVIIA (100 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina em ratos	56
Figura 5: Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina $Ph\alpha 1\beta$ (30-200 pmol/sítio) ou $\omega$ -conotoxina MVIIA (10-200 pmol/sítio) no modelo de nocicepção de formalina 3 horas antes de sua administração na pata de ratos	58
Figura 6: Efeito antinociceptivo do tratamento i.t $Ph\alpha 1\beta$ (10-200 pmol/sítio) ou $\omega$ -conotoxina MVIIA (10-200 pmol/sítio) 9 minutos após a injeção intraplantar de formalina em ratos	60
Figura 7: Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina nativa ou recombinante toxina $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/sítio) no modelo de nocicepção de formalina 3 horas antes de sua administração na pata de ratos	61
Figura 8: Efeito da injeção intratecal de $ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/sítio) e $\omega$ -conotoxina MVIIA (100 pmol/sítio) antes da administração de formalina na pata e de $Ph\alpha 1\beta$ (200 pmol/sítio) após o quadro nociceptivo já instalado nos níveis de glutamato do líquido de ratos.	63

Figura 9: Efeito do tratamento intratecal Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200 pmol/sítio) e $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) 48 horas após a injeção intraplantar de ACF	65
Figura 10: Efeito da administração prévia de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (100 e 200 pmol/sítio), veículo ou morfina (1000 pmol/sítio) 1-24h após a cirurgia na pata do animais	67
Figura 11: Efeito da administração prévia de $\omega$ -conotoxina MVIIA (1 e 10 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5 $\mu$ L/ sítio) 1-6h após a cirurgia na pata do animais	68
Figura 12: Efeito antialodínico do tratamento intratecal (i.t) de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (100 e 200 pmol/sítio), veículo (PBS, 5 $\mu$ L/sítio) ou morfina (1000 pmol/sítio) após a cirurgia na pata do animais	69
Figura 13: Efeito antialodínico do tratamento intratecal(i.t) de $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio), veículo (PBS, 5 $\mu$ L/sítio) após a cirurgia na pata do animais	70
Figura 14: Efeito intratecal da administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (30 pmol/sítio) na alodínia mecânica induzida por lesão parcial no nervo ciático em camundongos	71
Figura 15. Efeitos adversos causados pela administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200-1000 pmol/sítio) ou $\omega$ -CTx-MVIIA (3-600 pmol/sítio) em ratos	73
Figura 16: Efeitos adversos na avaliação neurológica causados pela administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200 pmol/sítio), $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) e morfina (433 pmol/sítio) em ratos	74
Figura 17: Efeito de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200 pmol/sítio) ou $\omega$ -conotoxina MVIIA (10 pmol/sítio) na avaliação no teste de locomoção forçada em cilindro giratório, campo aberto e força de agarre em camundongos	76
Figura 18: Efeito produzido pela injeção intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200 pmol/sítio), $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) na avaliação da frequência cardíaca em ratos	78
Figura 19: Efeito produzido pela injeção intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (200 pmol/sítio), $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) na avaliação da pressão arterial em ratos	79
Figura 20: Efeito bloqueador da liberação de glutamato em sinaptossomas de medula de ratos por Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (1,25-7,5 $\mu$ M) e $\omega$ -conotoxina MVIIA (1,25-7,5 $\mu$ M) antes da despolarização com capsaicina	81
Figura 21: Efeito da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ (1,25-5,0 $\mu$ M, A) ou da $\omega$ -conotoxina MVIIA (1,25-5,0 $\mu$ M, B) no aumento da [Ca <sup>++</sup> ] <sub>i</sub> induzido por capsaicina em sinaptossomas de medula espinhal de ratos	83

## RESUMO

O influxo de cálcio através de canais de cálcio regulados por voltagem (CCSVs) medeia a informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. A administração intratecal dos bloqueadores de CCSVs, tais como a  $\omega$ -conotoxina-MVIIA ( $\omega$ -CTx-MVIIA), tem efeito analgésico, mas estreita janela terapêutica, apresentando muitos efeitos adversos. O veneno da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer* contém uma variedade de substâncias com ação predominantemente neurotóxica, dentre elas a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  que foi recentemente descrita como uma potente bloqueadora da neurotransmissão por interagir com canais de cálcio sensíveis a voltagem tipo N. Neste estudo, verificamos o potencial analgésico da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , administrada por via intratecal, em modelos de dor aguda e persistente em roedores. A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  produziu antinocicepção prolongada e com grande eficácia no modelo da placa quente em camundongos, quando comparada com a  $\omega$ -CTx-MVIIA. Além disso, a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ou a  $\omega$ -CTx-MVIIA não produziram efeitos adversos motores em camundongos. Quando avaliadas em ratos, a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  foi mais efetiva e potente do que a  $\omega$ -CTx-MVIIA não somente em prevenir a nocicepção induzida pela formalina, todavia especialmente em reverter a nocicepção inflamatória persistente, previamente instalada. Além do mais, a ação analgésica de ambas as toxinas foi relacionada com a inibição da liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos evocados por cálcio na medula espinhal, como o glutamato. Quando os efeitos adversos foram avaliados em ratos, verificamos que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  teve um índice terapêutico maior que a  $\omega$ -CTx-MVIIA. Porém, ambas as toxinas foram capazes de produzir alterações na pressão arterial. Entretanto, o tratamento com a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  é capaz de reduzir a nocicepção aguda induzida por incisão cirúrgica ou crônica

causada por artrite ou por lesão do nervo ciático em roedores. Por fim a toxina recombinante Ph $\alpha$ 1 $\beta$  expressa em *Escherichia coli* mostrou uma atividade antinociceptiva similar à toxina nativa. Assim, o presente estudo demonstrou que a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  apresentou efeitos analgésicos em diferentes modelos de dor, sugerindo que esta toxina pode ter potencial para ser usado como uma droga para o controle da dor persistente.

## ABSTRACT

Calcium influx through voltage sensitive calcium channels (VSCCs) plays an important role on the nociceptive transmission in the dorsal horn of the spinal cord. The intrathecal administration of VSCCs blockers, such as  $\omega$ -conotoxin-MVIIA ( $\omega$ -CTx-MVIIA) has analgesic effect, but it narrows the therapeutic window, presenting many adverse effects. The Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* venom contains a variety of substances with predominantly neurotoxic action, among them the Ph $\alpha$ 1 $\beta$  which was recently described as a potent neurotransmission blocker for interacting with N-type voltage sensitive calcium channels. In this study, we verify the analgesic potential of Ph $\alpha$ 1 $\beta$  by its intrathecal administration in acute and persistent pain models in rodents. The Ph $\alpha$ 1 $\beta$  produced a prolonged antinociception and with great effectiveness in the hot plate model in mice when compared to  $\omega$ -CTx-MVIIA. However, Ph $\alpha$ 1 $\beta$  or  $\omega$ -CTx-MVIIA did not produce adverse motor effects in mice. Ph $\alpha$ 1 $\beta$  was more effective and powerful than  $\omega$ -CTx-MVIIA when assessed in rats, not only in preventing the nociception induced by formalin, but particularly in reversing the persistent inflammatory nociception previously installed. Furthermore, the analgesic action of both toxins was related to inhibition of pro-nociceptive neurotransmitter release evoked by calcium in the spinal cord, such as glutamate. When the adverse effects were evaluated in rats, we verified that Ph $\alpha$ 1 $\beta$  had a therapeutic index higher than  $\omega$ -CTx-MVIIA. However, both toxins were able to produce blood pressure alterations. In addition, the treatment with Ph $\alpha$ 1 $\beta$  toxin is able to reduce the acute nociception induced by surgical incision, or chronic, caused by arthritis or by sciatic nerve injury in rodents. Finally, the recombinant Ph $\alpha$ 1 $\beta$  toxin

expressed in *Escherichia coli* showed an antinociceptive activity similar to native toxin. Thus, the present study demonstrated that Ph $\alpha$ 1 $\beta$  toxin presented analgesic effects in different models of pain, suggesting that this toxin may have a potential to be used as a drug for the control of the persistent pain.



## 1.1. DOR E NOCICEPÇÃO

Dor é uma experiência complexa, difícil de ser definida, descrita ou interpretada. 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).

A dor é extensivamente influenciada por ansiedade, depressão, expectativa e outras variáveis psicológicas. É uma experiência multifacetada, um entrelaçamento das características físicas dos estímulos com as funções motivacionais, afetivas e cognitivas do indivíduo. A dor desempenha um papel de alerta, comunicando ao indivíduo que algo está errado, podendo gerar estresse acentuado e incapacidade física. É, sem sombra de dúvida, a maior causa de afastamento do trabalho, gerando um enorme ônus para diferentes nações (Bruno, 2001).

As sensações dolorosas induzem respostas urgentes para seu alívio provocando nos animais comportamentos como massagear ou lambe a área lesada. A dor manifesta-se com intensidade diferente entre os indivíduos, variando de acordo com o sexo, idade e estado de humor (Faucett e Levine, 1991; Ganong, 1988; Berkley, 1999; Chapman e Gavrin, 1999; Sharp, 2001).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isso é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção de estímulos. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. No entanto, clínica e experimentalmente se faz necessária a distinção entre a dor percebida e a resposta

ao dano tecidual ou nocicepção (Kandel *et al.*, 2003). Assim, o termo nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (Fürst, 1999).

Os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, ou seja, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (Jones, 1992).

## **1.2.CLASSIFICAÇÃO DA DOR**

A dor pode ser considerada como um sintoma ou manifestação de uma doença ou afecção orgânica, mas também pode vir a constituir um quadro clínico mais complexo. Existem muitas maneiras de se classificar a dor. Considerando a duração da sua manifestação, ela pode se apresentar nas formas transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual e contribui para proteger o organismo de potenciais danos físicos, causados pelo ambiente ou por estresse de tecidos corporais. Contudo, a dor aguda é uma resposta causada por uma lesão de tecido com conseqüente ativação dos nociceptores, no local da lesão, caracterizando-se por ser de curta duração, desaparecendo, até mesmo, antes da cura do dano tecidual. Além disso, a dor aguda é geralmente de fácil identificação e tratamento, possuindo também caráter protetor (Loeser e Melsack, 1999; Brennan *et al.*, 2007). Já a dor crônica é causada por uma lesão tecidual ou doença e geralmente ultrapassa o tempo de

recuperação do organismo, ou seja, esse tipo de dor pode não desaparecer mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido. A dor crônica se estende por meses ou anos. É de difícil identificação, sendo uma patologia que geralmente necessita de tratamento complexo (Brennan *et al.*, 2007; Tracey e Mantyh, 2007). Não é apenas a duração que distingue a dor aguda da dor crônica, mas também a capacidade do organismo de reparar o sítio da lesão e restaurar os disparos aferentes e o processamento central normal (Loeser, 2000). Pode-se destacar ainda alterações adaptativas como a neuroplasticidade, em vários níveis do sistema nervoso, tais como sensibilização, desinibição dos neurônios inibitórios do corno dorsal, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal e alterações na facilitação e inibição descendente da dor. Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e da duração do estímulo, quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna o tratamento do quadro patológico (Besson, 1999; Woolf e Salter, 2000; Zimmermann, 2001).

Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor: 1) a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; 2) a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal, na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”); 3) a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e 4) a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (Millan, 1999).

Muitas evidências sugerem que a hiperexcitabilidade e mudanças em descargas dos aferentes nociceptivos primários levam a alodínia, hiperalgesia ou dor espontânea devido ao aumento da atividade de uma variedade de canais iônicos (Hains *et al.*, 2003). Sendo que a hiperalgesia é a resposta aumentada a um

estímulo doloroso, enquanto a alodínia é a dor resultante de estímulo que é normalmente não nocivo (Millan, 1999).

### **1.3. MECANISMOS NEURAIS DA DOR**

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais desde a pele, vísceras e outros tecidos até o córtex cerebral. Um nervo periférico consiste em axônios de três diferentes tipos de neurônios: sensoriais primários, motores e pós-ganglionares simpáticos. As terminações livres de fibras aferentes primárias sensíveis a estímulos nocivos são chamados de nociceptores (ou receptores da dor) (Millan, 1999).

A sensibilização dos nociceptores se deve a diferentes estímulos, tais como mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão tecidual (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico) (Julius e Basbaum, 2001). Esses estímulos nocivos ativam fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A $\delta$ . Além dessas, outro tipo de fibra que pode estar envolvida na transmissão do estímulo sensorial são as fibras do tipo A $\beta$ , que normalmente respondem a estímulos inócuos, aplicados à pele, que em condições especiais são capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (30-100 m/s). As fibras A $\beta$  são mielinizadas e de grande diâmetro. Já as fibras do tipo A $\delta$ , de condução intermediária (12 a 30 m/s), são pouco mielinizadas, enquanto que as fibras do tipo C são não-mielinizadas e transmitem o estímulo nociceptivo de forma mais lenta (0,5 a 2,0m/s) (Figura I) (Julius e Basbaum, 2001).

Em grande parte do organismo as fibras aferentes primárias C e A $\delta$  transmitem a informação nociceptiva da periferia até o corno dorsal da medula espinhal e suas terminações encontram-se principalmente nas lâminas I (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). No corno dorsal da medula espinhal neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que formam as vias ascendentes. Conseqüentemente, esses neurônios recebem seus sinais sensoriais pela liberação de glutamato e SP (substância P) dos neurônios aferentes primários. Este processo excitatório envolve canais de cálcio, sendo os principais reguladores da liberação de neurotransmissores (Hill, 2001).

Tipos de fibras	A $\alpha$ e A $\beta$	A $\delta$ (I e II)	C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 $\mu$ m	2-6 $\mu$ m	0,4-1,2 $\mu$ m
Velocidade de condução	30-100 m/s	1,2-30 m/s	0,5-2 m/s
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

**Figura I:** Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônio sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC (Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001).

Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo,

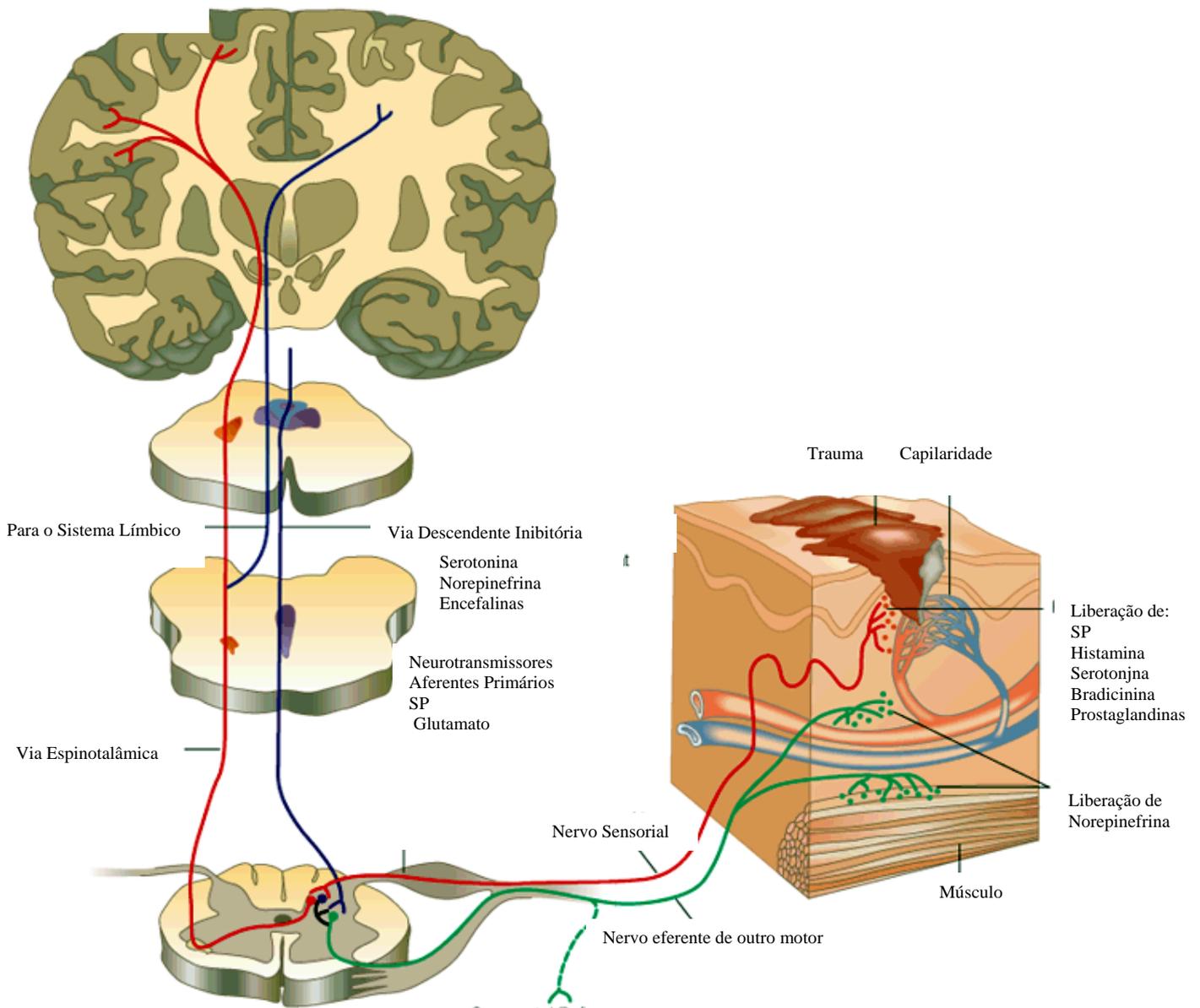
neurônios de terceira ordem emitem axônios, através da cápsula interna do córtex somatosensor, ocorrendo a somatização do estímulo nocivo e/ou emitindo axônios ao giro cingulado anterior, responsável pelo componente emocional da dor (Russo e Brose, 1998).

O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção, sendo que o tálamo é um dos responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva. Já o córtex é responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por identificar, de forma pouco fiel, de onde provém (Guyton, 1992).

Além dessa modulação ascendente, existe uma modulação descendente da nocicepção (Figura II). 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). Por exemplo, na RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (*on*) e as células “desliga” (*off*), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva. É proposto que as células “liga” (*on*) mediem a facilitação da condução de estímulos nociceptivos quando ativadas, e as células “desliga” (*off*) mediem a inibição da transmissão nociceptiva,

provocada pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG). De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve excitar as células *off* e inibir as células *on* na medula rostroventromedial (Fields *et al.*, 2006). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, as alterações da neuroplasticidade podem resultar em uma estimulação facilitatória sustentada, o que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (Porreca *et al.*, 2002).

Além da modulação descendente da informação nociceptiva envolver uma série de estruturas cerebrais, conforme mencionado anteriormente, os sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos nesta conexão. Todos os neurotransmissores, envolvidos na inibição descendente (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina), parecem inibir a excitação de neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (Fields, 2006).



**Figura II-** Mecanismo de transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e fibras descendentes (cor azul).

Fonte: <http://www.coventrypainclinic.org.uk/aboutpain-painmechanisms.htm>

#### 1.4. MEDIADORES QUÍMICOS NA VIA NOCICEPTIVA

A atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias algogênicas liberadas e/ou sintetizadas em elevada concentração, no ambiente tecidual, na decorrência de processos inflamatórios (Cotran *et al.*, 1994). Substâncias endógenas, como prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado e estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor (Björkman, 1995).

Existem várias fontes importantes de mediadores químicos que participam da resposta dolorosa, entre os quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células do sistema imunológico, nervos simpáticos e sensoriais, entre outros. Dessa forma, há liberação local de diversos mediadores químicos celulares, resultantes de lesão tecidual capazes de desencadear uma reação inflamatória local, atraindo macrófagos e linfócitos. Essas células liberam mediadores inflamatórios como: cininas (bradicina e calidina); produtos das células imunes (citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral); aminas (serotonina, histamina) e prostanóides. Desse modo, a lesão celular e a reação inflamatória advindas de tal lesão, expõe as fibras aferentes primárias a um grande número de substâncias capazes de estimular o nociceptor. O aferente primário transmite o impulso nociceptivo a neurônios específicos para a nocicepção (EN) ou a neurônios que também transmitem outras sensações no corno dorsal da medula (Millan, 1999; Calixto *et al.*, 2001).

A transferência sináptica de informação nociceptiva é comandada pela liberação de neurotransmissores como glutamato, presente em todos os tipos de aferentes primários. O glutamato é um aminoácido excitatório, podendo ser encontrado em concentrações na faixa de  $\mu\text{M}$  na medula espinhal, originado de fibras aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas, em adição a interneurônios intrínsecos e projeção de neurônios (Battaglia e Rustioni, 1988). O glutamato e alguns neuropeptídeos são liberados juntos de terminais aferentes primários e têm ações fisiológicas distintas nos neurônios pós-sinápticos, atuando coordenadamente para regular as propriedades desses neurônios (Kandel *et al.*, 2003).

As ações de aminoácidos excitatórios são mediadas principalmente por receptores ionotrópicos NMDA e não-NMDA. Os receptores não-NMDA consistem de dois receptores, AMPA e cainato (Dickenson, 1995). A transmissão de fibras C, depois de estímulos agudos mecânicos ou térmicos, parece envolver receptores AMPA para produzir excitações curtas e constantes. Os estímulos são mantidos e/ou sua frequência é aumentada pela liberação de transmissores que contribuem para a transmissão nociceptiva quando o receptor NMDA é ativado, aumentando resposta de hiperalgesia (Dickenson, 1995). Uma ação excitatória direta, do tipo retroalimentação positiva, do glutamato, nas fibras aferentes primárias, seria consistente com a evidência de que a ativação dos receptores NMDA causa a liberação de substância P e CGRP por seus terminais centrais (Liu *et al.*, 1994). Essa ação do 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).

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 $\delta$  (Besson, 1999). Portanto, o mecanismo pelo qual provocam essa analgesia descendente envolve a liberação de opióides na medula espinhal. Provavelmente, o mecanismo produtor dessa analgesia é proveniente do bloqueio de canais de Ca<sup>2+</sup>. Como o aumento da concentração do Ca<sup>2+</sup> intracelular é um dos mecanismos de liberação do neurotransmissor glutamato, o bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup> resultaria em inibição pré-sináptica (Kuraishi *et al.*, 1985). É 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.

## **1.5. DOR INFLAMATÓRIA**

Numa lesão tecidual, como um trauma mecânico ou invasão por agentes infecciosos, o organismo aciona mecanismos cujo propósito é limitar o dano e regenerá-lo. Esses mecanismos fazem parte da resposta inflamatória, caracterizada por quatro sinais: rubor, calor, dor e tumor; e em alguns casos pode acometer o membro com perda da função. 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 apresenta duração (horas a dias) e muitos mediadores como o NO e prostaglandinas promovem principalmente a vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Outro sinal precoce da inflamação aguda é a formação do

edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido, rico em proteínas (plasma) dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

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

Tanto a liberação de mediadores primários, quanto à síntese de novos mediadores são responsáveis pela ativação e/ou sensibilização de nociceptores adjacentes à lesão. A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que esses disparem com estímulos de menor intensidade (Khasar *et al.*, 1999; Holden e Pizzi, 2003). Dessa forma, esses nociceptores são ativados por estímulos, que em condições normais, seriam inócuos (Finnerup e Jensen, 2004; Millan, 1999). Isso é bem evidenciado, através de modelos experimentais, cuja a injeção de um agente pró-inflamatório como o Adjuvante Completo de Freund (ACF) sensibiliza os locais injetados, tornando esses animais responsivos a estímulos térmicos e mecânicos inócuos a um animal não injetado. De fato, a dor é uma característica peculiar da inflamação e a dor inflamatória é o maior problema clínico em vários distúrbios inflamatórios, como, por exemplo, a artrite reumatóide (MacMahon *et al.*, 2005).

Portanto, nessa situação, encontra-se um quadro de estimulação constante dos nociceptores, que é responsável por alterações plásticas, não somente no tecido nervoso periférico, mas também em nível central isso é muito comum em casos de neuropatia periférica, cuja lesão nervosa gera um processo inflamatório crônico, com alterações plásticas no SNP e SNC (MacFarlane *et al.*, 1997; Ji e Strichartz, 2004). De fato, do ponto de vista clínico, um dos aspectos mais problemáticos da dor de origem inflamatória é a possibilidade da progressão de um estado agudo para um estado prolongado, podendo, dessa forma, aumentar a susceptibilidade de instalação de um quadro de dor inflamatória crônica (Woolf e Mannion, 1999; Mendell e Sahenk, 2003). Nessas condições, a inflamação perde sua característica de proteção ao organismo e torna-se uma patologia. A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido ao seu envolvimento em doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doença neurodegenerativas, cardiovasculares e reumáticas (MacMhon *et al.*, 2005).

## **1.6. DOR NEUROPÁTICA**

A dor neuropática foi definida em 1994 pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso”.

A etiologia da dor neuropática é heterogênea e pode ser ocasionada por um insulto primário ao sistema nervoso periférico ou central (Zimmermann, 2001). As neuropatias originam-se quando ocorre uma lesão nos nervos ou nas demais

estruturas que transmitem a sensação dolorosa e podem resultar de trauma mecânico, lesão nervosa (amputação ou compressão), efeitos tóxicos de drogas, doenças como diabetes ou síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) (Mendell e Sahenk, 2003). A lesão de nervos periféricos é frequentemente acompanhada de inflamação local transitória, contribuindo para o início da sensação de dor. Nesse sentido, assim como na dor inflamatória, na dor neuropática também estão envolvidos múltiplos mediadores inflamatórios (Ji e Strichartz, 2004). Corroborando com isso, estudos mostram que a extensão da hiperalgesia está diretamente relacionada com a extensão da resposta inflamatória ao sítio da lesão do nervo (Clatworthy *et al.*, 1995). Além disso, drogas antiinflamatórias aliviam a hiperalgesia em modelos animais de lesão do nervo (Clatworthy *et al.*, 1995).

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

A excitabilidade aumentada ocorre em função de estimulação repetitiva sobre as fibras não mielinizadas do tipo C, resultando em prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Esse fenômeno, conhecido como “Wind up” significa aumento progressivo no número de potenciais de ação por estímulo e ocorre em neurônios do corno dorsal. Esses episódios repetitivos podem levar à potenciação a longo prazo (“long-term potentiation”, LTP), que envolve o aumento prolongado na

transmissão sináptica. Ambos “Wind up” e LTP fazem parte do processo de sensibilização, envolvido na maioria dos estados de dor crônica (Pocket, 1995). Por ser um evento crônico, a principal característica dessa patologia são mudanças plásticas, causadas por alterações na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores, mediadores de sinalização extracelular entre outros (Woolf e Mannion, 1999; Quintão *et al.*, 2006).

Por conseguinte, os mecanismos patofisiológicos da dor neuropática refletem, em grande parte, aqueles ocorridos na inflamação, embora alguns autores relatem que a lesão de nervo produz, em neurônios aferentes primários, alterações neuroquímicas, ligeiramente distintas daquelas produzidas na inflamação (Woolf e Mannion, 1999; Yajima *et al.*, 2003).

## **1.7. ANALGÉSICOS**

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides, que abolem diretamente a transmissão nociceptiva, no sistema nervoso central, pela ligação em receptores opióides (Hoskin e Hanks, 1991), e antiinflamatórios, que previnem a sensibilização de receptores periféricos da dor inibindo a ciclooxigenase (Cashman, 1996).

Analgésicos opióides, como a morfina e a codeína, são indicadas no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondem a analgésicos menos potentes. Embora os opióides sejam muito efetivos, sua utilização é limitada pelo

fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória e tolerância (Hoskin e Hanks, 1991).

Analgésicos não-opioides, como os antiinflamatórios convencionais (indometacina, paracetamol, AAS entre outros), são indicados para dores agudas, porém sua toxicidade renal e gastrointestinal, podem resultar em grande morbidade, limitando seu uso para o tratamento da dor (Henry *et al.*, 1996).

Estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e anatômicos têm contribuído para o descobrimento de múltiplos mediadores químicos envolvidos na dor, o que facilita o entendimento dos mecanismos de ação dos neurotransmissores e das drogas envolvidas, na modulação central e periférica da dor (Levine e Taiwo, 1994; Millan, 1999). Muito esforço tem sido dedicado, buscando compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na origem da dor, com o objetivo de encontrar drogas eficazes, com baixos efeitos colaterais e que possam ser empregadas nessas circunstâncias. De fato, atualmente, não existe tratamento satisfatório e nem medidas adequadas e específicas para o controle da dor (Kingery, 1997; Mendell & Sahenk, 2003).

Recentemente vem crescendo o interesse pelo esclarecimento da possível participação de canais de cálcio na dor neuropática. Bloqueadores de Canais de cálcio sensíveis à voltagem, como a ziconotida, podem causar analgesia em pacientes com dor crônica refratária aos analgésicos convencionais.

## 1.8. CANAIS DE $\text{Ca}^{2+}$ SENSÍVEIS À VOLTAGEM

Os canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSV) foram primeiro identificados em músculo de crustáceo por Paul Fatt e Bernard Katz (1953). Não só em células neuronais, mas em diferentes tipos celulares, canais de cálcio quando ativados medeiam o influxo de cálcio durante potenciais de ação ou após despolarizações de membranas. O cálcio que entra nas células, através de canais de cálcio regulados por voltagem, serve de segundo mensageiro na sinalização elétrica e na iniciação de eventos intracelulares como contração, secreção, transmissão sináptica e expressão gênica. Além do envolvimento em eventos fisiológicos, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  também estão envolvidos em numerosas doenças, tais como, epilepsia, hipertensão e alguns tipos de arritmias ( Snutch *et al.*, 2001).

Existem grande número de canais de cálcio no sistema nervoso. Quanto a sua nomenclatura, há usualmente, três diferentes classificações para esses canais: classificação por voltagem, classificação farmacológica e classificação molecular.

Originalmente, assumia-se que existia somente um tipo de canal de cálcio. Entretanto, o trabalho pioneiro de Hagiwara *et al.* (1975), avaliando correntes de cálcio em ovócitos de estrelas-do-mar, mostrou a existência de mais de um tipo de canal. Subseqüentemente, demonstrou-se que essa distinção também era observada em muitas outras células de diferentes organismos. As diferentes correntes têm diferentes limiares de ativação, logo, canais ativados por baixa voltagem (do inglês LVA) são aqueles em que a ativação se dá em potenciais ligeiramente acima do potencial de repouso. Os canais ativados por alta voltagem (do inglês HVA) são aqueles nos quais o limiar de ativação é substancialmente acima do potencial de

repouso (ultrapassa 0 mV). Além da voltagem de ativação, diferentes canais de cálcio também são distinguidos pelas propriedades de ativação e de inativação.

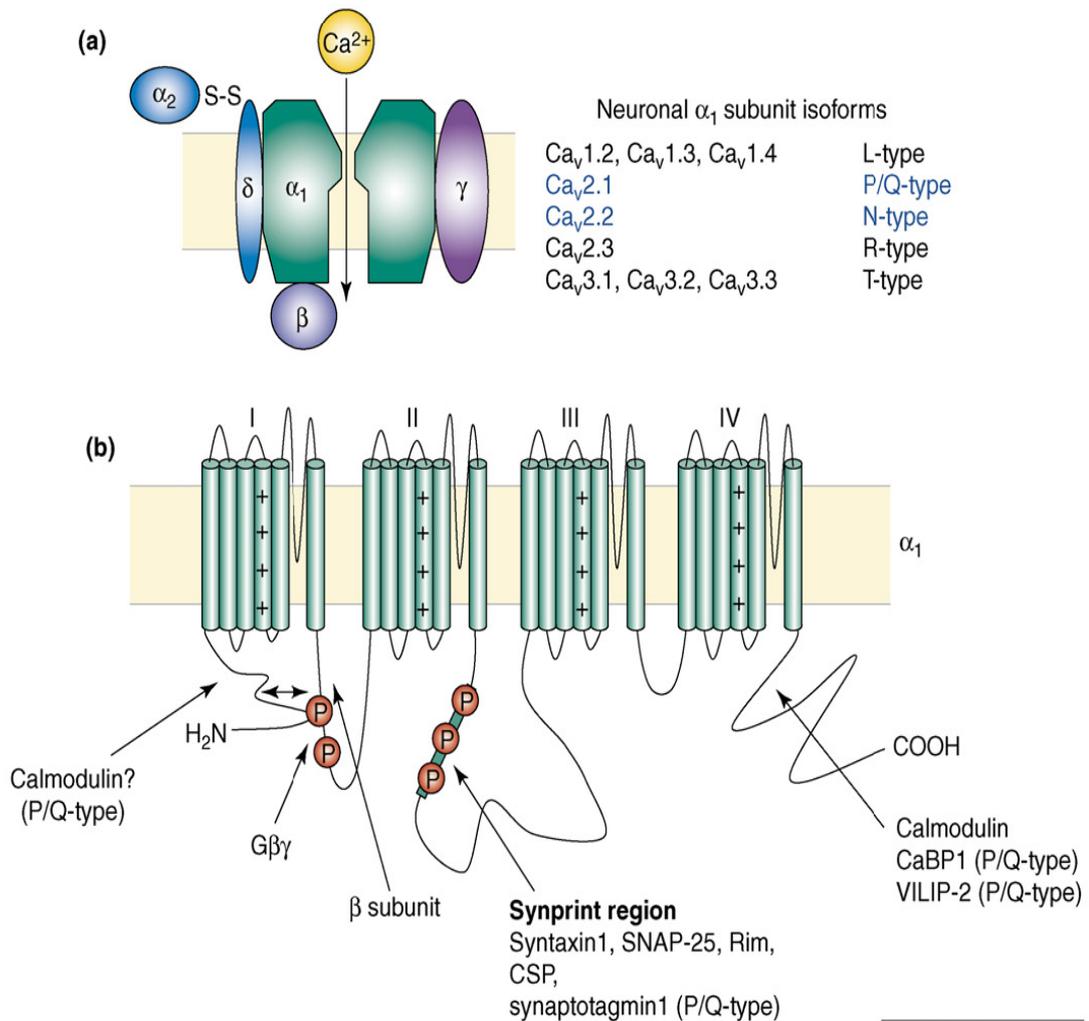
Pensando-se inicialmente na existência de somente dois tipos de canais de cálcio (HVA e LVA), começou-se, então, uma busca de agentes farmacológicos específicos para esses canais. Foi encontrada uma família de substâncias, as dihidropiridinas (DHP), que bloqueiam canais de cálcio HVA, porém não canais LVA (Bean, 1985). Ao se analisar correntes de cálcio em Gânglios da raiz dorsal (DRGs) de pintos, foi observado que as dihidropiridinas não afetam a atividade de todos os canais de cálcio HVA (Nowycky *et al.*, 1985). Portanto, baseado na sensibilidade às DHP's, os canais HVA foram em seguida subdivididos em canais DHP-sensíveis (canais de cálcio Tipo-L) e canais DHP-insensíveis (canais de cálcio Tipo-N). Os canais de cálcio LVA foram denominados Tipo-T (T de transiente) (Nowycky *et al.*, 1985).

Um tipo adicional de canal de cálcio HVA, originalmente encontrado em células cerebelares de Purkinge, é o canal de cálcio Tipo-P, que é inibido pela toxina peptídica  $\omega$ -agatoxina-IVA (Scott *et al.*, 1990). Quando canais de cálcio, expressos em oócitos, foram testados quanto a sua sensibilidade à  $\omega$ -agatoxina IVA, verificou-se que esses canais têm uma baixa sensibilidade a essa toxina (~200 nM) (Sather *et al.*, 1993), enquanto que a sensibilidade a canais Tipo-P é bem maior (~2 nM). Isso levou à conclusão de que havia ainda um outro tipo de canal de cálcio HVA: o canal de cálcio Tipo-Q (Zhang *et al.*, 1993). A distinção entre canais de cálcio Tipo-P e Tipo-Q nem sempre é óbvia. Assim, eles são frequentemente agrupados como canais de cálcio Tipo-P/Q.

Se os tipos T, L, N e P/Q compreendessem todos os canais dependentes de voltagem que permitem a entrada de cálcio, no terminal, após despolarização, seria

possível abolir, por modo completo a entrada de cálcio, causada por uma despolarização pequena e prolongada (para inativar correntes de cálcio Tipo-T) e na presença de um “coquetel” contendo concentrações inibitórias de DHP,  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -agatoxina IVA. Isso nem sempre acontece e alguma atividade residual de canais de cálcio permanece. Foi então proposto que essa entrada residual de cálcio fosse atribuída a canais de cálcio denominados Tipo-R. Sua voltagem de ativação é intermediária entre os canais HVA e LVA e sua atividade é bloqueada por baixas concentrações de níquel (*Zhang et al.*, 1993).

Atualmente já foram identificados nove subtipos de canais de cálcio dependentes de voltagem (figura III). Essa diversidade emana, predominantemente, da natureza da subunidade  $\alpha_1$  formadora do poro principal. Há três diferentes famílias de subunidades  $\alpha_1$  dos canais de cálcio: 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 Tipo-P e Tipo-Q, surgindo como um rearranjo alternativo do gene  $Ca_v2.1$  (Catterall, 2000).



**Figura III:** Aspectos estruturais dos canais de  $Ca^{2+}$  regulados por voltagem. **(a)** composição das subunidades dos canais de  $Ca^{2+}$ . **(b)** Topologia transmembrana da subunidade  $\alpha_1$ . Sítios chave de interação protéica são indicados por setas. Os círculos vermelhos representam sítios importantes de fosforilação e os símbolos de adição denotam os sensores de voltagem nos domínios transmembrana. Subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G podem interagir com um macro-sítio formado pela ligação do N-terminal ao *loop* do domínio I-II. Esta figura enfatiza a estrutura dos canais  $Ca_v2.1$  e  $Ca_v2.2$  destacados de azul no texto de (a). (retirado de Evans e Zamponi, 2006).

## 1.9. SUBUNIDADES MOLECULARES DOS CANAIS DE CÁLCIO

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são membros de uma superfamília de canais catiônicos sensíveis à voltagem. Eles são proteínas complexas compostas por 4 ou 5 diferentes subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2\text{-}\delta$  e  $\gamma$ ; ver figura 3). A subunidade  $\alpha_1$  é a maior das subunidades com peso molecular de 190-250 kDa (revisado por Herlitze *et al.*, 2003). Ela incorpora o poro condutor, o sensor de voltagem, o aparato de *gating* e os sítios de regulação do canal por segundos mensageiros, drogas e toxinas. A subunidade  $\alpha_1$  é estruturalmente organizada em 4 domínios homólogos (domínio I a IV), cada um contendo 6 segmentos transmembrana (S1-S6). O segmento S4 serve como sensor de voltagem (figura III) A alça do poro entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio determina a condutância iônica e a seletividade. Assim, mudanças em 3 aminoácidos na alça do poro entre os domínios I, III e IV convertem um canal seletivo a sódio para um canal seletivo a cálcio (Herlitze *et al.*, 2003).

As subunidades acessórias ou auxiliares não formam poros, mas são capazes de modificar várias propriedades do canal formado pela subunidade  $\alpha_1$ .

## 1.10. CANAIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS À VOLTAGEM (CCSV) E NOCICEPÇÃO

A regulação da liberação de neurotransmissores é a base que rege o desenvolvimento de agentes terapêuticos seguros e eficazes, direcionados contra subtipos específicos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem. A liberação de neurotransmissores no SNC depende de múltiplos subtipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e a

complementaridade de ação desses canais varia de uma população de sinapses para a outra (Wheeler *et al.*, 1994).

A diversidade de genes que codificam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  gera diferentes subtipos de canais com diferentes funções fisiológicas. Isso sugere a possibilidade de uso de antagonistas subtipo-específicos para esses canais, como novos agentes no tratamento para algumas neuropatologias (Miljanich e Ramachandran, 1995). De fato, ações neuroprotetoras e analgésicas de bloqueadores de canais Tipo-N fortalecem essa hipótese. Essas propriedades levaram a estudos clínicos em humanos, avaliando o efeito desses agentes na prevenção da degeneração neuronal, oriúnda de traumas cerebrais isquêmicos e na persistência da dor.

Íons cálcio estão envolvidos na regulação de diferentes processos biológicos como a excitabilidade das membranas, nocicepção e antinocicepção (Zamponi e Snutch, 1998). Como o controle dos níveis intracelulares desse íon pode ser mediado e regulado pelos canais de cálcio, substâncias que modulam a ação destes canais têm sido investigadas no estudo da nocicepção e antinocicepção. Os canais de cálcio do tipo L e N estão diretamente implicados na liberação de neurotransmissores e de neuromoduladores nos neurônios sensoriais da medula espinhal. O bloqueio dos canais de cálcio sensíveis à voltagem 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. Porém, a ausência de antagonistas seletivos para os diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  torna difícil o entendimento de suas ações nos processos de dor crônica (Matthews e Dickenson, 2001). Os canais do tipo N estão presentes no terminal pré-sináptico de neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal, regulando, dessa forma a liberação de

neurotransmissores pró-nociceptivos como o glutamato e a substância P (Wen *et al.*, 2005).

Experimentos realizados com antagonistas de CCVS indicam que os canais dos tipos L, N, P/Q e T estão envolvidos na nocicepção (Prado, 2001). Atualmente, vem crescendo o interesse pelo esclarecimento da possível participação dos canais de cálcio nos processos de dor crônica.

Os CCSV são encontrados em terminais pré-sinápticos, nos quais permitem o influxo de cálcio necessário para a liberação de neurotransmissores de fibras nervosas centrais e periféricas após uma despolarização (Olivera *et al.*, 1994; Miljanich e Ramachandran, 1995). Canais de cálcio tipo N, na medula espinhal, têm um importante papel na modulação da liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos, tais como glutamato e neuropeptídeos. Pesquisas realizadas na última década têm estudado consideravelmente o papel de inibidores de canal de cálcio tipo N para o desenvolvimento de drogas analgésicas novas (Altier e Zamponi, 2004). Foi demonstrado que bloqueadores de CCSV tipo N, como as  $\omega$ -conotoxinas MVIIA e GVIA, podem prevenir e atenuar a dor. Uma  $\omega$ -conotoxina, a  $\omega$ -conotoxina-MVIIA ( $\omega$ -Ctx-MVIIA), obtida do *Conus Magnus*, inibidora seletiva de CCSV tipo N, foi a primeira molécula derivada de toxina a ser aprovada pelo FDA para o tratamento de dor crônica intratável. Prialt<sup>®</sup> é o nome comercial da  $\omega$ -Ctx-MVIIA (também conhecida como ziconotida e SNX-111) e teve seu uso clínico aprovado em Dezembro de 2004, nos Estados Unidos e em Fevereiro de 2005, na Europa (Hogg, 2006). A ziconotida produz antinocicepção em modelos de dor aguda e crônica em animais, quando administrada por via intratecal (i.t) (Malmberg e Yaksh, 1994; Malmberg e Yaksh, 1995). Entretanto, a administração i.t de ziconotida causa

vários efeitos adversos (Penn e Paice, 2000). Devido a isso, há a necessidade de investigar outros inibidores de CCSV para o tratamento da dor com menores efeitos adversos.

### **1.11. *Phoneutria nigriventer***

A aranha *Phoneutria nigriventer* tem ocorrência desde o sul do Rio de Janeiro até o Uruguai. É a aranha mais comumente envolvida em envenenamento humano no Brasil (Eickstedt, 1983; Lucas, 1988). É muito agressiva e é conhecida como aranha armadeira pela posição que toma ao se sentir ameaçada, possuindo hábitos noturnos e permanecendo refugiada durante o dia (figura IV). A aranha *Phoneutria nigriventer* não constrói teia e seu sucesso como predadora pode ser explicado pela potência das diversas toxinas presentes em seu veneno (Gomez *et al.*, 2002). Picadas da aranha *P. nigriventer* podem causar severa dor e muitos sintomas tóxicos, tais como câimbras, tremores, convulsão tônica, paralisia espástica, priapismo, arritmias, distúrbios visuais e sudorese (Lucas, 1988). Esses sintomas são mais severos em crianças e idosos e a intoxicação pode levar a morte se não devidamente tratada.

Baseados nos sintomas observados em humanos e nos resultados de injeções intracérebro-ventriculares em animais experimentais, observou-se que o veneno de *Phoneutria* é, sobretudo, neurotóxico. Parte do efeito neurotóxico do veneno parece estar relacionado a sua ação sobre canais de Na<sup>+</sup> regulados por voltagem (Araujo *et al.*, 1993; Romano-Silva *et al.*, 1993). Entretanto, outras atividades farmacológicas, relacionadas à ação em canais iônicos, podem ser

encontradas em todo o veneno. Essa observação pode ser mais facilmente comprovada pelo fracionamento do veneno, em que há separação das frações com ações farmacológicas distintas.



**Figura IV:** aranha *Phoneutria nigriventer*

#### **1.12. AÇÃO DAS TOXINAS PURIFICADAS DO VENENO DA PHONEUTRIA NIGRIVENTER**

As toxinas obtidas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* têm sido extensivamente investigadas e cerca de 17 peptídeos, com atividade tóxica, já foram descritos na literatura (revisado por Gomez *et al.*, 2002). Os peptídeos, extraídos do

veneno de *P. nigriventer*, foram investigados por diferentes autores. As toxinas são basicamente polipeptídeos, com peso molecular entre 3500 e 9000 Da. Vários dos seus polipeptídios tóxicos interagem com canais iônicos. Assim, algumas classes de toxinas podem afetar o funcionamento de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), dentre outros (Grishin, 1999). Existe interesse na caracterização bioquímica e farmacológica de neurotoxinas do veneno dessa aranha como possível ferramenta de investigação das funções dos canais iônicos em níveis moleculares e celulares (Diniz *et al.*, 1990; Araújo *et al.*, 1993; Romano-Silva *et al.*, 1993; Cassola *et al.*, 1998). Além disso, investiga-se o veneno de *P. nigriventer* por sua habilidade em alterar um grande número de sistemas fisiológicos, em particular aos relacionados à dor à inflamação (Costa *et al.*, 2002).

Um dos efeitos principais do veneno de *P. nigriventer* é a sua ação sobre os diferentes subtipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Trabalhos publicados descrevem a ação de algumas toxinas de *P. nigriventer* na inibição das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cassola *et al.*, 1998) ou no bloqueio do influxo desse íon em terminais nervosos (Prado *et al.*, 1996; Guatimosim *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1998). Seis diferentes toxinas (Tx3-1 a 6) foram purificadas, a partir da fração PhTx3 (Cordeiro *et al.*, 1993) e pelo menos 3 delas (Tx3-3, Tx3-4 e Tx3-6) bloquearam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por KCl em terminais nervosos (Prado *et al.*, 1996; Guatimosim *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 1998, Vieira *et al.*, 2003), sugerindo que essas toxinas bloqueiam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e são, portanto, novas  $\omega$ -conotoxinas. Além de ter toxinas que interagem com canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , uma das toxinas da *Phoneutria*, a toxina PhTx3-1 é uma bloqueadora potente e seletiva de canais de  $\text{K}^+$  Tipo-A, aumentando a frequência de oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  em células GH3 (Kushmerick *et al.*, 1999). Outra toxina, a toxina PhTx3-2, é

capaz de bloquear, ainda que parcialmente, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo-L (Kalapothakis *et al.*, 1998).

Das toxinas bloqueadoras de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , isoladas do *pool* PhTx3, a toxina PhTx3-3 foi uma das primeiras a ser estudada. Dados farmacológicos iniciais sugeriram que essa toxina inibe a liberação de acetilcolina em fatias de córtex e em neurônios do plexo gástrico. Porém, essa ação não possuía um efeito aditivo com a  $\omega$ -agatoxina IVA na liberação de ACh (Gomez *et al.*, 1995). Além disso, a PhTx3-3 é bloqueadora eficaz da liberação de glutamato (Prado *et al.*, 1996). Através do uso dos marcadores fluorescentes Fura2-AM e FM1-43 em sinaptosomas córtex-corticais, para monitorar medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  interno e de liberação de vesículas, respectivamente, foi observado que a PhTx3-3 inibe com alta potência ( $\text{IC}_{50}$  0,9nM) canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que regulam a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  em sinaptosomas e também bloqueia a exocitose de vesículas sinápticas, sendo que esse efeito se dá em canais de  $\text{Ca}^{2+}$  que também são inibidos pela  $\omega$ -agatoxina IVA (Guatimosim *et al.*, 1997).

Análises de mais dados demonstraram que a PhTx3.4 bloqueia canais de cálcio subtipo N (Cassola *et al.*, 1998; Dos Santos *et al.*, 2002) e P/Q (Dos Santos *et al.*, 2002). Essa toxina parece ligar-se em vários sítios de ligação, sendo parcialmente deslocada pelas  $\omega$ -conotoxinas GVIA e/ou MVIIC (Dos Santos *et al.*, 2002). A toxina PhTx3-4 possui um intrigante mecanismo de ação, uma vez que essa toxina também diminui a liberação do glutamato, dependente e independente de  $\text{Ca}^{2+}$  em terminações nervosas de ratos (Reis *et al.*, 1999) e inibem certas condições neuropatológicas como na isquemia *in vitro*. Os resultados (Pinheiro *et al.*, 2006) apontam para novas toxinas eficazes, no controle da degeneração neuronal, após isquemia vinda de diversos estímulos tóxicos. Também foi investigado a interação entre a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (PhTx3-6) e os vários canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , determinando

a potência, seletividade e o possível mecanismo de ação da toxina, estudado em sistemas heterólogos que expressavam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  recombinantes.

A  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  inibe de maneira reversível as correntes de cálcio subtipo L-, N-, P/Q- e R- em ordem de potência  $\text{N} > \text{R} > \text{P/Q} > \text{L}$  e valores de  $\text{IC}_{50} = 122\text{nM}$ ;  $136\text{nM}$ ;  $263\text{ nM}$  e  $607\text{ nM}$ , respectivamente. Parece atuar como uma  $\omega$ -conotoxina (Vieira *et al*, 2005). Como é demonstrado que os bloqueadores do subtipo N têm utilidade farmacológica no tratamento da dor, supõe-se que a toxina  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  possa ter um potencial analgésico.



## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a ação antinociceptiva espinhal da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em roedores, utilizando modelos de dor aguda e crônica.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar o efeito da administração intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  sobre a nocicepção aguda térmica em camundongos;
- 2) Avaliar o efeito da administração intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  sobre a nocicepção química persistente em ratos;
- 3) Investigar alguns efeitos adversos produzidos pela administração intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em ratos e camundongos.
- 4) Verificar a atividade antinociceptiva da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  na nocicepção inflamatória aguda e crônica e na nocicepção neuropática crônica em roedores.
- 5) Estudar alguns dos mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ ;
- 6) Comparar o efeito antinociceptivo da toxina nativa com a toxina recombinante



### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. Drogas e Toxinas**

Fura-2 acetoximetil éster (AM), sacarose, SDS, EGTA, GDH, NADP<sup>+</sup> e capsaicina foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (Mo, USA). A  $\omega$ -conotoxina MVIIA foi adquirida da Latoxan (Valence, França) e sulfato de morfina (Cristália, São Paulo, Brazil). A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  foi purificada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  recombinante foi sintetizada no laboratório da Dra. Vânia Prado, Departamento de Bioquímica, UFMG. Detalhes da sua obtenção estão descritas no trabalho Souza *et al.*, 2008.

#### **3.1.2. Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss (30-40 g) e ratos Wistar (180-250 g) adultos, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, Universidade Federal de Minas Gerais e da Fundação Oswaldo Cruz, com livre acesso à água e comida e mantidos em ciclo 12 h luz/escuro com temperatura ambiente constante em 22  $\pm$  1°C. Os experimentos foram realizados em acordo com o guia para o cuidado de animais de laboratório em experimentos de investigações (Zimmermann,1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Administração Intratecal (i.t)**

As injeções i.t foram realizadas de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980) para camundongos e Mestre et al. (1994) para ratos. Um volume de 5  $\mu$ L para camundongos e 10  $\mu$ L para ratos 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 foi indicada comportamentalmente por um rápido movimento da cauda.

## **TESTES COMPORTAMENTAIS**

### **3.2.2. Teste da Placa Quente**

Esse teste teve como finalidade avaliar a dor aguda, causada por um estímulo térmico. O ensaio foi realizado conforme descrito por Ankier (1974). Camundongos receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio),  $\omega$ -Ctx-MVIA (10 pmol/sítio), morfina (1000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio). O teste da placa quente (modelo Socrel DS-37) foi realizado de 0,5 a 48 horas após a administração, a uma temperatura de 55  $\pm$

0,1 °C. A resposta nociceptiva foi avaliada pela latência (s) que os animais levaram para lamber as patas ou saltar da placa quente, estabelecendo-se um teto de 45 segundos para evitar lesão tecidual.

### **3.2.3. Teste da Formalina**

Esse teste foi realizado conforme procedimentos descritos por Dubuisson e Dennis (1977) e modificado por (Andre *et al.*, 2004) para investigação da dor neurogênica e inflamatória. Para avaliar se a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  previne o aparecimento da nocicepção, ratos receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (67 e 200 pmol/sítio),  $\omega$ -conotoxina MVIIA (100 pmol/sítio), morfina (13000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 10 $\mu$ L/sítio) 10 minutos, 1, 3, 6 ou 24 horas antes da injeção de formalina 2,5% na pata traseira direita (20 $\mu$ L, s.c.). Para verificar se a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  pode reverter um processo nociceptivo já instalado, grupos de animais receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (10-200 pmol/sítio),  $\omega$ -conotoxina MVIIA (10-200 pmol/sítio), morfina (13000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 10  $\mu$ L/sítio) 5 minutos após a injeção de formalina. Foi registrado o tempo de lambida da pata injetada ou sua retirada do chão, sendo esses 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. Dosagem de Glutamato no Líquor**

Para verificar se o efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  estaria relacionado com a redução na liberação de glutamato, ratos receberam por via intratecal Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200

pmol/sítio) ou veículo (PBS, 10  $\mu$ L/sítio) 3 horas antes da administração de formalina (60  $\mu$ L, s.c) ou PBS (60  $\mu$ L, s.c) na pata. Após 15 minutos de injeção de formalina o animal foi sacrificado com halotano e em seguida retirou-se o líquido com punção na cisterna magna. Para avaliar se a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  é capaz de bloquear a liberação de glutamato após o estímulo nociceptivo já instalado, administrou-se primeiramente 60  $\mu$ L de formalina subcutaneamente na pata do animal, 9 minutos após injetou-se Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 10  $\mu$ L/sítio), aguardou-se 10 minutos e em seguida o animal foi sacrificado com halotano e puncionado seu líquido. Os níveis de glutamato foram dosados enzimaticamente a partir do aumento da fluorescência devido à produção de NADPH na presença de glutamato desidrogenase e NADP<sup>+</sup> (Nicholls *et al.*, 1987). Para começar o ensaio NADP<sup>+</sup> (1.0mM) e glutamato desidrogenase (50 U) foram adicionados a amostras de ACF, após 10 minutos a emissão da fluorescência foi medida. Iniciou-se a leitura com a excitação ajustada num comprimento de onda de 360 nm e a emissão em 450 nM usando um espectrofluorímetro SHIMADZU RF-5301 PC.

### **3.2.5. Nocicepção Inflamatória Crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF)**

Este teste teve como finalidade investigar o efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  na nocicepção inflamatória crônica. O ensaio foi realizado conforme Bortalanza e colaboradores (2002) e adaptado para ratos. Os animais receberam na superfície plantar da pata direita ACF (150  $\mu$ L). Quarenta e oito horas após, foi avaliada a alodínia mecânica (sintoma doloroso em que um estímulo inócua passa a produzir

dor em presença de sensibilização de nociceptores) por filamentos de von Frey (2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 g), sendo este teste avaliado por up-down. Após a seleção dos animais com alodínia presente, administraram-se por via intratecal Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 10  $\mu$ L/sítio). O efeito antinociceptivo foi verificado 0,5 a 24 horas após a administração intratecal.

### 3.2.6. Modelo de Dor Incisional

Este teste teve como finalidade investigar o efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  no modelo de dor pós-cirúrgica induzida por incisão na pata. O procedimento foi realizado conforme descrito por Brennan *et al.* (1996). 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 por filamentos (0,05 g; 10 aplicações de 5 segundos). Para verificar se a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  pode prevenir o aparecimento da nocicepção, camundongos receberam por via intratecal Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (100 e 200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio), morfina (1000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio) 30 minutos antes da incisão na pata. Para avaliar se a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  pode reverter um processo nociceptivo já instalado, verificado pela presença de alodínia mecânica, grupos de animais receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (100 e 200 pmol),  $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio), morfina (1000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio) 1 hora após a incisa. O efeito antinociceptivo foi verificado 1, 2, 3 e 24 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 neuropatia, utilizando os filamentos de Von Frey (Dixon, 1980). Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico sobre uma tela de metal e aclimatizados 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 0,4g, e em ratos com 15g. Caso a tensão-resposta fosse nociva, utilizava-se um filamento com menor valor em (g) subsequente. Porém, se a tensão-resposta fosse inócua, testava-se o filamento com maior valor subsequente 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 a 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 logaritmo do último filamento utilizado na série de seis aplicações dos filamento do Von Frey.

K = constante baseada na tabela. Média das diferenças da força dos filamentos em log para camundongos 0,44 e ratos 0,185.

### **3.2.8. Alodínia mecânica induzida por lesão parcial do nervo ciático em camundongos**

Os camundongos foram anestesiados pela administração de xilasina e cetamina (10 ml/Kg, i.p.). A seguir, foi feita uma pequena incisão na região da coxa, na musculatura entre o íliaco e o músculo glúteo, sendo exposto e dissecado o nervo ciático próximo à trifurcação ciática, das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos por Seltzer *et al.* (1990), e adaptada para camundongos por Malmberg e Basbaum (1998). Com uma agulha de fio cirúrgico 8-0, o nervo ciático foi ligado em volta de aproximadamente 1/3 a 1/2 da porção dorsal e amarrado. Em um grupo de animais “falso operados”, o nervo foi exposto, mas não amarrado. Após 7 dias, diferentes grupos de animais operados receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio). O grupo “falso operado” recebeu Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio).

Após 1 hora foi realizado o experimento. O efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  foi verificado nos tempos 1 a 6 horas após sua administração.

### **3.2.9. Avaliação de Efeitos Adversos em Ratos**

A administração intratecal de grandes doses de bloqueadores de canais de cálcio tipo N pode produzir vários efeitos adversos (Malmberg e Yaksh, 1994), os quais podem interferir nos testes de nocicepção. Desta forma, realizamos um teste para estabelecer uma quantificação dos efeitos adversos causados pela administração intratecal da  $Ph\alpha 1\beta$  (200-1000 pmol/sítio) ou  $\omega$ -CTx-MVIA (3-600 pmol/sítio) em ratos. A toxicidade foi avaliada conforme procedimentos descritos por Smith et al. (2002), pela classificação por escores que variaram de 1 (alodínia) até 7 (severo serpenteado de cauda, tremor do corpo e alodínia).

### **3.2.10. Avaliação Neurológica**

A avaliação neurológica realizada neste trabalho foi baseada na Avaliação Neurológica Global conforme descrito por Modo *et al.* (2000) com a adição do teste “Foot Print”. Este teste foi realizado afim de predizer possíveis seqüelas neurológicas provindas da administração da  $Ph\alpha 1\beta$ . Esta avaliação foi composta de cinco itens: 1) Gaiola inclinada; 2) Reação Visual; 3) Reflexo de Endireitamento; 4) Teste da barra horizontal; 5) Reação de colocação. Todos os itens da escala da avaliação neurológica têm igual peso devido a simples avaliação de ausência ou presença de algum item, dadas as pontuações de zero e um respectivamente.

Administrou-se toxina  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu\text{L}$ /sítio) imediatamente ou 3 horas antes do teste.

- 1) Gaiola inclinada: Posiciona-se o animal em uma gaiola com 45° de inclinação e este é considerado inapto caso deslize além dos limites da superfície inclinada.
- 2) Reação visual: Segura-se o animal pelo dorso, afastando-o da gaiola, e se ele alcançar a extremidade da mesma com as patas dianteiras o reflexo encontra-se preservado.
- 3) Reflexo de endireitamento: Posiciona-se o animal em supino utilizando uma das mãos. O reflexo de endireitamento está intacto se o animal retorna espontaneamente para a posição inicial, caso contrário há perda do mesmo.
- 4) Teste da barra horizontal: Os membros dianteiros do animal são posicionados sobre uma barra paralela e espera-se que o animal seja capaz de se manter suspenso por no mínimo três segundos. A barra encontra-se a 30 cm do nível do solo onde se encontra uma almofada de espuma cuja finalidade é garantir uma queda segura.
- 5) Reflexo de colocação: O animal encontra-se sobre uma plataforma com um hemisorso próximo à extremidade da mesma. Cada membro será gentilmente estendido e deverá retornar de volta a superfície da plataforma.
- 6) Foot Print: As patas traseiras do animal foram tingidas e o mesmo caminhou sobre uma superfície branca para registro e verificação do padrão de passadas.

### **3.2.11. Teste da Locomoção Forçada em Cilindro Giratório (Rotarod)**

Esse teste foi utilizado para avaliar o efeito da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ou  $\omega$ -CTx-MVIA sobre a coordenação motora dos animais e verificar a possibilidade de um relaxamento muscular não específico ou efeito sedativo. O procedimento foi realizado conforme descrito por Scheidt e colaboradores (2002) com algumas modificações. Vinte e quatro horas antes do experimento, camundongos foram treinados no rotarod (Equipamentos Insight, Ribeirão Preto). No dia do experimento, os animais foram injetados com 5  $\mu$ L (i.t) de veículo, Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) ou  $\omega$ -conotoxina MVIA (10 pmol/sítio) e submetidos ao cilindro giratório 180 minutos depois da administração. O número de quedas foi registrado por 4 minutos.

### **3.2.12. Teste do Campo Aberto**

Para avaliar o efeito da administração i.t. da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  sobre a atividade locomotora espontânea (exploração horizontal e vertical), os animais foram submetidos a um campo aberto (40X12X20 cm) dividido em quatro áreas iguais. A atividade motora é medida através do uso de três detectores de luz infravermelha, cada um focalizado numa fotocélula. Camundongos receberam administração intratecal de 5  $\mu$ L de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIA (10 pmol/sítio) ou veículo (PBS). Em seguida foram submetidos ao campo aberto e avaliados por 3 horas. Para avaliar a exploração horizontal foi medido o número de cruzamentos com todas

as patas (*crossing*) e para a exploração vertical o número de suspensões das patas anteriores (*rearing*).

### **3.2.13. Força de agarre**

Para a medida de força de agarre, foi usado um transdutor de força conectado a um suporte (Fower *et al.*, 2002). Cinco testes foram realizados por camundongos com um período máximo de 50s para cada animal em dois dias. A força de agarre foi desenvolvida para registrar a máxima força de agarre exercida (Prado *et al.*, 2006). Camundongos receberam Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIIA (10 pmol/sítio) ou veículo (PBS) e 3 horas após foram submetidos ao teste.

### **3.2.14. Registro dos Efeitos da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$ sobre a Frequência Cardíaca (FC)**

Esse protocolo foi realizado para caracterizar as alterações na frequência cardíaca e simultaneamente monitorar as possíveis alterações na pressão arterial média (PAM) atribuídas às toxinas Ph $\alpha$ 1 $\beta$  e  $\omega$ -CTx- MVIIA, quando administradas através de injeção intratecal em ratos.

Foram confeccionadas cânulas arteriais de 15 cm de polietileno PE-50 soldado por aquecimento a 4 cm do tubo de polietileno PE-10. Tais cânulas foram preenchidas com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e a extremidade livre do PE-50 ocluída com um pino de metal. A administração intratecal das toxinas foi realizada 24 horas após a canulação arterial. Mediu-se a pressão arterial através de um transdutor de pressão. A frequência cardíaca, por sua vez, foi mensurada por meio

dos picos gerados pelo mesmo nos tempos 0,5 e 3 horas após administração das toxinas.

### **3.2.15. Registro dos efeitos da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$ sobre Pressão arterial média (PAM)**

Este teste foi realizado conforme descrito no item anterior afim de verificar alterações na PAM dos animais.

### **3.2.16. Preparação de Sinaptossomas**

Para verificar os mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , foram realizados experimentos com sinaptossomas de medula espinhal. Uma fração contendo os sinaptossomas foi preparada com a medula de ratos (180-250g) que foram decaptados e sua medula espinhal foi rapidamente retirada e colocada numa solução aerada (com 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) gelada de tampão Krebs-Ringer, conforme descrito por Xinhui e Eisenach (2001). A medula espinhal de dois ratos foi dissecada e homogeneizada em 14 mL de solução (gradiente) gelada de 0.32 M sacarose, e o pellet (P<sub>2</sub>) foi preparado por centrifugação com 1000 g por 5 minutos seguido por 15000 g por 20 minutos, conforme descrito por Lonart e Johnson (1995).

### 3.2.17. Liberação de Glutamato em Sinaptossoma

Neste experimento, a fração P<sub>2</sub> foi resuspensa em 4,5 mL de tampão Krebs-Ringer, aerado com 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, e 500 µl de suspensão foi aliqotada para cada tubo contendo 1500 µl de tampão Krebs. Foram adicionados para a solução de 5 µl contendo NADP<sup>+</sup> (1 mM), glutamato desidrogenase (50 unidades) e Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (1,25-7,5 µM) ou Ziconotida (1,25-7,5 µM). As toxinas foram adicionadas 100 s antes da despolarização da membrana com capsaicina 100 µM. Este ensaio gerou a formação de NADPH por ação da glutamato desidrogenase em presença de glutamato, com NADPH sendo medido fluorometricamente ( Nichols *et al.*, 1987). A excitação foi de 360 nm e a emissão de 450 nm, conforme experimento anterior na dosagem de glutamato no ACF de ratos.

### 3.2.18. Medida da concentração de cálcio intracelular - [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Os sinaptossomas foram incubados em meio contendo 5 µM fura-2 AM (estoque de solução com DMSO 1mM). As medidas de cálcio livre [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> em sinaptossomas foram realizados em espectrofluorímetro de acordo com Grynkiewicz *et al.* (1985) com algumas modificações previamente descritas conforme Romano-Silva *et al.*, 1993 e Prado *et al.*, 1996. CaCl<sub>2</sub> foi adicionado na suspensão no início de cada ensaio fluorimétrico (1,0 mM concentração final), sendo esta solução mantida a 35 °C. A emissão de fluorescência foi detectada a 510 nm usando como faixa de excitação média 340/380 nm sob temperatura controlada a 37 °C e sob constante agitação. As toxinas foram adicionadas na suspensão de sinaptossomas

100s antes da despolarização da membrana com 100  $\mu$ M capsaicina. A calibração do sinal de fluorescência era feita pela adição de SDS 10% e EGTA 10 mM. A concentração em nanomolar de cálcio era calculada através da fórmula:

$$C = Kd * [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] * Sf2 / Sb2 \text{ (Grynkiewicz et al., 1985).}$$

### 3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M, ED<sub>50</sub> ou ID<sub>50</sub> (a dose de toxinas que produzem metade da resposta máxima antinociceptiva ou a dose das toxinas que reduzem as respostas nociceptivas na ordem de 50% de inibição relativo ao controle). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, Bonferroni ou pelo teste de Newmann Keuls, quando apropriado. Valores de P menores que 0.05 (\*P<0.05 e \*\*P<0.01) foram considerados como indicativos de significância. Os efeitos adversos foram expressos como medianas seguidos dos seus intervalos interquartis e ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newmann Keuls.

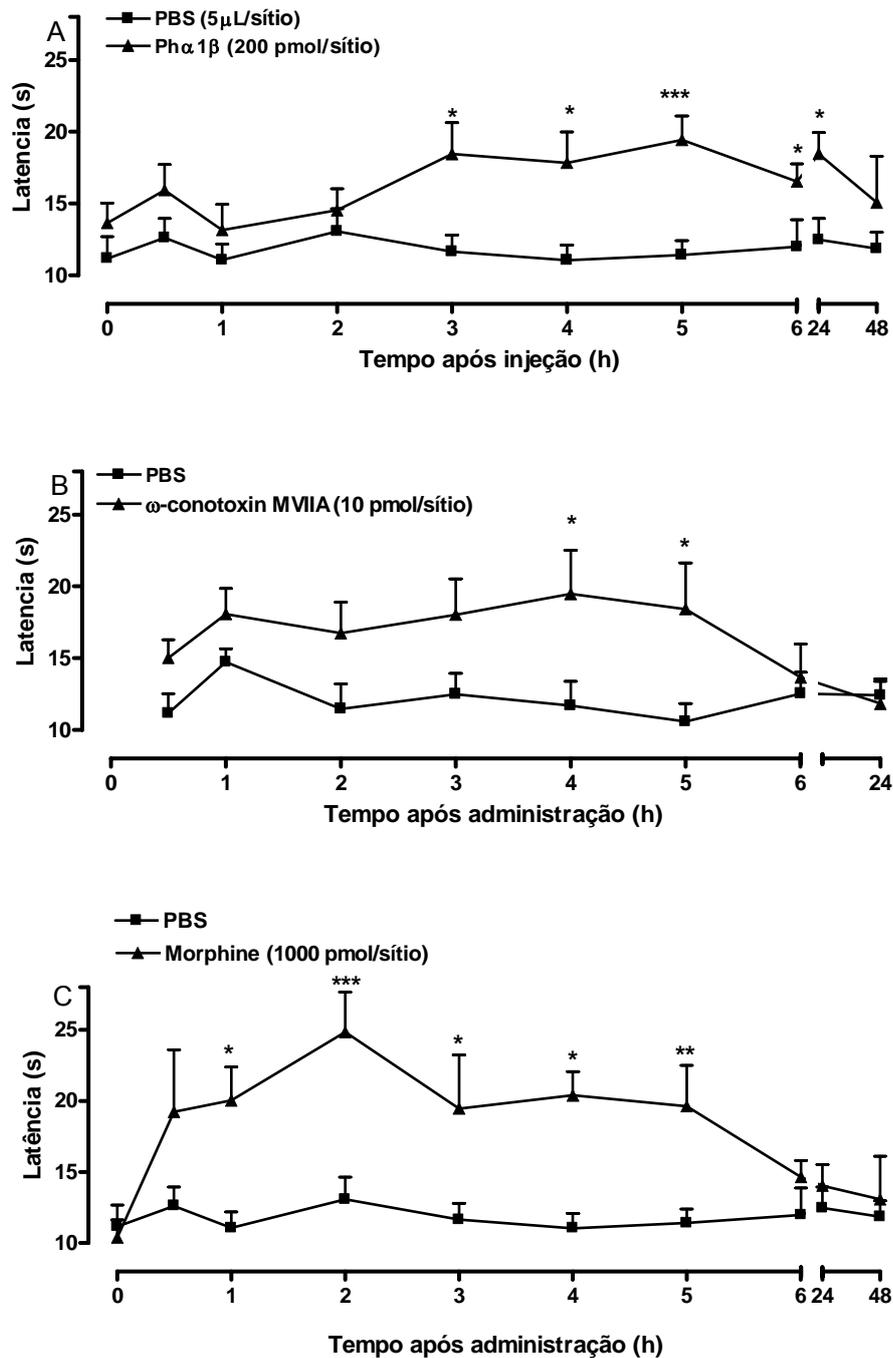
---

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELO DE DOR TÉRMICA AGUDA EM CAMUNDONGOS

A administração intratecal de  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio) produziu antinocicepção no teste da placa quente, caracterizado por aumento na latência de resposta ao estímulo térmico (Figura 1A). Esse efeito antinociceptivo iniciou-se lentamente, sendo significativo somente três horas após a administração e perdurou até 24 horas. O efeito antinociceptivo máximo foi observado 5 horas após a administração da  $\text{Ph}\alpha 1\beta$ , com aumento da latência em relação ao veículo de  $85\pm 7\%$ .

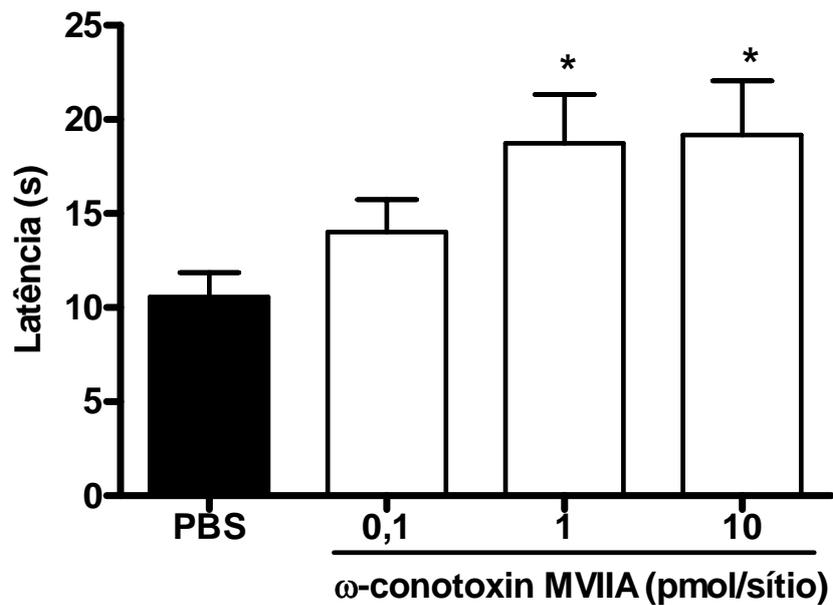
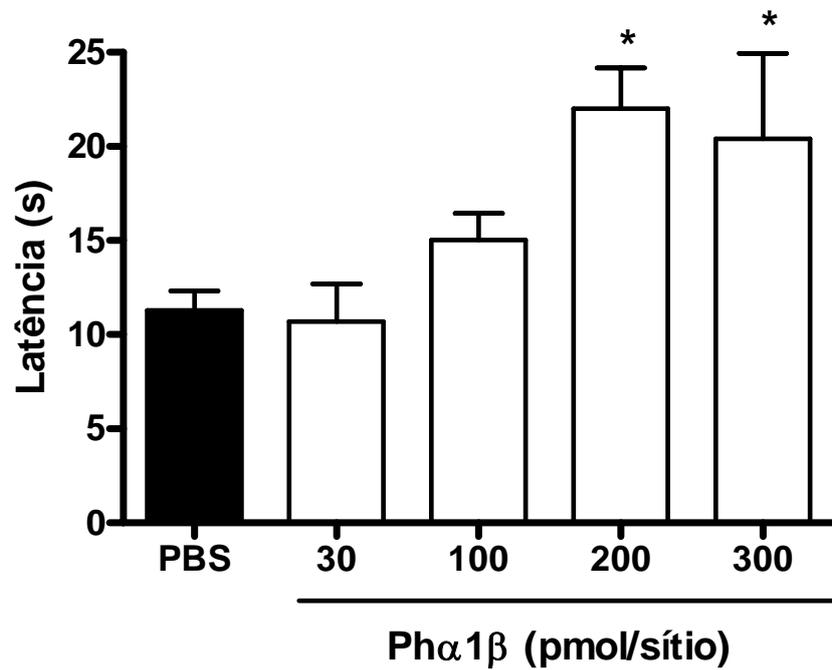
A administração intratecal de  $\omega$ -CTx-MVIA (10 pmol/sítio) produziu efeito antinociceptivo de curta duração comparado com a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (Figura 1B). O efeito antinociceptivo máximo foi de  $70\pm 28\%$ , 5 horas após a sua administração. Já a administração intratecal de morfina (1000 pmol/sítio), em uma dose 5 vezes maior do que a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$ , produziu efeito antinociceptivo que iniciou-se 30 minutos após a sua administração e permaneceu significativo por apenas 5 horas (Figura 1C), exercendo um efeito antinociceptivo máximo, 2 horas após a sua administração ( $95\pm 11\%$ ).



**Figura 1.** Efeito antinociceptivo na dor aguda térmica produzido pela injeção intratecal da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio, A) isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer*,  $\omega$ -CTx-MVIIA (10 pmol/sítio, B) ou da morfina (1000 pmol/sítio, C) em camundongos. 0 representa valores basais obtidos antes das administrações dos tratamentos. Os animais foram avaliados na placa em todos os tempos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 12-16 animais, dependendo do grupo. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 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 e efeito máximo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em causar antinocicepção no teste da placa quente, foi construída uma curva dose-resposta para esta toxina 5 horas após sua administração (Figura 2a). A injeção intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  produziu efeito antinociceptivo estatisticamente significativo nas doses de 200 e 300 pmol/sítio, com dose efetiva 50 (DE<sub>50</sub>) calculada de 85 (24-300) pmol/sítio e efeito máximo de 85 $\pm$ 7%.

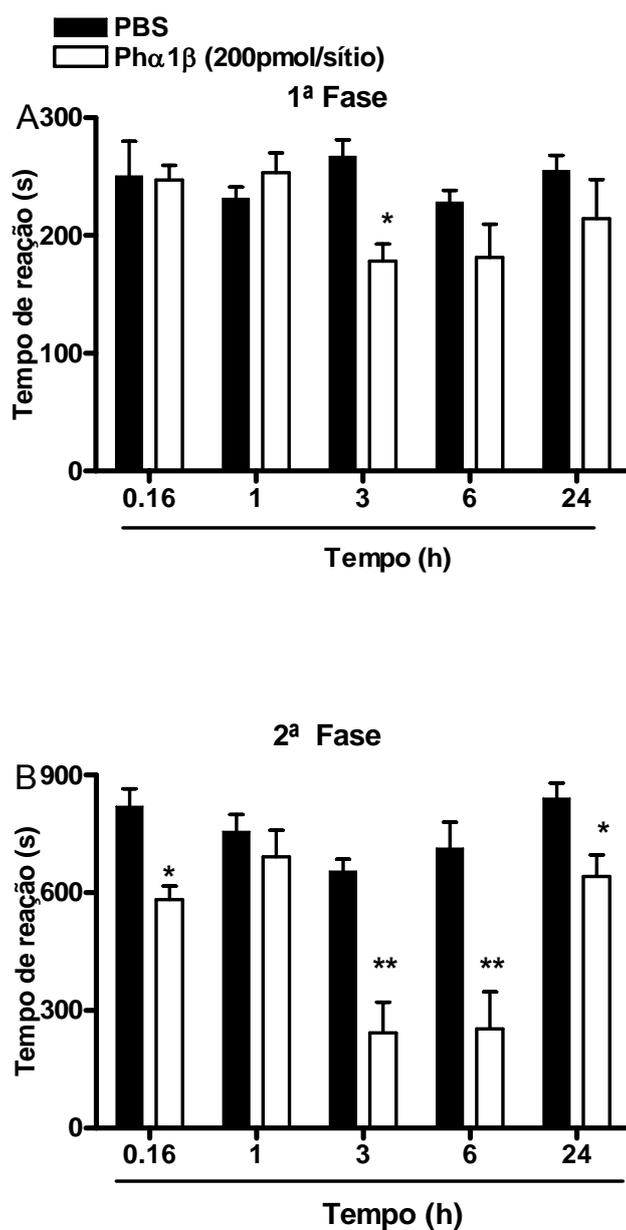
A administração de  $\omega$ -CTx-MVIA produziu efeito antinociceptivo máximo de 74 $\pm$ 28% 5 horas após sua administração com dose efetiva 50 (DE<sub>50</sub>) calculada de 0,17 (0,013-2,26) pmol/sítio (Figura 2B). A  $\omega$ -CTx-MVIA apresentou uma maior potência que a toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  no teste da placa quente em camundongos.



**Figura 2.** Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30-300 pmol/sítio, A) isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* ou  $\omega$ -CTx-MVIIA (0,1-10 pmol/sítio, B) em camundongos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6-13 animais \*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

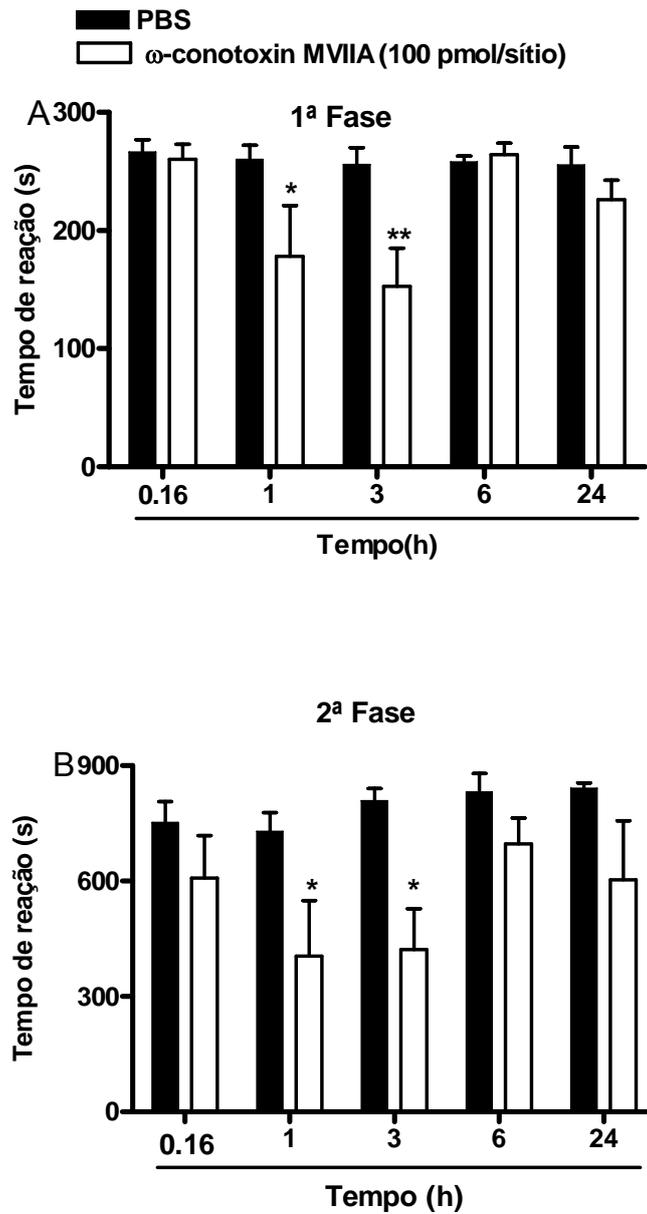
## 4.2. EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELO DE DOR QUÍMICA PERSISTENTE EM RATOS (FORMALINA)

Semelhante ao observado no teste da placa quente em camundongos, o efeito antinociceptivo induzido pela administração intratecal prévia da  $Ph\alpha 1\beta$  na dose de 200 pmol/sítio, causou antinocicepção na fase inflamatória quando injetada 10 minutos, 3, 6 ou 24 horas antes da injeção de formalina (Figura 3B). A inibição da nocicepção 3 horas após a injeção da  $Ph\alpha 1\beta$  foi de  $60\pm 13\%$ . Da mesma forma, a  $Ph\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio) quando administrada 3 horas antes da injeção de formalina produziu antinocicepção na 1ª fase do teste da formalina com uma inibição de  $34\pm 7\%$  (Figura 3A).



**Figura3.** Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200pmol/sítio) isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* no modelo de nocicepção causada pela formalina em ratos. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 6-8 animais.\*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

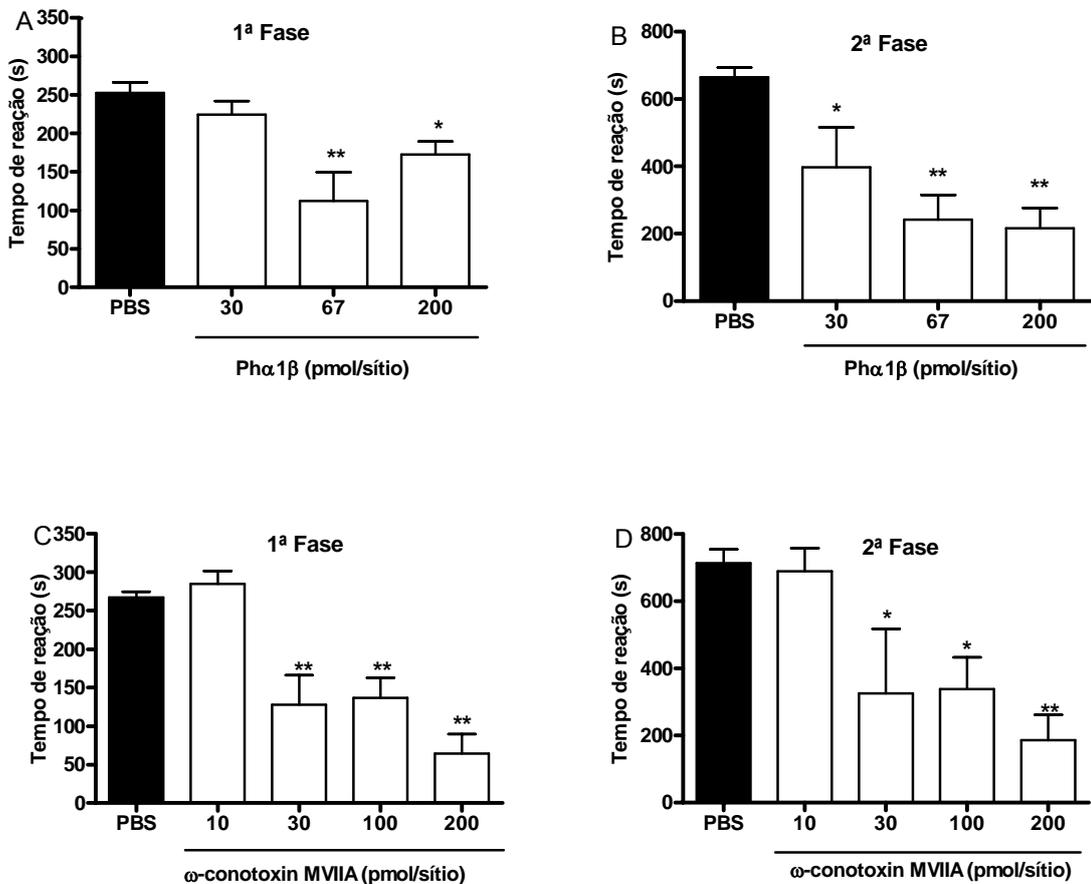
A administração intratecal da  $\omega$ -CTx-MVIIA, na dose de 100 pmol/sítio, causou antinocicepção na fase inflamatória quando administrada 1 e 3 horas antes da administração de formalina (Figura 4B). Já a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , na mesma fase causou inibição em 0,16, 3, 6 e 24 horas antes da administração de formalina na pata (Figura 3B). Desta forma, o efeito da  $\omega$ -CTx-MVIIA foi de duração mais curta do que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ .



**Figura 4.** Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da  $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) no modelo de nociceção causada pela formalina em ratos. Cada ponto representa a média+erro padrão de 5-7 animais. \* $P < 0,05$  representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Para avaliar a potência da  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  e da  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  em causar antinocicepção no teste da formalina em ratos, foram construídas curvas dose-resposta para estas toxinas 3 horas após sua administração (Figura 5). Três horas após a administração da  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (30-200 pmol/sítio) observou-se redução significativa da fase inflamatória (2ª fase, 5B), com dose inibitória 50 ( $\text{DI}_{50}$ ) calculada de 48 (25-92) pmol/sítio e inibição máxima ( $\text{I}_{\text{max}}$ ) de  $67\pm 9\%$ . Já na fase neurogênica (1ª fase, 5A) da nocicepção induzida por formalina em ratos a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (67 pmol/sítio) teve  $\text{I}_{\text{max}}$  de  $55\pm 15\%$ . O valor de  $\text{DI}_{50}$  para a 1ª fase não pode ser calculado pela falta de relação dose-resposta clara.

A administração intratecal de  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  (10-200 pmol/sítio) produziu efeito antinociceptivo na fase inflamatória (Figura 5D) com  $\text{I}_{\text{max}}$  de  $73\pm 11\%$  e  $\text{DI}_{50}$  de 63 (27-145) pmol/sítio. Já na fase neurogênica (1ª fase, 5C) da nocicepção induzida por formalina em ratos a  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  (200 pmol/sítio) teve  $\text{I}_{\text{max}}$  de  $76\pm 9\%$  e  $\text{DI}_{50}$  de 78 (25-249) pmol/sítio para a primeira fase. De maneira geral, a  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  teve potência e eficácia semelhante a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  na fase inflamatória do teste.

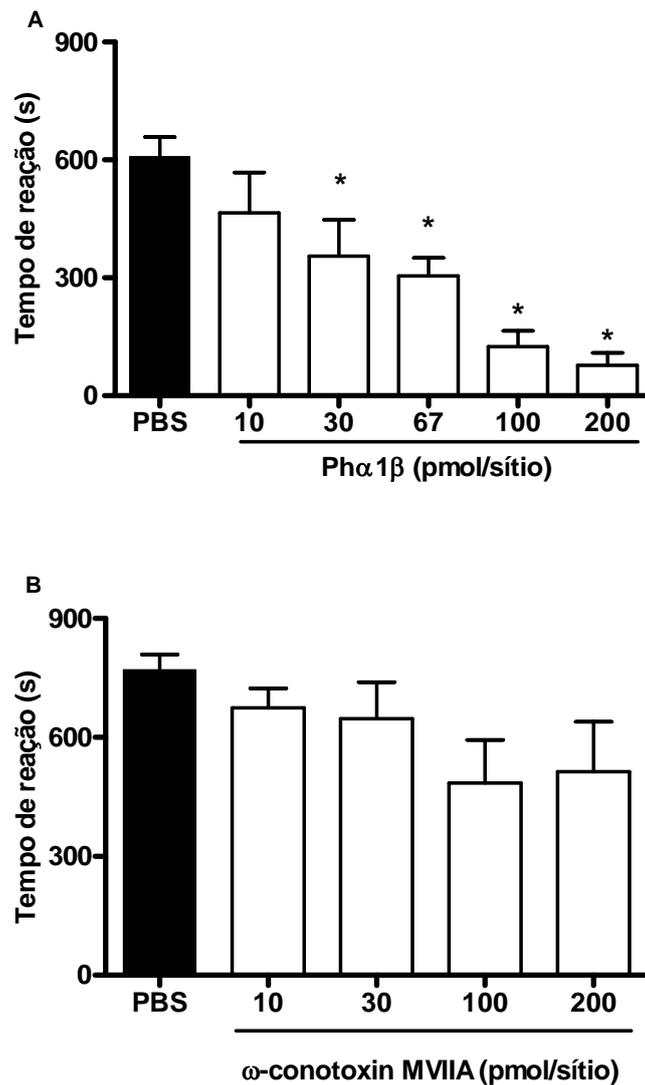


**Figura 5.** Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30-200 pmol/sítio) isolada do veneno da Phoneutria nigriventer e  $\omega$ -CTx-MVIIA (10-200 pmol/sítio) no modelo de nocicepção de formalina 3 horas antes de sua administração na pata de ratos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 4-10 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 Dunnett).

Posteriormente, investigamos a capacidade da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  de reverter um quadro nociceptivo já instalado. A administração intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (10-200 pmol/sítio) 9 minutos após a injeção da formalina foi capaz de reduzir de maneira dependente da dose a fase inflamatória de nocicepção induzida por este agente algogênico (Figura

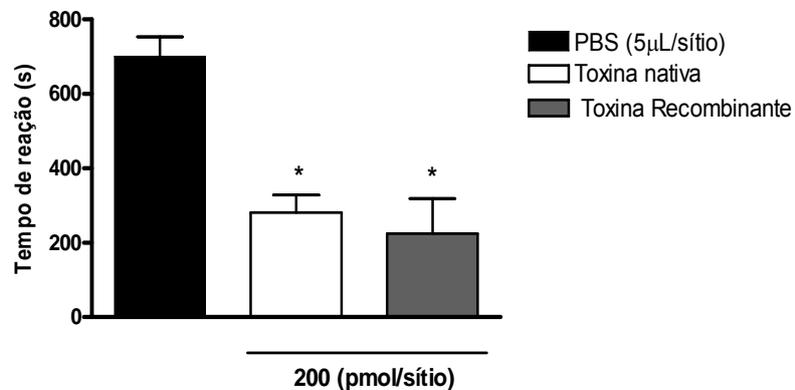
6A). A  $DI_{50}$  calculada foi de 50 (25-75) pmol/sítio e a  $I_{max}$  (obtida com a dose de 200 pmol/sítio) foi de  $87 \pm 5\%$ .

Também investigamos a capacidade da  $\omega$ -CTx-MVIIA reverter um quadro nociceptivo já instalado. A administração intratecal  $\omega$ -CTx-MVIIA (10-200 pmol/sítio, 6B) 5 minutos após a injeção da formalina foi capaz de reduzir parcialmente a fase inflamatória de nocicepção somente na dose de 100 pmol/sítio (inibição máxima de  $37 \pm 14\%$ ) e  $DI_{50}$  maior que 200 pmol/sítio. Assim a  $Ph\alpha 1\beta$  foi mais eficaz e potente do que a  $\omega$ -CTx-MVIIA em reduzir um quadro de nocicepção já instalado.



**Figura 6.** Efeito antinociceptivo do tratamento intratecal (i.t) Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (10-200 pmol/sítio, A) isolada do veneno da Phoneutria nigriventer ou  $\omega$ -CTx-MVIIA (10-200 pmol/sítio, B) 9 minutos após a injeção intraplantar de formalina em ratos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 5-12 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 Student-Newman-Keuls).

O estudo demonstrou que a toxina nativa apresentou atividade antinociceptiva no teste da formalina. Então resolvemos testar a atividade da toxina recombinante no pós-tratamento no teste da formalina.



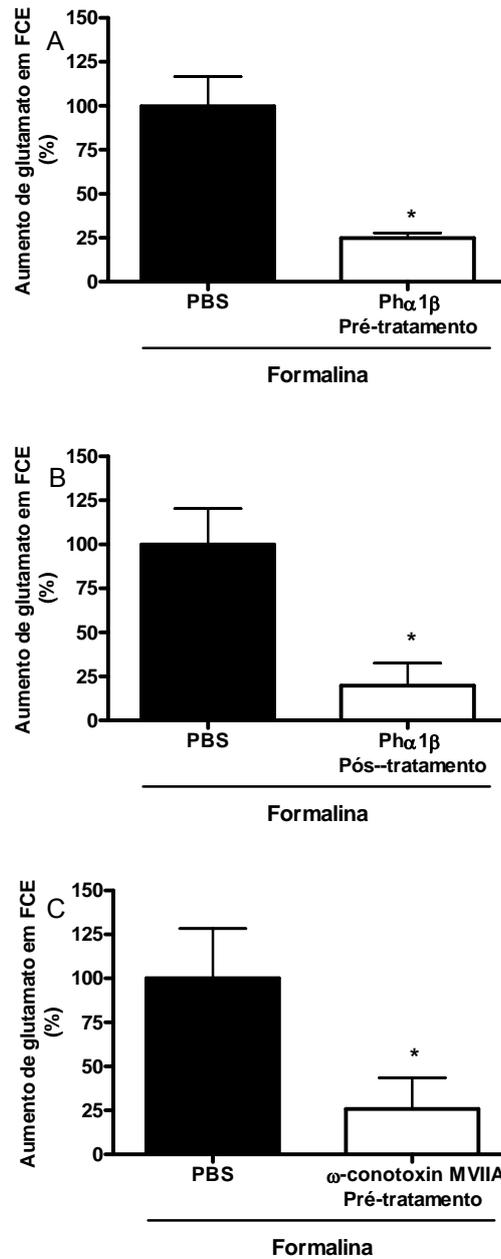
**Figura 7.** Efeito antinociceptivo produzido pela injeção intratecal da toxina nativa e recombinante Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) no modelo de nocicepção causada pela formalina em ratos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 3-5 animais.\*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Similar ao observado com a toxina nativa, a versão recombinante da toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  também foi capaz de reduzir a segunda fase da nocicepção induzida por formalina quando pós-administrada (Figura 7).

#### 4.3.DOSAGEM “*ex vivo*” DE GLUTAMATO NO LÍQUOR DE RATO

A injeção de formalina aumenta os níveis de glutamato no líquido, um fenômeno relacionado à indução de dor (Malmberg et al., 1995). Diante disto, foi realizada uma dosagem “*ex vivo*” de glutamato em animais tratados com as toxinas

e submetidos ao teste da formalina. De acordo com dados prévios da literatura, 15 minutos após a injeção de formalina na pata de ratos, os níveis de glutamato no líquido encontram-se aumentados, quando comparado a animais tratados com PBS na pata. Observamos que a administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio, i.t.), 3 horas antes ou 9 minutos depois da formalina, foi capaz de reduzir drasticamente o aumento nos níveis de glutamato no líquido (Figura 8A e B). Da mesma forma que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , o pré-tratamento com a  $\omega$ -CTx-MVIIA foi capaz de reduzir os níveis de glutamato no líquido (Figura 8C).

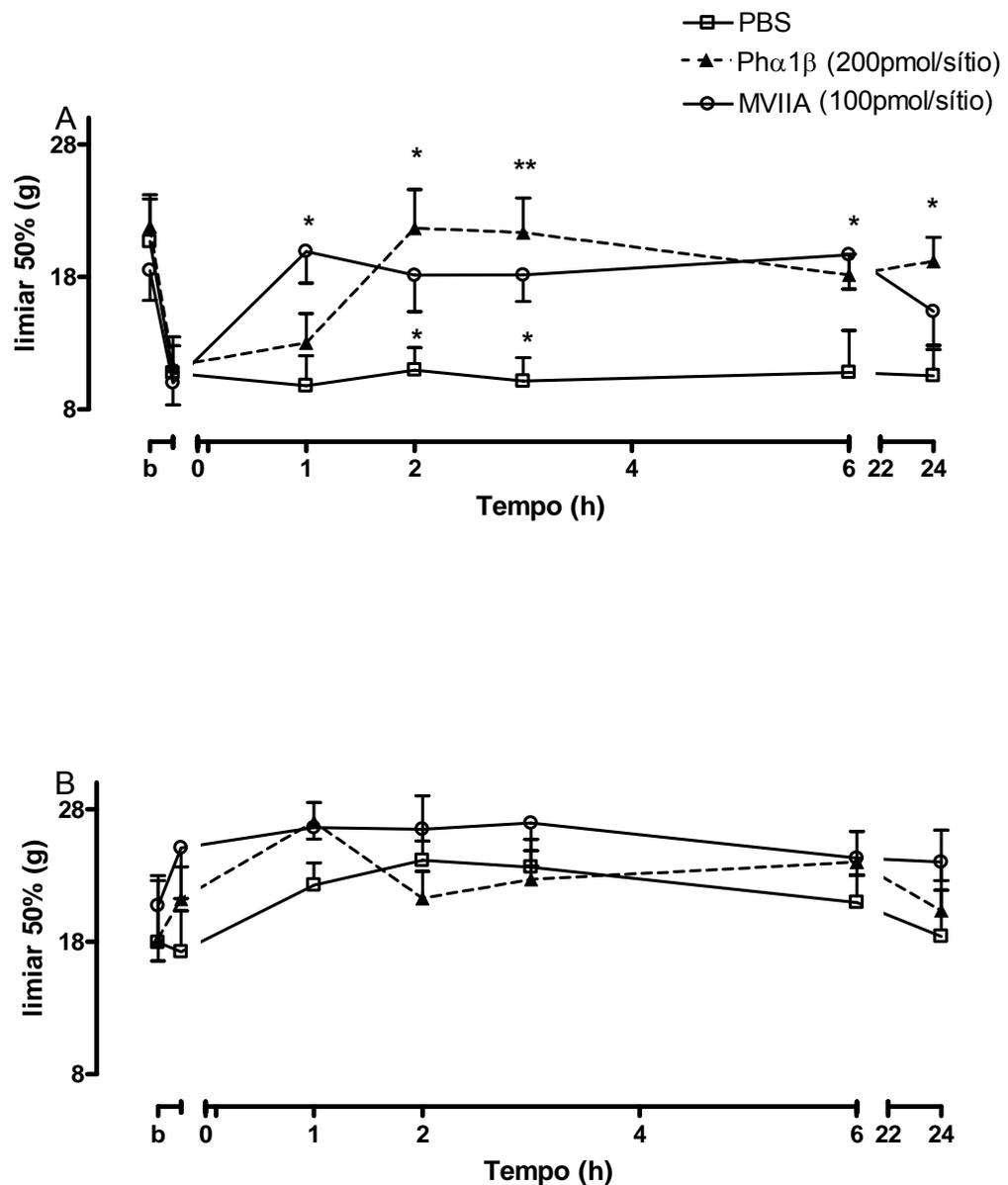


**Figura 8.** Efeito da injeção intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio, A) e  $\omega$ -CT $\alpha$ -MVIIA (100 pmol/sítio, C) antes da administração de formalina na pata e de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio, B) após o quadro nociceptivo já instalado nos níveis de glutamato do líquido de ratos (FCE) (n=3-4).

#### **4.4. EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELO DE DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA EM RATOS (ACF)**

A administração intraplantar de ACF produz quadro de dor inflamatória crônica com o aparecimento de uma hipersensibilidade a estimulação mecânica (alodínia mecânica). De fato, 48 horas após a injeção do ACF uma significativa diminuição na sensibilidade de nocicepção, verificada na presença da alodínia mecânica (tempo 0) quando comparada à sensibilidade basal (Figura 9A). A administração intratecal da  $Ph\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio) foi capaz de reduzir a alodínia por até 24 horas na maior dose testada ( $I_{max}=100\%$ ) e a  $\omega$ -CTx-MVIIA foi efetiva por até 6 horas ( $I_{max}= 94.3\%$ ) (Figura 9A).

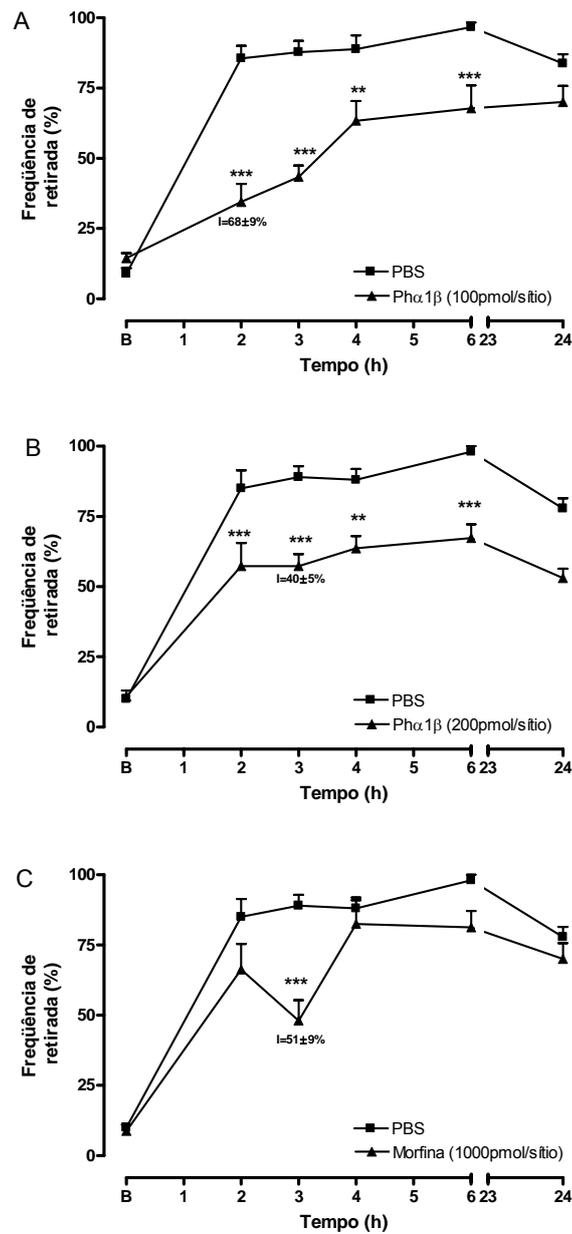
De acordo com a figura B, o tratamento dos animais com as toxinas não alteraram o limiar para detecção em animais sem inflamação.



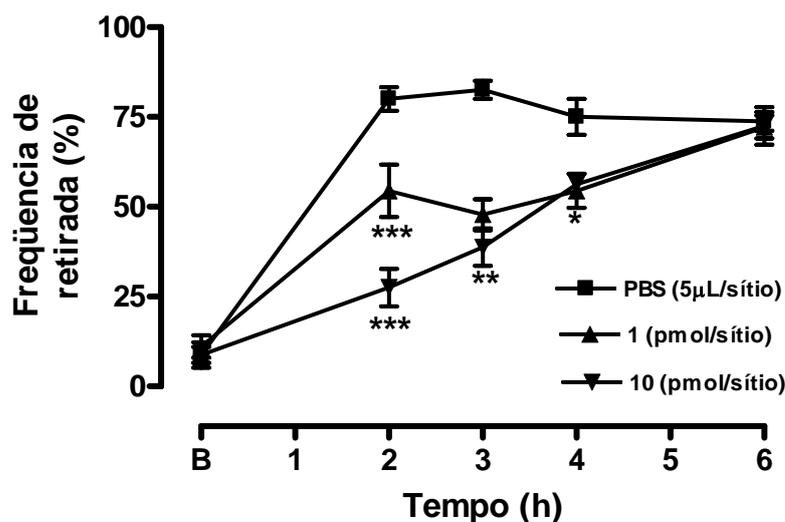
**Figura 9.** (A) Efeito do tratamento intratecal (i.t) de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) e  $\omega$ -CTX-MVIIA (100 pmol/sítio) 48 horas após a injeção intraplantar de ACF. (B) Efeito da administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) e  $\omega$ -CTX-MVIIA (100 pmol/sítio) na sensibilidade mecânica em ratos sem a administração de ACF. b representa valores basais obtidos antes da injeção intraplantar de ACF. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 8-10. \*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.5. EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELO DE DOR INCISIONAL EM CAMUNDONGOS**

Para avaliar o efeito das toxinas sobre a nocicepção incisional, foram administradas previamente à cirurgia (30 minutos antes)  $Ph\alpha 1\beta$  (100 e 200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio), morfina (1000 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio). Verificou-se efeito antinociceptivo por até 24 horas produzido pela  $Ph\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio) (Figura 10 B). Quando  $Ph\alpha 1\beta$  (100 pmol/sítio) foi administrada em camundongos, sua ação antinociceptiva foi mais curta (Figura 10 A). Já a administração de  $\omega$ -CTx-MVIIA (10 pmol/sítio) teve um efeito antinociceptivo mais curto (Figura 11) em relação a  $Ph\alpha 1\beta$  e a morfina numa dosagem 5 a 10 vezes maior que a  $Ph\alpha 1\beta$ , produziu efeito antinociceptivo apenas na terceira hora após sua administração com uma inibição  $51 \pm 9\%$  (Figura 10 C).

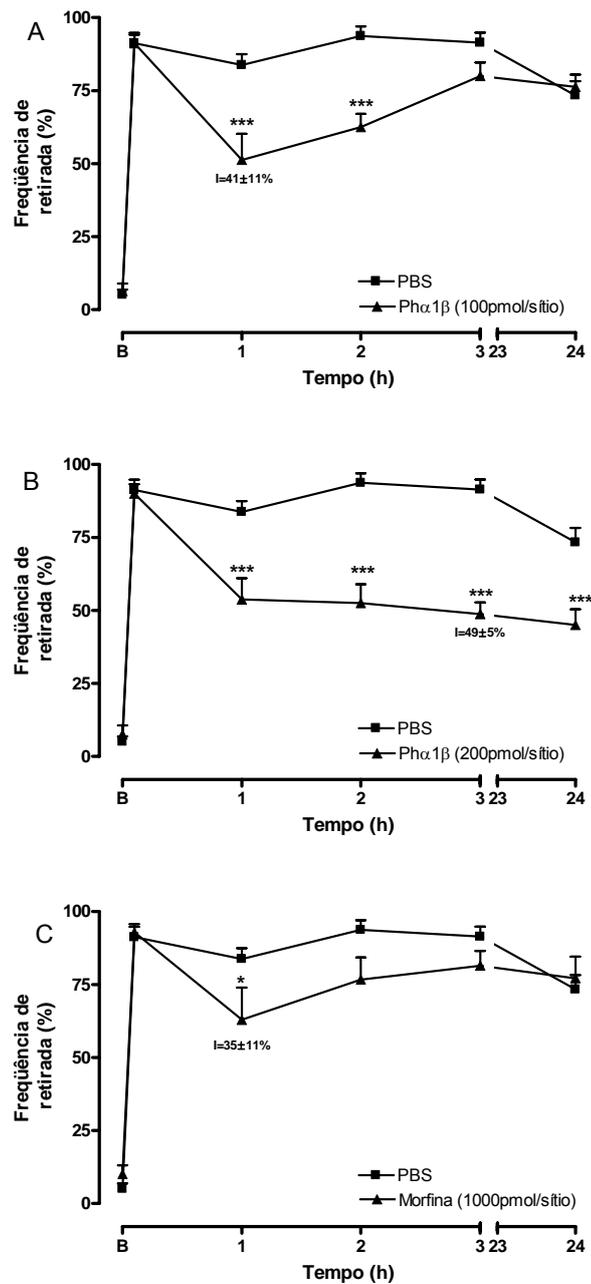


**Figura 10.** Efeito da administração prévia de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (100 e 200 pmol/sítio, A B), veículo (PBS, 5  $\mu$ L/ sítio) ou morfina (1000 pmol/sítio, C) 1-24h após a cirurgia na pata dos animais (n=6-11). B representa valores basais obtidos antes do procedimento incisivo \* P < 0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

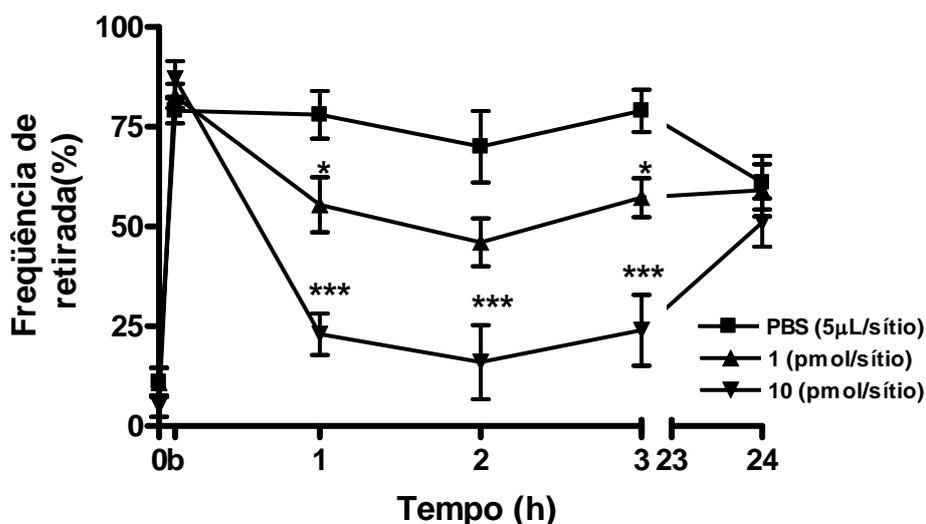


**Figura 11.** Efeito da administração prévia de  $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio) ou veículo (PBS, 5  $\mu$ L/ sítio) 1-6h após a cirurgia na pata dos animais (n=8-9). B representa valores basais obtidos antes do procedimento incisivo \* P< 0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

Posteriormente, investigamos a capacidade da  $Ph\alpha 1\beta$  de reverter um quadro nociceptivo já instalado três horas após a incisão na pata do animal (Figura 12, A B). O tratamento com a  $Ph\alpha 1\beta$  foi capaz de reduzir a alodínia por até 24 horas na maior dose testada ( $I_{max} = 49 \pm 5\%$ ). Por outro lado, a morfina não teve uma eficácia muito grande neste teste, pois só teve atividade anti-alodínica na terceira hora após a cirurgia com inibição de  $35 \pm 11\%$  (Figura 12, C). A  $\omega$ -CTx-MVIIA teve atividade anti-alodínica de mais curta duração, pois não apresentou esta atividade por até 24 horas (Figura 13), diferente da  $Ph\alpha 1\beta$  (Figura, 12 B).



**Figura 12.** Efeito da administração intratecal (i.t) de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (100 e 200 pmol/sítio, A B), veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio) ou morfina (1000 pmol/sítio, C) 3-24h após a cirurgia na pata do animais (7-8 animais). B representa valores basais obtidos antes do procedimento incisional \*P< 0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

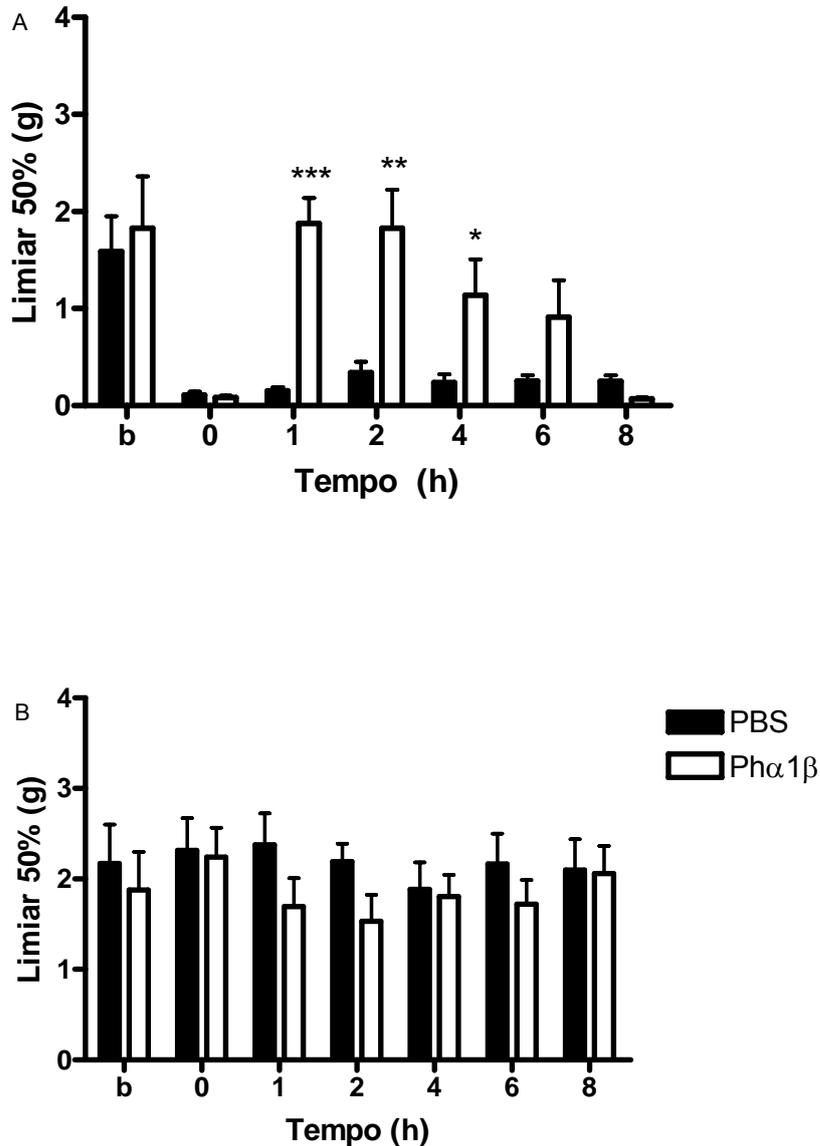


**Figura 13.** Efeito da administração intratecal (i.t) de  $\omega$ -CTx-MVIIA (1 e 10 pmol/sítio), veículo (PBS, 5  $\mu$ L/sítio) 3-24h após a cirurgia na pata do animais (10-11 animais). B representa valores basais obtidos antes do procedimento incisivo \*P< 0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.6. EFEITO ANTI-ALODÍNICO EM MODELO DE DOR PARCIAL NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS

Como está apresentado na figura 14 A a ligação parcial do nervo ciático produziu uma diminuição no limiar de nocicepção caracterizando um quadro de alodínia mecânica na pata ipsilateral à lesão quando comparado com o grupo falso-operado. O procedimento cirúrgico não alterou o limiar de resposta das patas contralaterais a lesão dos animais operados e falso-operados (Figura 14 B).

A administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  foi capaz de reduzir de forma significativa a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático com efeito por até 4 horas após a administração.

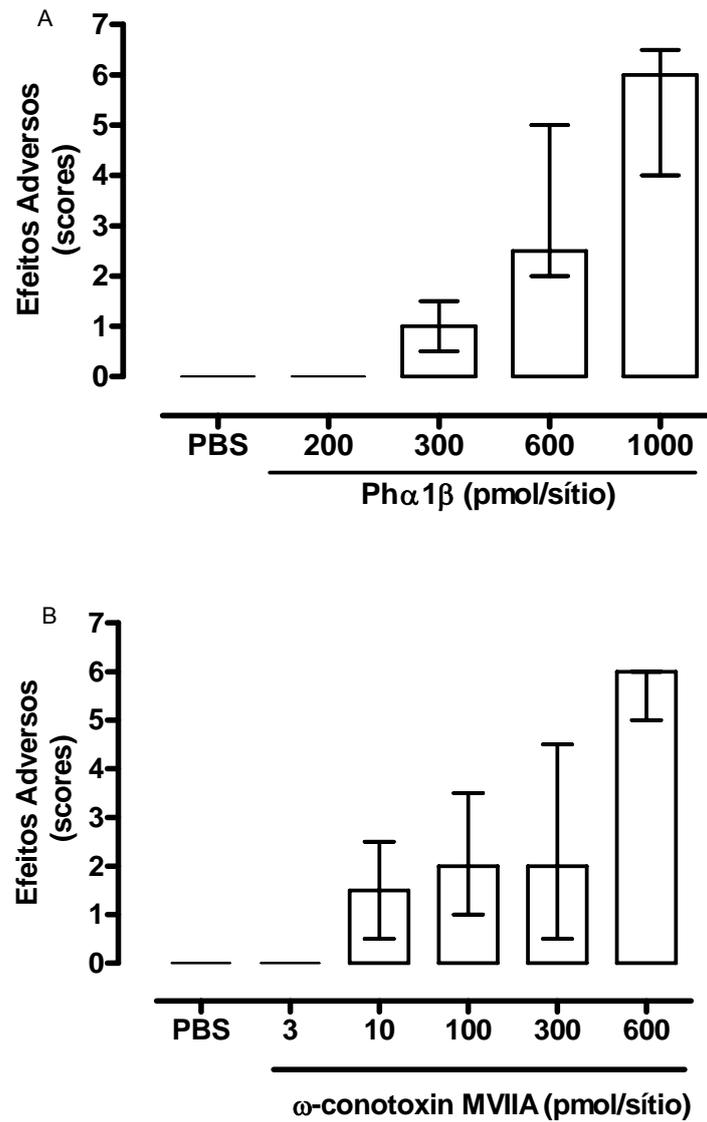


**Figura 14.** (A) Efeito da administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30 pmol/sítio) na alodínia mecânica induzida por lesão parcial no nervo ciático em camundongos. O efeito da Ph $\alpha$  1 $\beta$  foi expresso como limiar 50% (g) para a retirada da pata. (B) Efeito da administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (30 pmol/sítio) na sensibilidade mecânica em camundongos. B representa valores basais obtidos antes do procedimento incisional. \*P< 0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni) (6-7 animais).

#### 4.7. EFEITOS ADVERSOS EM RATOS

A administração intratecal de grandes doses de bloqueadores de canais de cálcio tipo N pode produzir vários efeitos adversos, incluindo disfunções motoras graves, as quais poderiam interferir nos testes de nocicepção, pois estes testes dependem da integridade motora do animal (Malmberg e Yaksh, 1994). A administração intratecal da  $Ph\alpha 1\beta$  produziu efeitos adversos de maneira significativa nas doses de 600 e 1000 pmol/sítio (Figura 15 A). Os efeitos adversos foram caracterizados pelo aparecimento de alodínia, serpenteado de cauda e tremores com valor de dose tóxica 50 ( $DT_{50}$ ) de 788 (485-1278) pmol/sítio. Por outro lado, a administração intratecal da  $Ph\alpha 1\beta$  na dose de 200 pmol/sítio não causou nenhum efeito adverso detectável. Desta forma, a administração intratecal da  $Ph\alpha 1\beta$  pode produzir o efeito antinociceptivo em doses onde não produz efeitos adversos. Baseados nos valores de  $DT_{50}$  (788 pmol/sítio) na avaliação dos efeitos adversos e de  $DI_{50}$  (48 pmol/sítio) no teste da formalina em ratos, observamos que a janela terapêutica da  $Ph\alpha 1\beta$  dada por via intratecal é de cerca de 16 vezes.

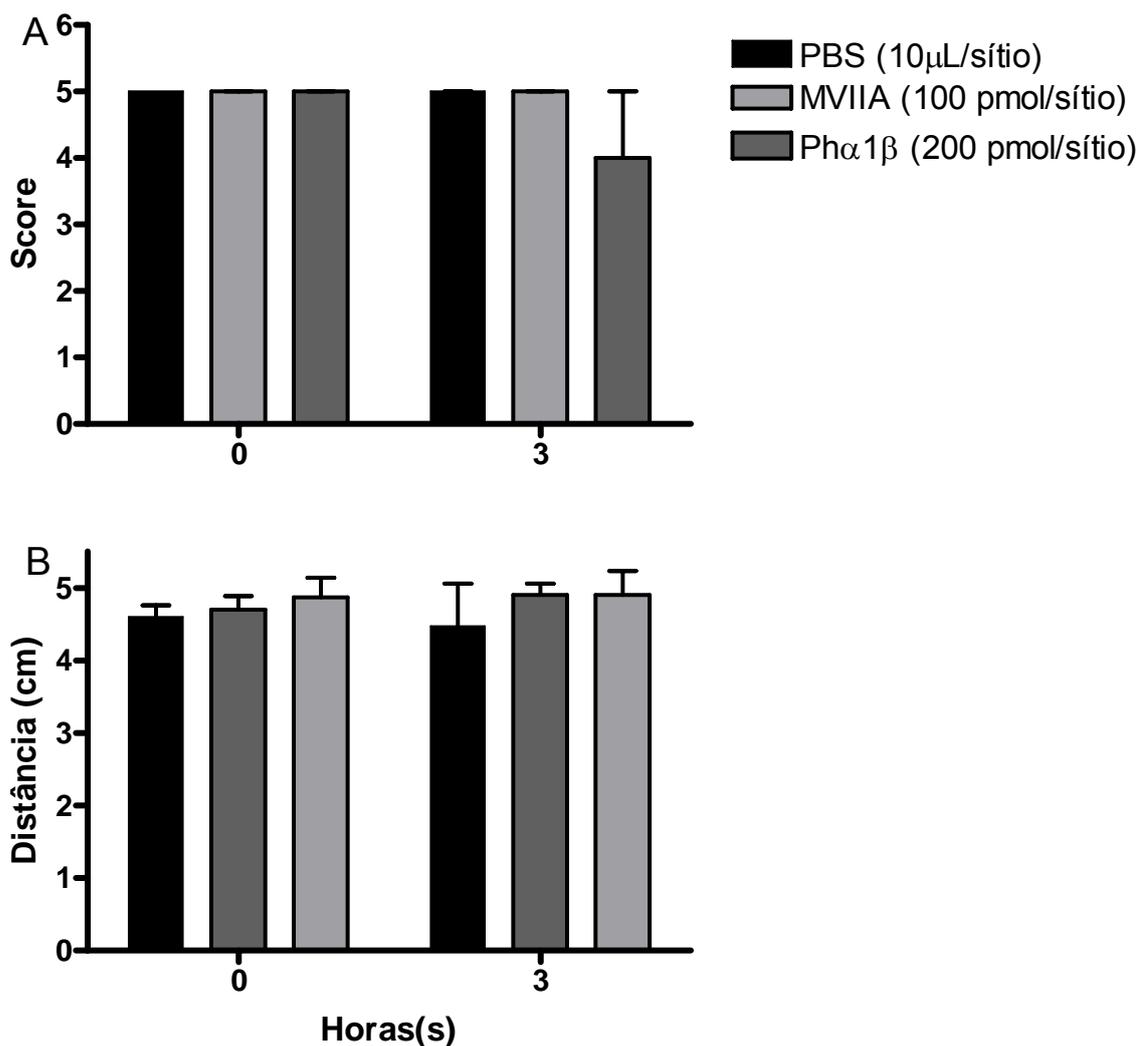
De forma diferente, a administração intratecal da  $\omega$ -CTx-MVIA produziu o efeito antinociceptivo em doses onde apresentou efeitos adversos (Figura 15 B), com valor de  $DT_{50}$  de 287 (147-562 pmol/sítio). Com base nos valores de  $DT_{50}$ , a  $\omega$ -CTx-MVIA foi 2,7 vezes mais potente do que a  $Ph\alpha 1\beta$  em induzir toxicidade. Além disto, a janela terapêutica da  $\omega$ -CTx-MVIA foi mais estreita do que a da  $Ph\alpha 1\beta$  (aproximadamente 4,6 vezes). Estes resultados demonstram que a  $Ph\alpha 1\beta$  apresenta analgesia em doses onde não apresenta toxicidade observável, diferente da  $\omega$ -CTx-MVIA.



**Figura 15.** Efeitos adversos causados pela administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200-1000 pmol/sítio, A) ou  $\omega$ -CTx-MVIIA (3-600 pmol/sítio, B) em ratos. Cada ponto representa a mediana  $\pm$  intervalos interquartis de 3-6 animais.

#### 4.8. AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

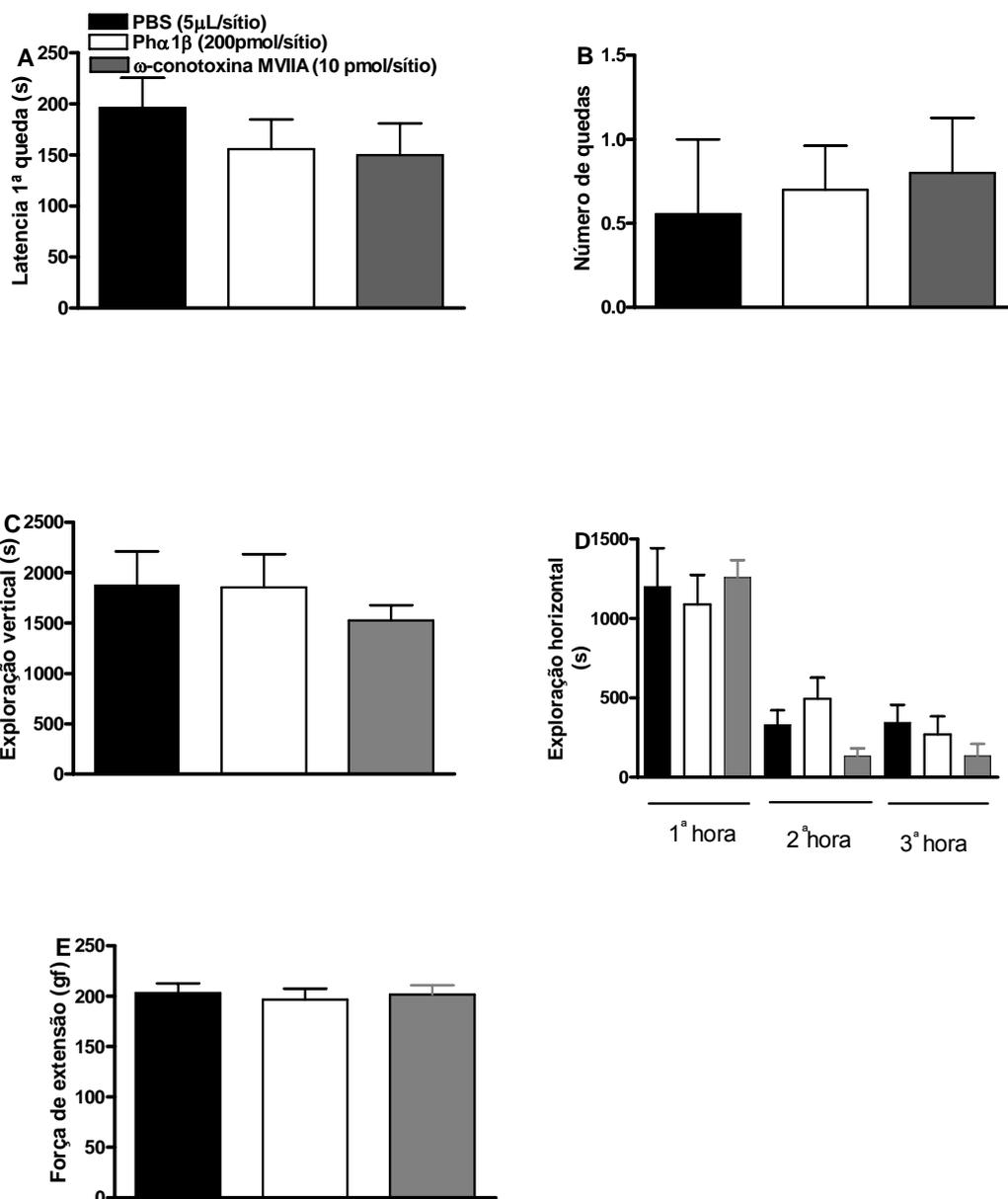
De acordo com as figuras abaixo observamos que não houve seqüelas neurológicas causadas pela administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) ou  $\omega$ -CTX-MVIA (100 pmol/sítio) em ratos.



**Figura 16.** Efeitos adversos na avaliação neurológica global (A) e foot print (B) causados pela administração intratecal de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio) ou  $\omega$ -CTX-MVIA (100 pmol/sítio) em ratos. Cada ponto representa a mediana  $\pm$  intervalos interquartis de 6-8 animais.

#### 4.9. EFEITOS ADVERSOS EM CAMUNDONGOS

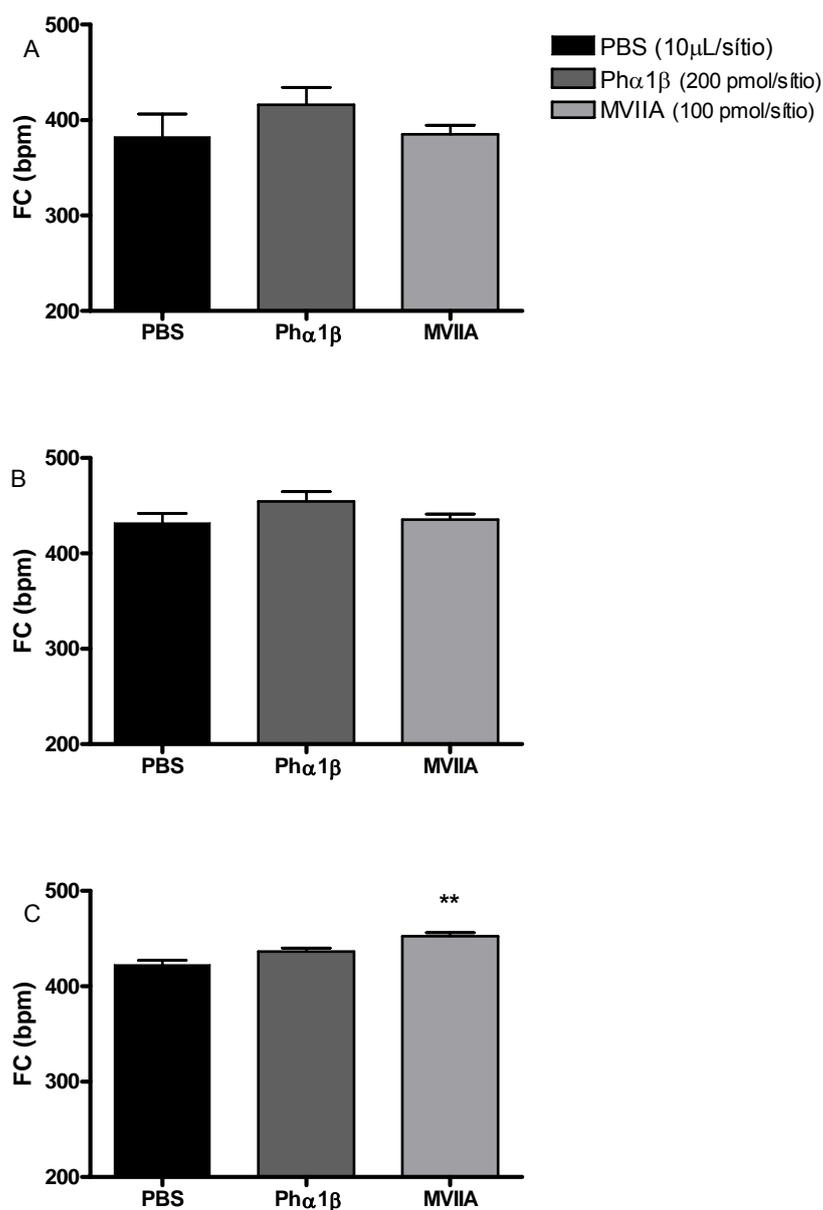
Outra forma de avaliação de efeitos adversos motores foi a investigação da atividade locomotora forçada em camundongos (figura 17). Podemos observar que as doses da  $Ph\alpha 1\beta$  e da  $\omega$ -CTx-MVIIA que causaram antinocicepção não causaram sedação ou redução da performance motora. Isto é, não causaram alteração na latência da 1ª queda (figura 17 A) e nem no número de quedas (figura 17B). No teste do campo aberto, não houve alteração na exploração vertical e horizontal (figura 17C, D). No teste de força de agarre, não houve alteração.



**Figura 17.** Dados expressos como Média  $\pm$  SEM do número de quedas (n=6-8). PBS (veículo, 5  $\mu$ l/i.t.) e Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio, i.t.) ou  $\omega$ -CTx-MVIIA (10 pmol/sítio, i.t.). \*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

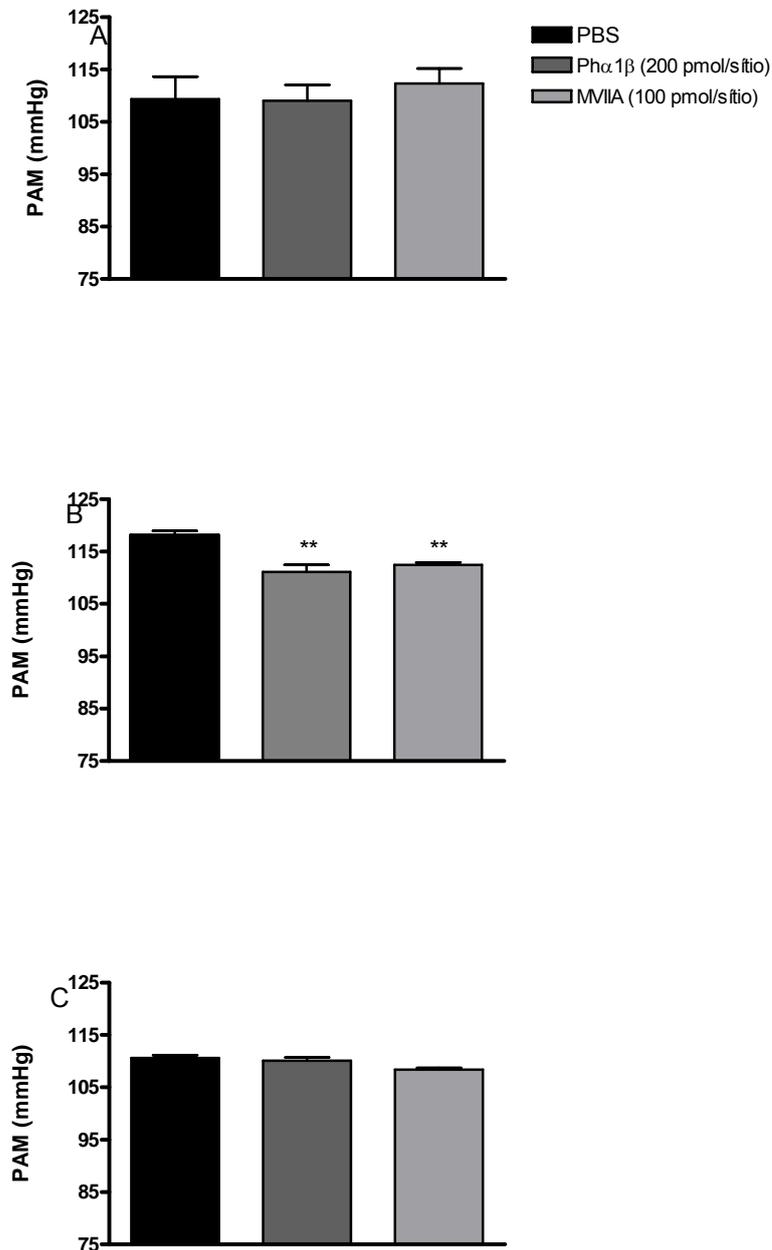
#### **4.10. EFEITOS SOBRE A FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) E PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) EM RATOS**

Trinta minutos após a administração das toxinas  $Ph\alpha 1\beta$  e  $\omega$ -CTx-MVIIA, não houve diminuição na frequência cardíaca dos animais. Já em 3 horas, após a administração a  $\omega$ -CTx-MVIIA causou taquicardia (Figura 18C). Por outro lado, a  $Ph\alpha 1\beta$  não causou nenhuma alteração na frequência cardíaca 3 horas após sua administração.



**Figura 18.** Efeito produzido pela injeção intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (200 pmol/sítio),  $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) na freqüência cardíaca em ratos. A) Basal B) 30 min após a administração dos tratamentos, C) 3h após a administração dos tratamentos. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 3-4 animais. \*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

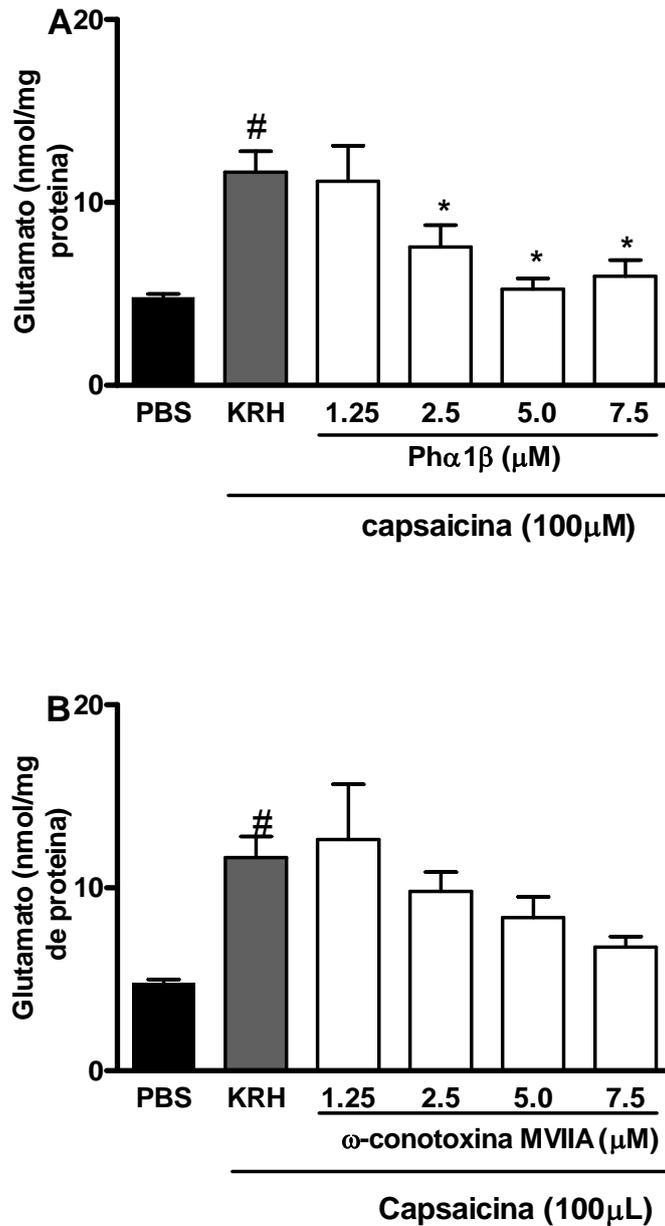
A  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  e a  $\omega$ -CTx-MVIIA causaram redução na pressão arterial média comparado com o basal, depois de 0,5 horas de administração, enquanto que em 3 horas as PAMs dos ratos submetidos à ação das toxinas retornaram aos níveis basais.



**Figura 19.** Efeito produzido pela injeção intratecal da  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (200 pmol/sítio) e  $\omega$ -CTx-MVIIA (100 pmol/sítio) na avaliação da pressão arterial em ratos. A) Basal B) 30 min após a administração dos tratamentos, C) 3h após a administração dos tratamentos. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 3-4 animais. \* $P < 0,05$  representa o nível de significância quando comparado aos animais tratados com PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls).

#### 4.11. EFEITO DAS TOXINAS BLOQUEADORAS DE CANAL DE CÁLCIO NA LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO EM SINAPTOSSOMAS DE RATO INDUZIDA POR CAPSAICINA

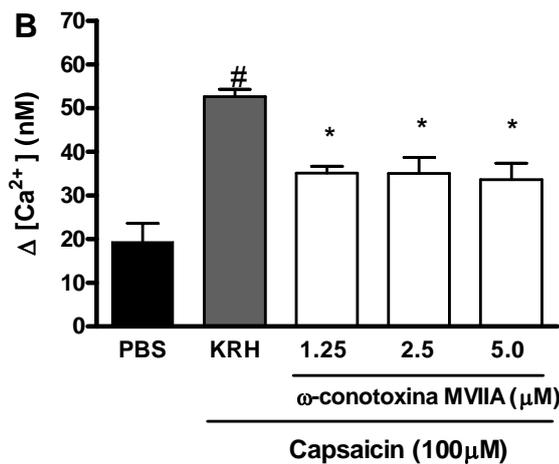
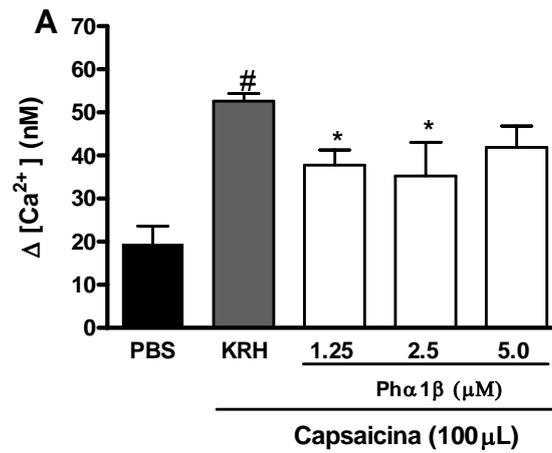
Testes *“in vitro”* verificaram o efeito da  $Ph\alpha 1\beta$  e  $\omega$ -CTx-MVIIA na liberação de glutamato induzida por capsaicina em sinaptossomas de medula espinhal de ratos. Desse modo, a  $Ph\alpha 1\beta$  (2,5-7,5  $\mu$ M) reduziu a liberação de glutamato induzida por capsacina, com  $CI_{50}$  de 2,1 (0,8-5,4)  $\mu$ M e  $I_{max}$  de  $93\pm 8$  % (Figura 20 A). A liberação de glutamato foi diminuída pela  $\omega$ -CTx-MVIIA, com  $CI_{50}$  de 6,2 (1,8-21,0)  $\mu$ M e  $I_{max}$  de  $71\pm 8$  % (Figura 20 B).



**Figura 20.** Efeito bloqueador da liberação de glutamato em sinaptossomas de medula de ratos por Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (1,25-7,5  $\mu$ M, A) e  $\omega$ -CTx-MVIIA (1,25-7,5  $\mu$ M, B) antes da despolarização com capsaicina. Resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3-5 experimentos. \*P<0,05 representa o nível de significância quando comparado com capsaicina (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls). # representa o nível de significância quando comparado PBS com KRH.

#### **4.12. EFEITO DAS TOXINAS BLOQUEADORAS DE CANAL DE CÁLCIO NA MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR EM SINAPTOSSOMAS DE RATO.**

Também foram realizadas medidas do cálcio intrasinaptossomal de medula espinhal de ratos na presença de  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (1,25-5  $\mu\text{M}$ ) e  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  (1,25-5  $\mu\text{M}$ ) com a despolarização de capsaïcina. Desse modo, a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  (1,25  $\mu\text{M}$ ) reduziu a entrada de cálcio com uma inibição de  $46\pm 10\%$  (Figura 21 A) e a  $\omega\text{-CTx-MVIIA}$  (1,25  $\mu\text{M}$ ) produziu uma inibição de  $51\pm 4\%$  (Figura 21 B).



**Figura 21.** Efeito da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  (1.25-5.0  $\mu$ M, A) ou da  $\omega$ -CT $\alpha$ -MVIIA (1.25-5.0  $\mu$ M, B) no aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por capsaicina em sinaptossomas de medula espinal de ratos. Resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3-6 experimentos. \* $P < 0,05$  representa o nível de significância quando comparado às análises com capsaicina (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls). # representa o nível de significância quando comparado PBS com KRH.



A dor é um sintoma que afeta milhares de indivíduos diariamente, sendo comum a muitas patologias. Embora exista uma ampla gama de analgésicos disponíveis no mercado, esses possuem efeitos adversos que acabam por limitar o tratamento terapêutico. Além disto, algumas dores são refratárias aos analgésicos disponíveis (Mendell e Sahenk, 2003). Devido a isso, há uma grande necessidade de fármacos com maior especificidade, menor toxicidade e com indicação para modalidades de dor ainda de difícil tratamento, como as de origem neurogênicas (Millan, 1999). Portanto, é bem conhecido o grande interesse das companhias farmacêuticas no desenvolvimento de compostos mais efetivos e seguros para o tratamento da dor.

Neste estudo investigamos um novo agente para o controle da dor. A toxina  $Ph\alpha 1\beta$  mostrou ser bloqueadora de canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSV) com preferência para inibição de correntes tipo N (Vieira *et al.*, 2005). Os íons cálcio desempenham um papel fundamental na regulação de vários processos biológicos, como o envolvimento na nocicepção. As mudanças transitórias na concentração dos íons cálcio no citoplasma representam um passo crucial na liberação de neurotransmissores e na modulação da excitabilidade da membrana celular (Zamponi e Snutch, 1998).

Vários trabalhos têm demonstrado que bloqueadores de canais de cálcio, como as toxinas animais, apresentam atividade antinociceptiva, em diferentes modelos de nocicepção (Prado, 2001). Há evidências por estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e moleculares indicando que CCSV, especialmente o tipo N, exercem um importante papel no controle de processos nociceptivos na medula espinhal (Altier e Zamponi, 2004).

Os canais de cálcio do tipo P/Q parecem importantes no início, porém não na manutenção da nocicepção. Entretanto, os canais de cálcio do tipo N participam tanto no início quanto na manutenção da nocicepção (Malmberg e Yaksh, 1994). Toxinas que interferem em canais de cálcio podem ser utilizadas para modular a liberação de neurotransmissores em condições patológicas, tais como isquemia cerebral e dor (Mljalich *et al.*, 1995).

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* contém um coquetel de toxinas que afetam os canais iônicos (revisado por Gomez *et al.*, 2002) sendo que a maioria desses peptídeos são bloqueadores de canais de cálcio.

Assim, as toxinas do veneno da *Phoneutria nigriventer* que bloqueiam CCSV (Prado *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 1998) podem oferecer uma nova fonte de drogas para intervenção terapêutica. O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* possui várias frações de polipeptídeos tóxicos, algumas dessas possuindo ações neurotóxicas (Rezende *et al.*, 1991). Um desses componentes, designado, PhTx3, inibe a liberação de glutamato dependente de cálcio e o aumento da concentração de cálcio no citosol em resposta a despolarização por KCl (Prado *et al.*, 1996). A purificação da fração PhTx3 levou a seis isotoxinas designadas TX3-1 a TX3-6 (Cordeiro *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostram que em modelos animais a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  apresenta um número de vantagens quando comparada com a ziconotida, uma toxina clinicamente usada para o tratamento da dor.

A lesão em tecidos periféricos, tais como a pele, vísceras, libera mediadores algôgenos que ativam os nociceptores e os sensibilizam. Essa ativação dos nociceptores na periferia produz mensagens que convergem no corno dorsal da medula espinhal, processando a informação nociceptiva e projetando-a para o córtex

cerebral, causando dor (Woolf e Salter, 2000). No presente estudo, mostramos que um novo antagonista de CCSV, administrado por via intratecal, foi capaz de induzir uma potente antinocicepção em testes clássicos para a medida da dor aguda e crônica. Vários modelos de nocicepção podem ser utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de diferentes compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (Besson, 1999; Le Bars *et al.*, 2001). O modelo de dor induzido pela injeção intraplantar de formalina é uma das ferramentas mais usadas para pesquisa de compostos com ação antinociceptiva (Hunskar e Hole, 1987; Mcnamara *et al.*, 2007). O teste da formalina é usado para examinar possíveis efeitos na nocicepção aguda e persistente, porque é produzido um comportamento bifásico com uma transição da dor aguda (primeira fase) para o estado de dor mais persistente (segunda fase). A primeira fase da nocicepção (fase neurogênica) envolve principalmente a estimulação das fibras aferentes do tipo C, que induzem a um comportamento de dor verificado através da lambida ou mordida na pata injetada (Shibata *et al.*, 1989; Tjolsen *et al.*, 1992) e a segunda fase (fase inflamatória) reflete o estímulo contínuo proveniente da primeira fase (Ji e Woolf, 2001). A entrada de estímulos nociceptivos no SNC ativa as vias descendentes inibitórias analgésicas e comportamentalmente, pode ser observada uma interfase entre cinco a quinze minutos após a aplicação de formalina, período no qual praticamente não é observada resposta nociceptiva (Millan, 2002).

Por outro lado, a liberação de mediadores nociceptivos, durante a primeira fase do teste da formalina, causa extravasamento plasmático, vasodilação de

capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, de mastócitos e de macrófagos. Esse processo, também, induz a liberação de mais mediadores do processo inflamatório, tais como as cininas, prostaglandinas, citocinas, dentre outros (Shibata *et al.*, 1989; Corrêa e Calixto, 1993). Esse conjunto de mediadores inflamatórios produz sensibilização das vias periféricas e centrais de condução da dor, característica da segunda fase da nocicepção (fase inflamatória), observada de quinze a trinta minutos após a aplicação da formalina (Hunskar e Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992). Neste teste, a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  não somente previniu a 2ª fase comportamental, quando administrado antes da injeção de formalina, mas também reverteu a 2ª fase comportamental, desde que administrada depois da injeção de formalina. Estas observações possibilitam que nos estados de dor persistente, a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  possa ser usada não somente para a pré-analgesia, quando a dor pode ser antecipada (p.ex. exemplo na dor pós-cirúrgica), mas também para as situações mais comuns em que o tratamento é procurado, logo depois do estado de dor estar estabelecido (Mathur, 2000). A  $\omega$ -CTx-MVIA pode, também, reverter um quadro de nocicepção já estabelecido, todavia é menos potente e menos eficaz que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  para produzir tal efeito.

A fim de se obter a confirmação do efeito antinociceptivo dos compostos testados, avaliando-os frente a outro tipo de estímulo nocivo, utilizou-se o teste da placa-quente. Este modelo de dor, diferente do teste da formalina, mede a resposta nociceptiva a um breve estímulo nocivo. No teste da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação nociceptiva aguda ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, a centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (Mogil e Adhikari, 1999). Por esse motivo, a placa quente é também um dos modelos mais utilizados no estudo de drogas analgésicas,

principalmente de drogas que possuem ação no SNC, tais como opióides (Ankier, 1974; Lê Bars *et al.*, 2001). A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ou a  $\omega$ -CTx-MVIIA também produziram um potente efeito analgésico no teste da placa quente. A baixa potência da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , comparada com a  $\omega$ -CTx-MVIIA, para produzir analgesia na placa quente, pode ser uma característica interessante, pois o tipo de nocicepção induzida pela placa quente (térmica e aguda), tem uma importante função protetora na preservação dos organismos vivos e seu bloqueio deve ser evitado, em certas circunstâncias.

A necessidade de testar novas drogas em animais, antes da aplicação em humanos, é reconhecida por cientistas do mundo inteiro. A toxicidade varia entre as espécies. Os efeitos adversos em cães são verificados de maneira mais precisa do que em roedores. Já, entre os roedores, as repostas são diferentes, pois os camundongos, apresentam maiores resultados falso-positivos que os ratos. Portanto, os ratos são espécies mais preditivas que camundongos na investigação de novas drogas, sendo mais confiáveis (Greaves, 2004). O estudo, realizado com a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , concorda com esses resultados, apresentando poucos efeitos adversos. Uma vez que a  $\omega$ -CTx-MVIIA apresenta efeitos adversos em humanos, com uma janela terapêutica estreita, estudos comparativos com as toxinas foram realizados em ratos para buscar-se uma maior segurança na resposta antinociceptiva. Assim, verificou-se que ratos tiveram resultados mais claros, comparados a comamundongos.

Estudos *in vitro* são importantes para a investigação de determinados mecanismos de ação para avaliação dessas atividades antinociceptivas. CCSVs tipo-N, na medula espinhal, parecem ter um importante papel, modulando a liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos. De fato, observamos que a administração intratecal da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ou da  $\omega$ -CTx-MVIIA foi capaz de reduzir o

aumento na concentração de glutamato no líquido (FCE), causado pela formalina em ratos, um efeito que poderia estar relacionado com uma inibição do influxo de cálcio e conseqüente liberação de glutamato de terminais espinhais de neurônios sensoriais.

Para confirmar essa hipótese, realizamos estudos com terminais nervosos (sinaptossomas) obtidos de medula espinhal de ratos, pois sinaptossomas são modelos bem reconhecidos e amplamente utilizados no estudo de mecanismos pré-sinápticos envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores. Métodos que utilizam preparações sinaptossomais possuem tanto vantagens como desvantagens, quando comparados a medidas eletrofisiológicas convencionais da transmissão sináptica. O uso de sinaptossomas oferece vantagens como poder controlar melhor o estímulo despolarizante, a concentração de antagonistas peptídicos, além de contornar problemas de medidas de correntes sinápticas, vindas de membranas pós-sinápticas (Turner e Dunlap, 1995).

Observamos que a  $\text{Ph}\alpha 1\beta$  e a  $\omega$ -CTx-MVIIA bloquearam a liberação de glutamato e reduziram amplamente o aumento de cálcio intra-sinaptossomal, evocados por capsaicina, em sinaptossomas de medula espinhal. Como estímulo usado para essa investigação *in vitro* (capsaicina) ativa exclusivamente terminações de neurônios sensoriais que detectam estímulos nocivos (nociceptores) (revisado por Calixto *et al.*, 2005), nossos resultados *in vitro* podem ter uma relação com os achados *in vivo*. Além do mais, nossos resultados concordam com descobertas prévias, demonstrando que canais de cálcio tipo N podem ser preferencialmente associados para a liberação de glutamato na transmissão nociceptiva, no nível da medula espinhal, seguindo a inflamação de formalina (Gruner e Silva, 1994). Então, a diminuição na liberação de neurotransmissores de terminais pré-sinápticos, por

redução do influxo de cálcio, reduziria a atividade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal, reduzindo assim a resposta nociceptiva.

Posteriormente avaliamos os possíveis efeitos antinociceptivos da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em outros modelos de dor, com maior correlação clínica. Devido à alta efetividade de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em inibir a segunda fase do teste da formalina, e somando-se ao fato da grande dificuldade de tratamento da dor inflamatória, julgou-se oportuno iniciar a avaliação da ação desse composto em modelos de dor inflamatória. Para isso foram utilizados o modelo de dor inflamatória crônica, induzida pela aplicação intraplantar de ACF e o modelo de dor inflamatória aguda, provocada por incisão plantar.

A injeção intraplantar de ACF, em animais, constitui um modelo de dor inflamatória que tem similaridade com doenças crônicas humanas, tais como artrite reumatóide e as inflamações severas nas articulações (Tjolsen e Hole, 1997). A injeção de ACF causa alodínia que é mediada pela sensibilização local do nociceptor e por mecanismos sistêmicos neurais (como a sensibilização central) e imunes (como o aumento dos níveis locais e séricos de citocinas) (Woolf *et al.*, 1997). No presente estudo, a injeção intraplantar de ACF produziu uma acentuada alodínia mecânica na pata injetada dos animais, 48 horas após sua administração. O tratamento dos animais com Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , administrada por via intratecal, foi eficaz em inibir a alodínia mecânica induzida por ACF, um efeito que iniciou 1 hora após sua administração e que perdurou até 24 horas, enquanto que a  $\omega$ -CTx-MVIIA perdurou até 6 horas. Pouco é conhecido sobre o papel de canais de cálcio sensíveis à voltagem, nesse modelo de dor inflamatória crônica. Rycroft e colaboradores (2007) estudaram as sinapses entre as fibras aferentes primárias e neurônios do corno dorsal da medula espinhal de ratos, três dias após a indução da inflamação com ACF. Curiosamente, foi observada uma redução na contribuição de correntes de

cálcio tipo N para a transmissão aferente em neurônios positivos para o receptor NK1 para taquicininas, encontrados na lâmina I da medula espinhal, mas não em sinapses da lâmina II ou em sinapses inibitórias (Rycroft et al., 2007). Existem algumas explicações para a eficiente redução na nocicepção induzida por ACF, após o tratamento com Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , mesmo com a redução de correntes N na lâmina I. De fato, é demonstrada que a alodínia, causada por ACF, está correlacionada com a neuroplasticidade em neurônios da lâmina II da medula espinhal (Martin *et al.*, 1999) e que existe um aumento na expressão de receptores NK1, na lâmina II da medula espinhal três dias após a injeção de adjuvante (Honore et al., 1999).

O modelo de dor induzida por incisão plantar, é uma ferramenta amplamente utilizada para estudo experimental da dor pós-operatória, devido às similaridades com a dor pós-operatória em humanos (Brennan *et al.*, 1996; Pogatzki e Raja, 2003). Além disso, o perfil farmacológico de diferentes classes de analgésicos, no modelo de dor incisional, parece ser muito similar ao obtido na clínica. A administração oral de antiinflamatórios não-esteroides (AINEs), como a indometacina ou de inibidores seletivos da COX-2, reduzem a hiperalgesia e a alodínia mecânica induzida por incisão plantar em ratos (Whiteside *et al.*, 2004). No presente estudo, o procedimento incisional na superfície plantar da pata traseira dos animais, provocou uma acentuada alodínia mecânica. O tratamento dos animais com Ph $\alpha$ 1 $\beta$  e a  $\omega$ -CTx-MVIA diminui a alodínia mecânica induzida por incisão, quando administrados antes ou após o procedimento incisional. Um dado interessante obtido é o fato de que a administração intratecal dessas toxinas, produziu efeito profilático (quando administrados antes do procedimento incisional) e terapêutico (quando administrados após o procedimento incisional), com similar eficácia antinociceptiva. Entretanto, o efeito anti-alodínico da  $\omega$ -CTx-MVIA foi

menos duradouro. Nossos resultados concordam com dados prévios da literatura que demonstram que a administração intratecal de ziconotida reduz a alodínia mecânica pós-incisional em ratos e a dor pós-cirúrgica em humanos (Wang *et al.*, 2000; Atanassoff *et al.*, 2000).

Outro tipo de dor investigada foi a dor neuropática, que, é produzida por lesão em nervos (Bennett, 1999b; Hogan, 2002). É descrito na literatura que após a lesão nervosa periférica, ocorre um aumento na concentração citosólica de cálcio, nos neurônios da medula espinhal. Esse influxo de cálcio ativa a cálcio-calmodulina quinase II, que fosforila vários receptores presentes nos neurônios da medula, causando uma plasticidade neuronal, contribuindo para a sensibilização central (Fang *et al.*, 2002). No presente estudo, a ligação parcial do nervo ciático, em camundongos, provocou a redução do limiar nociceptivo (alodínia mecânica). As toxinas mostraram uma atividade anti-alodínica prolongada, permanecendo esse efeito até 4 horas após a administração de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ . Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios, cujos bloqueadores de canais de cálcio tipo N, reduziram a alodínia mecânica, causada por ligação de nervos espinhais em ratos (de Chaplan *et al.*, 1994) e a dor neuropática, de diversas etiologias em seres humanos (Wermeling *et al.*, 2006). Nosso achados são importantes, pois os analgésicos tradicionais têm limitado valor terapêutico no tratamento da dor neuropática e podem, ao contrário, representar um risco para o paciente, devido a seus efeitos colaterais (Woolf e Mannion, 1999)

A fim de eliminar a possibilidade de que Ph $\alpha$ 1 $\beta$  ou a  $\omega$ -CTx-MVIIA, avaliadas no presente estudo, possam estar provocando alterações no comportamento dos animais, que poderiam ser confundidos com antinocicepção, foram avaliados vários efeitos adversos em roedores.

Os resultados obtidos em camundongos demonstraram que nenhum dos compostos investigados, nas doses que causam antinocicepção, provocaram dano motor, quando avaliados pela locomoção forçada, no teste da locomoção forçada no cilindro giratório (*rotarod*) ou alteração na locomoção espontânea, no teste do campo aberto (*open-field*). Assim, o efeito antinociceptivo observado pelas toxinas parece não estar associado diretamente a alterações motoras ou sedativas em camundongos.

Por outro lado, foi previamente mostrado que a injeção intratecal de  $\omega$ -conotoxinas em ratos causam serpenteado de cauda com tremor corporal, sugerindo alterações motoras relacionadas ao cerebelo (Malmberg e Yaksh, 1994; Smith *et al.*, 2002)). No presente estudo, confirmamos esses dados da literatura e demonstramos que não somente a  $\omega$ -CTx-MVIIA, mas também a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , produzem alterações motoras em ratos, verificadas por pelo menos 20 minutos, após administradas por via intratecal.

Diferente dos ratos, movimentos de serpenteado de cauda e tremor do corpo puderam ser raramente detectados em camundongos, sugerindo que essa espécie não é muito adequada para verificar efeitos adversos de toxinas bloqueadoras de CCSV.

Como a  $\omega$ -CTx-MVIIA pode produzir em humanos efeitos adversos, esses resultados sugerem que ratos são mais sensíveis e possuem mais propriedades para detectar efeitos adversos de bloqueadores de canais de cálcio, injetados intratecalmente. Isso é evidenciado, já que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  é capaz de produzir máxima analgesia, com doses em que não induz efeitos adversos. Em contraste, a analgesia máxima, induzida por  $\omega$ -CTx-MVIIA, pode ser somente observada em doses que causaram severos efeitos adversos.

Essas descobertas sugerem que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  tem uma maior janela terapêutica comparada com a  $\omega$ -CTx-MVIIA, podendo ser superior a eficácia para o alívio da dor, sendo possível de ser usada na clínica. Entretanto, mais testes pré-clínicos e toxicológicos, podem ser conduzidos para o uso de Ph $\alpha$ 1 $\beta$  em humanos. Em relação a isso, fomos capazes de obter uma toxina funcional recombinante Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , capaz de produzir uma resposta similar à toxina nativa, podendo facilitar futuros estudos pré-clínicos e clínicos.

O melhor perfil analgésico de Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , comparada com a  $\omega$ -CTx-MVIIA (baixa potência em dor fisiológica aguda, maior potência na dor patológica persistente e maior janela terapêutica) pode ser explicado por vários fatores, incluindo diferentes afinidades de toxinas para os estados ativadas ou variantes de *splicing* de canais de cálcio sensíveis à voltagem tipo-N, ligando em outros tipos de CCSVs (Altier *et al.*, 2007). Como nem todos CCSV-N são equivalentes na nocicepção, variantes de *splicing* específicas para esses canais, podem ser estratégias no alvo de novas drogas para o tratamento da dor. Bell e colaboradores (2004) identificaram uma nova variante de *splicing* para CCSV-N em neurônios nociceptivos. A expressão dessa nova variante possibilita o alvo de específicos bloqueadores de canais N em inibir seletivamente a transmissão de sinais da dor mediada por canais de cálcio. Estudos realizados por Altier e colaboradores (2007) demonstram que diferentes isoformas de splice de CCSV-N medeiam funções fisiológicas distintas, controlando diferentes vias nociceptivas, durante a hiperalgesia, na transmissão do estímulo térmico e mecânico.

As diferentes afinidades de toxinas para os estados ativados dos canais, podem ser fundamentais em suas ações.

Diferente da  $\omega$ -CTx-MVIIA que possui uma janela de seletividade de pelo menos 100 vezes para o canal N em relação aos outros CCSV, a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  também pode atuar em outros tipos de CCSVs, envolvidos na transmissão da dor na medula espinhal, tais como canais P/Q, R e L, em concentrações próximas que bloqueiam CCSV-N, podendo facilitar suas ações analgésicas. Além disso, como os estudos anteriores eletrofisiológicos, foram somente focados em CCSVs, não podemos excluir o papel de canais iônicos. Como as toxinas são bloqueadoras de CCSV-N e apresentaram diferença na eficácia e potência em testes de nocicepção, outros canais iônicos poderiam estar envolvidos, como os canais catiônicos não- seletivos (CCNS), entre eles receptores de potencial transitório (TRP), canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC) e receptores para glutamato ionotrópicos . CCNS possuem ampla expressão, e ativam correntes produzindo uma despolarização persistente da membrana, capaz de envolver uma variedade de processos neuronais, como a transmissão da dor. Várias toxinas isoladas de veneno de aranhas possuem ação antinociceptiva bloqueando esses canais (Mazzuca *et al.*, 2007)

Uma das famílias dos CCNS são os TRPs, permeáveis ao cálcio. São expressos principalmente numa subpopulação de pequenos neurônios de DRG com fibras C não-mielinizadas, ativados por capsaicina, temperaturas maiores que 43°C, prótons. Esses canais estão envolvidos no processo de dor inflamatória e neuropática..

Outros canais iônicos, são os ASIC, sendo esses ativados por baixo pH, encontrados em neurônios sensíveis primários. Apresentam-se numa variedade de sensações de dor. Um exemplo de bloqueador desse canal é o peptídeo isolado do veneno da tarântula (PcTx1), um candidato a aplicações terapêuticas, que libera

opióides endógenos, possuindo uma boa eficácia na dor. A toxina Ph $\alpha$ 1 $\beta$  poderia estar agindo como um bloqueador desse canal, liberando meta-encefalinas no fluído cérebro espinal, atuando em receptores opióides, podendo explicar seu efeito duradouro na nocicepção.

Também associados à nocicepção, encontram-se os receptores ionotrópicos de glutamato, n-metil-aspartato (NMDA), família de nociceptores ativados por glutamato e aspartato, induzindo a estimulação nociceptiva. Tem-se demonstrado que agonistas de NMDA, quando administrados em roedores apresentam comportamento de dor. E que antagonistas de NMDA produzem respostas analgésicas (Corderre e Melzack, 1992). Esse receptor está envolvido, principalmente, na dor crônica, utilizando-se terapeuticamente hoje, a Ketamina (antagonista NMDA), no tratamento de neuropatias (Nihon Hansenhyo, 2008).

Mais estudos devem ser realizados para elucidar a ação da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  com esses canais iônicos.

Um dos principais efeitos adversos causados pela administração intratecal de ziconotida em humanos é a hipotensão (Pen e Paice, 2000). No presente estudo, verificamos que tanto a Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , quanto a  $\omega$ -CTx-MVIIA, reduziram a pressão arterial média, quando verificada 30 minutos após a administração via intratecal. Porém, diferente da Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a  $\omega$ -CTx-MVIIA induz um aumento na frequência cardíaca e tem uma tendência para reduzir a pressão arterial, 3 horas após sua administração. Nossos dados contrastam com estudos prévios em que a administração intracerebroventricular de ziconotida, aumentou a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos (Bowersox *et al.*, 1992). Por outro lado, a administração de vários bloqueadores de canais de cálcio tipo N, por via intratecal, não alterou a pressão arterial em coelhos (Wright *et al.*, 2000). Porém, tanto em ratos, quanto em coelhos,

a injeção endovenosa de ziconotida causa hipotensão (Bowersox *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2000). Dessa forma, o efeito da ziconotida, na pressão arterial, parece depender da sua via de administração. O efeito hipotensivo das toxinas bloqueadoras de canais do tipo N é relacionado a um efeito simpaticolítico, especialmente em neurônios pré-ganglionares, possivelmente pela incapacidade de liberar transmissores. No presente estudo, demonstrou-se que tanto a toxina nativa, quanto a recombinante, tem efeito analgésico em modelos de dor em roedores, sugerindo que a Ph $\alpha$ 1 $\beta$  tem um potencial para ser usado como uma droga no controle da dor patológica persistente.



Diante dos nossos resultados é possível concluir que:

-A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  produz efeito antinociceptivo prolongado em um modelo de dor aguda causada por estímulo térmico, sem produzir alteração locomotora detectável;

-A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  produz efeito antinociceptivo em um modelo de dor persistente causada por estímulo químico, sendo capaz tanto de prevenir como reduzir a nocicepção;

-O efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  não está relacionado com efeitos adversos em roedores;

- A Ph $\alpha$ 1 $\beta$  possui efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção inflamatória aguda, induzida por incisão na pata em camundongos, na nocicepção inflamatória crônica, induzida por ACF em ratos e na nocicepção neuropática crônica em camundongos;

-O efeito antinociceptivo da Ph $\alpha$ 1 $\beta$  está relacionado com a redução na liberação de glutamato, através da diminuição do influxo de cálcio;

-A toxina recombinante reproduziu o mesmo efeito antinociceptivo da toxina nativa.

---

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Altier C, Zamponi GW (2004). Targeting Ca<sup>2+</sup> channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trend Pharmacol Sci* **25**:465-469.

Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA, Rhian ME, Dickenson AH, Lipscombe D, Vergnolle N, Zamponi GW (2007). Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J. Neurosc.* **27**:6363-6373.

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

Ankier SI (1974). New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur. J. Pharmacol.* **27**(1):1-4.

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

Atanassoff PG, Hartmannsgruber MW, Thrasher J, Wermeling D, Longton W, Gaeta R, Singh T, Mayo M, McGuire D, Luther RR (2000). Ziconotide, a new N-

type calcium channel blocker, administered intrathecally for acute postoperative pain. *Reg Anesth Pain Med* **25**:274-278.

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

Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D (2004). Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. *Neuron* **41**:127-138.

Benneett GJ, Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**:87-107.

Bennett, GJ (1999). Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*: 967737-967738.

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.

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

Bortalanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle MF, Yunes RA, Calixto JB (2002). Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **453**: 203-208.

Bowersox SS, ET al Singh T, Nadasdi L, Zukowska-Grojec Z, Valentino K, Hoffman BB (1992). Cardiovascular effects of omega-conopeptides in conscious rats: mechanisms of action. *J Cardiovasc Pharmacol.* **20**:756-764.

Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX, Luther RR (1996). Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:1243-1249.

Brennan TJ; Vandermeulen, EP; Gebhart G. (1996). Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* **64**:491-3.

Brennan F; Carr DB; Cousins M. (2007). Pain management: A fundamental human right. *Anesth. Analg* **105**:205-21.

Bruno A. (2001). A Abordagem clínica na dor crônica. *Rev. Bras. Med.* **58**:1-10.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J. et al (2001). Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anesth.* **14**:519–526.

Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* **106**:179-208.

Carlton SM, Zhou S, Cogeshall RE (1996). Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res.* **734**:103-108.

Carvalho MMJ (1999). *Dor, um estudo multidisciplinar*. São Paulo: Summus Editorial.

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 and Cipolla-Neto J (1998). Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch.* **436**:545-52.

Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:521-555.

Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL (1994). Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 1117–1123.

Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL (1997). Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**:829 - 838.

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 guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **184**:5 - 8.

Coderre TJ, Melzack R (1992). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.* **12**:3665-3670.

Cordeiro N, de Figueiredo SG, Valentim Ado C, Diniz CR, von Eickstedt VR, Gilroy J, Richardson M (1993). Purification and amino acid sequences of six Tx3 type

neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon* **31**:35-42.

Corrêa CR, Calixto JB (1993). Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **110**:193-8.

Costa SK, Moreno RA, Esquisatto LC, Juliano L, Brain SD, De Nucci, Antunes E. (1994). Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neuroscience Lett.* **318**:158-162.

Cotran C, Kumar T, Robbins A (1994). *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. **4**:35-71.

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

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

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*. *FEBS Lett* **263**:251-253.

Dixon WJ (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**:441-462.

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.

Dubuisson D, Dennis SG (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4**: 61-174.

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

Evans RM, Zamponi GW (2006). Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels-integration centers for neuronal signaling pathways. *Trends Neurosci.* **29**:617-624.

Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-hajj SD, Waxman SG, Lawson SN (2002). The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Nav 1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J. Neurosci.* **22**:7425-7433.

Fatt P, Katz B (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* **120**:171-204.

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.

Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM (2006). Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M. (eds). **Walls and Melzack's: Textbook of Pain** 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone cap 7:125-42.

Finnerup, NB, Jensen, TS (2004). Spinal Cord Injury Pain - Mechanisms and Treatment. *Eur. J. Neurol.* **11**:73 - 82.

Fowler SC, Zarconi TJ, Vorontsova E, Chen R (2002). Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* **20**:309-321.

Fürst S (1998). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* **48**:129-141.

Ganong W (1988). The stress response: a dynamic overview. *Hosp. Prac.* **23**:155-190.

Gomez RS, Casali TA, Romano-Silva MA, Cordeiro MN, Diniz CR, Moraes-Santos T, Prado MA, Gomez MV (1995). The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neurosci. Lett.* **196**:131-133.

Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C and 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.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. **260**:3440-3450.

Gruner W, Silva LR (1994). Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. J. Neurosci. **14**:2800-2808.

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

Guyton EH (1997). Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

Guyton AC (1992). Sensações somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In: Guyton AC. Tratado de fisiologia médica. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 458-467.

Hagiwara S, Ozawa S, Sand O (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. J. Gen. Physiol. **65**:617-644.

Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG (2003). Upregulation of sodium channel Nav 1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. J. Neurosci. **23**:8881-8892.

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

Hill RG (2001). Molecular basis for the perception of pain. Trends Neurosci. **7**:282 - 92.

Hogan Q (2002). Animal pain model. Reg. Anesth. Pain Med. **27**:385-401.

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

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

Holden JE, Pizzi JA (2003). The Challenge of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**:935-48.

Honore P, Menning PM, Rogers SD, Nichols ML, Basbaum AI, Besson JM, Mantyh PW (1999). Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *J Neurosci.* **19**:7670-7678.

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 in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30**:103-14.

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

Jackson DL, Graff CB, Richardson, JD. et al (1995). Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* **284**:321-325.

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

Ji RR, Strichartz G (2004). Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. *Science* **252**:1-19.

Jones SL (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.

Kalopothakis E, Penaforte CL, Beirão PSL, Romano-Silva MA., Cruz JS, Prado MAM, Guimarães PEM, Gomez MV and 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*. São Paulo: Manole. p. 73-491.

Khasar, S.G., Mccarter, G., Levine, J.D. (1999). Epinephrine produces a betaadrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J. Neurophysiol.* **81**:1104 - 1112.

Kingery WS (1997). A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* **73**:123 – 139.

Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Kaneko S, Satoh M, Takagi H (1985). Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. *Brain res.* **359**:177-182.

Kushmerick C, Kalapothakis E, Beirao PS, Penaforte CL, Prado VF, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MA (1999). *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH3 cells. *J. Neurochem.* **72**:1472-1481.

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

Leão RM, Cruz JS, Diniz CR, Cordeiro MN, Beirão PS (2000). Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-*Phoneutria* nigriverter Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology* **39**:1756-1767.

Levine JD, Taiwo Y (1994). Inflammatory Pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. *Textbook of Pain*, 3a Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 45 - 56.

Lewis RJ, Nielsen KJ, Craik DJ, Loughnan ML, Adams DA, Sharpe IA, Luchian T, Adams DJ, Bond T, Thomas L, Jones A, Matheson JL, Drinkwater R, Andrews PR, Alewood PF (2000). Novel omega-conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* **275**:35335-35344.

Li X, Eisenach JC (2001). Alpha-2A adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:939-944.

Liu H, Wang H, Sheng M, et al (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.

Loeser JD (2000). Pain and suffering. *Clin. J. Pain* **16**:S2 - S6.

Lonart G, Johnson KM. (1995). Characterization of nitric oxide generator-induced hippocampal [3H] norepinefrine release. I. The role of glutamate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**:7-13.

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

Machado A (2000). *Neuroanatomia Funcional*. São Paulo: Atheneu, p. 101-130.

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

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

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

Malmberg AB, 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.

Malmberg AB, Yaksh TL (1995). Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J. Neurosci.* **15**:2768-2776.

Malmberg AB, Yaksh TL(1995). Effect of continuous intrathecal infusion of  $\omega$ -conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain* **60**:83-90.

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

Martin WJ, Liu H, Wang H, Malmberg AB, Basbaum AI (1999). Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C $\gamma$  immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* **88**:1267-1274.

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.

Mathur SV (2000). Ziconotide: A new pharmacological class of drug for the management of pain. *Semin. Anaesth.* **19**:67-75.

Mazucca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N, Blondeaul N, Escoubas P, Ge'lot A, Cupo A, Zimmer A, Zimmer AM, Eschalier A, Lazdunski M. (2007). A tarantula peptide against pain ASIC1 a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* **10**:943-945.

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.

Mestre C, Pelissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **32**:197-200.

Miljanich GP, Ramachandran J (1995). Antagonists of neuronal calcium channel: structure, function, and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**:707-734.

Millan MJ (1997). The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson A, Besson J-M. *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer Verlag.

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

Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* **66**:3474-555.

Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz 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.

Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosci. Meth.* **194**: 99-109.

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

Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J (1987). Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* **49**:50-57.

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

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

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

Perkins NM, Tracey DJ (2000). Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience* **101**:745 - 757.

Pinheiro AC, Gomez RS, Massensini AR, Cordeiro MN, Richardson M, Romano-Silva MA, Prado MA, De Marco L, Gomez MV (2006). Neuroprotective effect on brain 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.

Poternoy RK, Lesage P (1999). Management of cancer pain. *Lancet* **353**:1695-1700.

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

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

Prado VF, Martins Silva C, de Castro BN, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Kuan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosin C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izequierdo I, Caron MG, Prado MA (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* **51**:601-612.

Quintao 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, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology* **50**:614 - 620.

Reis HJ, Prado, MAM, Kalapothakis, E, Coreiro, MN, Diniz, CR, De Marco, LA, Gomez, MV and 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.

Rezende LJ, Cordeiro MN, Oliveira EB and Diniz CR (1991). Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **29**:1225-1233.

Romano-Silva, M. A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A. M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M. N., and Brammer, M. J. (1993). Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for  $Ca^{2+}$  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**:123-133.

Rycroft BK, Vikman KS, Christie MJ (2007). Inflammation reduces the contribution of N-type calcium channels to primary afferent synaptic transmission onto NK1 receptor-positive lamina I neurons in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* **580**:883-94

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.

Scheidt C, Santos AR, Ferreira J, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB (2002). Evidence for the involvement of glutamatergic receptor in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology* **43**:340-7.

Scott RH, Dolphin AC, Bindokas VP, Adams ME (1990). Inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> 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 the cognitive-behavioral model. Beh. Res. Ther. **39**:787-800.

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

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain **38**:347-52.

Smith MT, Cabot PJ, Boss FB, Robertson AD, Lewis RJ (2002). The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intratecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. Pain **96**:119-127.

Snutch TP, Sutton KG, Zamponi GW (2001). Voltage-dependent calcium channels-beyond dihydropyridine antagonists. Curr. Opin. Pharmacol. **1**:11-6.

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

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

Tjolsen A, Hole K. (1997). Animal models of analgesia. In: Dlickenson A, Besson JM (eds). *The Pharmacology of Pain*, Germany: Springer, Berlin 1-20.

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

Turner TJ, Dunlap K (1995) Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology* **34**:1469-1478.

Vanegas H, Schaible HG (2001). Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog in Neurobiol* **64**:327-363.

Vanegas H, Schaible HG (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<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>] (i) and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochem Int* **42**:277-282.

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

Wang YX, Pettus M, Gao D, Phillips C, Scott Bowersox S (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.

Wermeling DP, Berger JR (2006). Ziconotide infusion for severe chronic pain: case series of patients with neuropathic pain. *Pharmacotherapy*. **26**:395-402.

Wen L, Yang S, Zhou WX, Zhang YX, Zhou XW, Huang PT (2005). Involvement of N-type calcium channels in pain and antinociception. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. **36**:23-28.

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 nervous system. *Adv Second Messenger phosphoprotein Res*. **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.

Winqvist RJ, Pan JQ, Gribkoff VK (2005). Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. *Biochem. Pharmacol.* **70**:489-499.

Woolf C J, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S (1997). Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Br. J. Pharmacol.* **121**:417-24.

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

Woolf CJ, Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**:1765 - 1769.

Wright ,Robertson AD, Whorlow SL, Angus JA (2000). Cardiovascular and autonomic effects of omega-conotoxins MVIIA and CVID in conscious rabbits and isolated tissue assays. *Br. J. Pharmacol.* **131**:1325-1336.

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.

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

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Tanabe T, Schwartz TL, Tsien RW (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**:1075-1088.

Zhang J, Hoffer C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S (2003). Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur. J. Neurosci.***17**:2750-2754.

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

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

---

## **9- ANEXOS**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)