



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – UECE**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ALINE OLIVEIRA VITOR**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM COMPONENTE BIOATIVO PRESENTE  
EM VENENO DE SAPO *Rhinella jimi* SOBRE DOR NEUROPÁTICA  
EXPERIMENTAL**

**Fortaleza**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ALINE OLIVEIRA VITOR**

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM COMPONENTE BOIATIVO PRESENTE  
EM VENENO DE SAPO *Rhinella jimi* SOBRE DOR NEUROPÁTICA  
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico  
em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Estadual do Ceará como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes  
Carvalho

Fortaleza  
2009

**ALINE OLIVEIRA VITOR**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM COMPONENTE BOIATIVO PRESENTE  
EM VENENO DE SAPO *Rhinella jimi* SOBRE DOR NEUROPÁTICA  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho - Orientador  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Bruno Andrade Cardi  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará - UFC

“A mente que se abre a uma idéia jamais  
retorna ao tamanho original”

Albert Einstein

A Deus, pela realização deste momento.

Aos meus pais e irmãos pelo estímulo e  
confiança em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte de todo amor, por mais essa vitória concedida ao seu lado;

Ao Professor Krishnamurti de Moraes Carvalho pela confiança, amizade, por seus incentivos constantes e orientação segura no decorrer da dissertação;

Ao Professor Bruno Andrade Cardi pela prestimosa colaboração e apoio na elaboração da dissertação com suas valiosa ajuda, sugestões e conselhos;

À Professora Silvânia Maria Mendes Vasconcelos que prontamente aceitou o convite para participar da Banca Examinadora, enriquecendo-a;

Ao Edson Lopes da Ponte pela ajuda durante toda a realização deste trabalho;

À amiga Paula Matias Soares pela inestimável e fundamental colaboração neste trabalho, e por sua dedicação, cumplicidade e amizade conquistada ao longo desta jornada;

A amiga Kerly pela amizade incondicional em momentos de alegria e tristeza;

Aos bolsistas e amigos Roquelina Sabóia e Felipe Frota, sem os quais não teria realizado meus trabalhos experimentais;

A todos os colegas e amigos de laboratório de Farmacologia Molecular e Toxinologia: Jones, Carol, Rebouças, Raquel e outros, pela ajuda prestada durante os experimentos e pelos maravilhosos momentos de descontração vividos durante esse período;

À Rosa Germana pela amizade e por toda ajuda durante o período de desenvolvimento dos experimentos;

Aos colegas de Mestrado e agora amigos, pelo companheirismo e pelos momentos de alegria que passamos juntos.

A todos os professores do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos a mim emitidos;

As secretárias Écila e Lindalva e a todos os funcionários do Mestrado pela colaboração prestada durante esse período;

Aos animais que doaram sua vida para o progresso da ciência;

A toda a minha FAMÍLIA e AMIGOS, que estiveram presentes e solidários na realização deste trabalho;

À FUNCAP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**Atividade Antinociceptiva de um componente bioativo presente em veneno de sapo *Rhinella jimi* sobre dor neuropática experimental. ALINE OLIVEIRA VITOR. Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho. Dissertação de Mestrado. Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, UECE, 2009.**

Estudos têm sido desenvolvidos na busca de novas substâncias analgésicas que proporcionem um tratamento eficaz no alívio da dor neuropática. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o efeito antinociceptivo de um componente bioativo isolado do veneno de sapo *Rhinella jimi* em modelo animal de dor neuropática induzido por constrição crônica do nervo ciático. O efeito antinociceptivo do componente bioativo foi avaliado na alodinia mecânica pelo teste de estimulação tátil (von Frey), e na hiperalgesia mecânica pelo teste de compressão da pata (Randall-Selitto). Foi observado que na alodinia o componente bioativo administrado por via intraperitoneal apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $14,05 \pm 0,86$  g) nas doses de 5,0 ( $31,68 \pm 2,06$  g) e 10,0 mg/kg ( $38,81 \pm 1,51$  g) e nas doses de 20 ( $24,84 \pm 0,77$ ) e 40 mg/kg ( $32,50 \pm 1,84$  g) na via oral. Com relação à hiperalgesia, o componente apresentou efeito antinociceptivo em todas as doses 1,0 ( $350,02 \pm 19,16$  g), 2,5 ( $498,30 \pm 30,79$  g), 5,0 ( $637,90 \pm 29,93$  g) e 10 mg/kg ( $648,01 \pm 42,71$ ) na via intraperitoneal e nas doses de 20 ( $435,00 \pm 18,77$  g) e 40 mg/kg ( $595,02 \pm 34,67$ ) por via oral quando comparado ao controle ( $175,01 \pm 17,73$  g). A duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo foi de aproximadamente 120 min tanto na alodinia quanto hiperalgesia. Quando comparado com fármacos usados no tratamento da dor neuropática, o componente bioativo apresentou potência semelhante à morfina e superior a carbamazepina, amitriptilina e diclofenaco sódico na alodinia mecânica. Na hiperalgesia o componente bioativo também apresentou potencia superior a carbamazepina, amitriptilina, além da morfina e codeína. Foi verificado também que naloxona (5mg/kg-i.p.) bloqueou o efeito antinociceptivo do componente bioativo, indicando uma provável participação da via opióide no seu mecanismo de ação. Conclui-se assim que o componente bioativo apresentou atividade antinociceptiva para alodinia e hiperalgesia mecânicas, podendo servir como um modelo para o desenvolvimento de novos analgésicos com potencial terapêutico no controle da dor neuropática humana.

Palavras-chaves: *Rhinella jimi*, alodinia, hiperalgesia e antinocicepção

## ABSTRACT

**Antinociceptive effect of a bioactive component isolated from toad venom *Rhinella jimi* in animal model of neuropathic pain. ALINE OLIVEIRA VITOR. Supervisor: Prof<sup>o</sup>. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho. Master's Dissertation. Course of Academic Master in Physiology Science. Superior Institute of Biomedics Science, UECE, 2009.**

Studies have been developed in search of new analgesic substances that provide an effective treatment for the relief of neuropathic pain. The objective of this study was to investigate the antinociceptive effect of a bioactive component isolated from toad venom *Rhinella jimi* in animal model of neuropathic pain induced by chronic constriction sciatic nerve. Antinociceptive effect the bioactive component was evaluated by the mechanical allodynia in the test tactile stimulation (von Frey) and mechanical hyperalgesia in the compression test of the paw (Randall-Selitto). It was observed that the bioactive component allodynia administered intraperitoneally showed a significant difference compared to control ( $14.05 \pm 0.86$  g) at doses of 5.0 ( $31.68 \pm 2.06$  g) and 10.0 mg / kg ( $38.81 \pm 1.51$  g) and at doses of 20 ( $24.84 \pm 0.77$ ) and 40 mg / kg ( $32.50 \pm 1.84$  g) in the oral route. With respect to hyperalgesia, the component showed antinociceptive effect at all doses 1.0 ( $350.02 \pm 19.16$  g), 2.5 ( $498.30 \pm 30.79$  g), 5.0 ( $637.90 \pm 29.93$  g) and 10 mg / kg ( $648.01 \pm 42.71$ ) intraperitoneally and doses of 20 ( $435.00 \pm 18.77$  g) and 40 mg / kg ( $595.02 \pm 34.67$  g) orally when compared with controls ( $175.01 \pm 17.73$  g). The duration of the analgesic effect of the bioactive component was approximately 120 min in both allodynia and hyperalgesia. When compared with drugs used to treat neuropathic pain, the bioactive component showed similar potency to morphine and superior to carbamazepine, amitriptyline and diclofenac on mechanical allodynia. In hyperalgesia bioactive component also showed superior potency to carbamazepine, amitriptyline, and morphine and codeine. It was also found that naloxone (5mg/kg – i.p) was able to block the antinociceptive effect of the bioactive component, indicating a probable involvement of opioid via its mechanism of action. It is therefore concluded that the bioactive component showed antinociceptive activity for mechanical allodynia and hyperalgesia, which may serve as a model for the development of new analgesics with therapeutic potential in the control of human neuropathic pain.

**Keywords:** *Rhinella jimi*, allodynia, hyperalgesia and antinociception.

## LISTA DE FIGURAS

Figura1	<i>Rhinella jimi</i> – “Sapo- Cururu”	32
Figura2	Extração do veneno de <i>Rhinella jimi</i> por compressão das glândulas parotóides	40
Figura 3A	Cromatógrafo Líquido da Alta Eficiência	41
Figura 3B	Perfil de eluição do veneno das glândulas parotóides do sapo <i>Rhinella jimi</i>	41
Figura 4	Constricção crônica do nervo ciático	43
Figura 5	Teste de estimulação tátil (von Frey)	44
Figura 6	Teste de compressão da pata (Randall-Selitto)	45
Figura 7	Protocolo dos tratamentos experimentais	47
Figura 8	Alodinia mecânica induzida por constricção crônica do nervo ciático	48
Figura 9	Hiperalgisia mecânica induzida por constricção crônica do nervo ciático	49
Figura 10	Comparação do limiar de dor nos animais antes e depois da constricção crônica do nervo ciático na alodinia mecânica	50
Figura 11	Comparação do limiar de dor nos animais antes e depois da constricção crônica do nervo ciático na hiperalgisia mecânica	50
Figura 12	Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na alodinia mecânica	52
Figura 13	Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na alodinia mecânica	53
Figura 14	Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na alodinia mecânica	54
Figura 15	Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na alodinia mecânica	55
Figura 16	Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na hiperalgisia mecânica	56
Figura 17	Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na hiperalgisia mecânica	57
Figura 18	Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na hiperalgisia mecânica	58
Figura 19	Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na hiperalgisia mecânica	59
Figura 20	Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo com drogas utilizadas no tratamento de dor neuropática na alodinia mecânica	60
Figura 21	Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo	61

- com drogas utilizadas no tratamento de dor neuropática na  
hiperalgesia mecânica
- Figura 22 Ação da naloxona sobre o efeito antinociceptivo do componente 62  
e bioativo na alodinia mecânica
- Figura 23 Ação da naloxona sobre o efeito antinociceptivo do componente 63  
bioativo na hiperalgesia mecânica
- 

## LISTA DE ABREVIATURAS

- °C - graus Célsius
- 5-HT – serotonina
- AMPc – adenosina monofosfato cíclico
- BRVMR- Bulbo raquidiano ventromedial rostral
- Ca<sup>++</sup> - cálcio
- CCK – colecistocinina
- CGRP – peptídeo geneticamente relacionado com a calcitocina
- cm - centímetro
- DMSO - dimetil sulfóxido
- δ - delta
- g - grama (s)
- GRs – receptores de glicocorticóides periféricos
- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
- i.p. – intraperitoneal
- k – kappa
- Kg - quilograma (s)
- m – metro (s)
- mg - miligrama
- min - minuto
- mm – milímetro
- mm<sup>2</sup> - milímetro quadrado
- NKA – neurocinina A
- NKB – neurocinina B
- NK – receptores de neurocinina
- NMDA – N- metil- D- aspartato
- NO - óxido nítrico
- NOS – óxido nítrico sintase
- PG - prostaglandina
- p:p – peso por peso
- p:v - peso por volume
- s - segundo

- SCPV – substância cinzenta periaquedutal ventral
- SNC - sistema nervoso central
- SNP – sistema nervoso periférico
- SP - substância P
- v.o – via oral
- $\mu$  - mu
- $\mu\text{m}$  - micrômetro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Dor: Conceitos Gerais	17
1.1.1 Aspectos neurofisiológicos da dor	18
1.1.2 Controle central da dor	20
1.1.3 Dor Neuropática	21
1.1.4 Tratamento da Dor Neuropática	25
1.1.4.1 Opióides e dor neuropática	27
1.2 Venenos de anfíbios e antinocicepção	29
1.2.1 Anfíbios	29
1.2.2 A pele dos anfíbios	31
1.2.3 Principais produtos secretados pela pele dos anfíbios	32
1.2.4 Componentes com atividade antinociceptiva encontrados na secreção cutânea de anfíbios	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Aparelhos e Instrumentos	38
4.3 Drogas e reagentes	39
4.4 Extração do veneno de sapo <i>Rhinella jimi</i>	40
4.5 Purificação de um componente bioativo extraído do veneno de <i>Rhinella jimi</i> em HPLC	40
4.6 Determinação parcial da estrutura química do fator	42
4.7 Dissolução do componente bioativo e das drogas	42
4.8 Indução da dor neuropática	42
4.9 Testes comportamentais	43
4.9.1 Teste de estimulação tátil (von Frey)	43
4.9.2 Testes de compressão da pata (Randall-Selitto)	4
4.10 Tratamentos experimentais	4
4.11 Análise estatística	4
5 RESULTADOS	48
5.1 Dor neuropática experimental induzida por constrição crônica do nervo ciático	48
5.2 Componente bioativo apresenta atividade antinociceptiva sobre alodinia mecânica	51
5.2.1 Efeito antinociceptivo do componente bioativo sobre alodinia mecânica quando administrado por via intraperitoneal	51
5.2.2 Efeito antinociceptivo do componente bioativo sobre alodinia mecânica quando administrado por via oral	53
5.3 Componente bioativo apresenta atividade antinociceptiva sobre hiperalgesia mecânica	55

5.3.1 Efeito do componente bioativo sobre a hiperalgesia mecânica quando administrado por via intraperitoneal	55
5.3.2 Efeito do componente bioativo sobre a hiperalgesia mecânica quando administrado por via oral	57
5.4 Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo com fármacos clássicos utilizados na dor neuropática	59
5.5 Bloqueio do efeito antinociceptivo do componente bioativo pela naloxona	61
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	71

## 1 INTRODUÇÃO

A dor é uma sensação importante, pois é através dela que se percebe um sinal de alerta para um perigo iminente, estando assim relacionada com a proteção do organismo, mostrando os limites que não podem ser transgredidos (CHAPMAN; GAVRINI, 1999; MILLAN, 1999).

Apesar das sensações dolorosas serem um aviso do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com o meio (PIRES, 2007).

A prevalência de dor crônica na população em geral varia de 7% a 40% com esse número tendendo a aumentar, principalmente por causa do aumento da expectativa de vida (SBED, 2009). Esse fato acarreta uma maior probabilidade de se ter algum evento álgico por maior exposição aos agentes causadores podendo atingir qualquer faixa etária (ROSSETTO et al., 1999).

A Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED, 2009) ressalta ainda que, no Brasil, cerca de 50% dos casos de dores crônicas corresponde à dor neuropática periférica, o que representa um grave problema de saúde pública com repercussões sócio-econômicas comparáveis às doenças cardiovasculares, demonstrando assim a importância do estudo dessa patologia (ZIVIANI, 2003). Dessa forma, pesquisas são realizadas em modelos animais e humanos de dor neuropática com o objetivo de descobrir drogas mais eficazes no combate aos efeitos dessa doença (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001; ZIVIANI, 2003).

Alguns venenos de animais, apesar de serem constituídos de vários componentes tóxicos, têm sido utilizados como ferramenta para estudos fisiofarmacológicos e como precursoras de novos medicamentos, representando, juntamente com outras substâncias naturais, cerca de 50% das drogas medicinais (BOGIN, 2005; LEWIS; GARCIA, 2003). Dentre as várias finalidades das pesquisas realizadas com venenos de animais, uma delas é obter substâncias analgésicas

para uso terapêutico na dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008, LIANG, 2009; NOGUEIRA-NETO, 2008).

### **1.1 Dor: conceitos gerais**

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como sendo uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Oliveira (1979) descreve a dor como um alerta que o Sistema Nervoso Central (SNC) utiliza para sinalizar um processo de agressão ao organismo com risco para a sua integridade física. Este alerta desencadeia um conjunto de reações de adaptação, de ordem psicológica, autonômica e motora, visando afastar e preservar o organismo da causa da agressão (MILLAN, 1999).

A dor se manifesta de diferentes formas e, por isso, não pode ser entendida ou tratada como uma entidade única (BESSON, 1999). Cada tipo possui mecanismos próprios e necessita de manejo específico, sendo, portanto, imprescindível o entendimento de cada um deles. Além disso, também possui uma relação com as vias envolvidas com o comportamento motivacional, podendo particularizar sua resposta frente a diferentes indivíduos, o que dificulta o seu tratamento (AGUGGIA, 2003; CHAPMAN; GAVRINI, 1999; VITOR et al., 2008). Portanto, a compreensão destes mecanismos, dos mediadores envolvidos e das adaptações que sofre o organismo é importante para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos que atuem no controle específico deste sintoma (CHAPMAN; GAVRIN, 1999).

Para entender a origem da dor é necessário conhecer sua causa e o seu papel evolutivo. A dor aguda possui um valor biológico adaptativo, uma vez que se desenvolve em resposta a um estímulo potencialmente nocivo ao tecido. Dessa forma, atua como um sinalizador da integridade tecidual, promovendo respostas protetoras (AGUGGIA, 2003; CORTELLI; PIERANGELI, 2003).

A dor crônica, por sua vez, não possui caráter protetor. Sua duração excede a do reconhecimento natural de um estímulo e pode estar presente na ausência de

qualquer agente indutor identificável (AGUGGIA, 2003; CHONG; BAJWA, 2003; MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999). Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, contínua ou recorrente (FURST, 1999; MERSKEY et al., 1986).

### **1.1.1 Aspectos neurofisiológicos da dor**

A dor é uma experiência sensorial desagradável de caráter subjetivo. A percepção sensorial, nocicepção, compreende a transmissão e o processamento da informação dolorosa. Assim, a estimulação nociva detectada pelos receptores periféricos é codificada como uma mensagem nociceptiva, a qual é progressivamente transmitida e processada em centros nervosos superiores. Já a subjetividade da sensação dolorosa ocorre porque a informação nociceptiva atinge não apenas regiões do sistema somatossensorial, mas também o sistema límbico (AGUGGIA, 2003; MILLAN, 1999).

A transmissão do impulso doloroso tem início nos receptores periféricos, nociceptores, que estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais (neurônios de primeira ordem). Apresentam-se amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Eles são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excede uma determinada faixa considerada fisiológica (MILLAN, 1999).

Os nociceptores estão divididos em três classes: os mecanoreceptores, sensíveis a estímulos mecânicos intensos; os termoreceptores, sensíveis a estímulos térmicos (acima de 45°C) e os nociceptores polimodais, sensíveis tanto a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Esses receptores não exibem acomodação, apresentam facilitação e aumento da sensibilidade quando estimulados continuamente (BESSION, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999).

Após a ativação dos nociceptores específicos, produz-se dor percebida de forma localizada, com intensidade proporcional à magnitude do estímulo e duração correspondente à vigência do estímulo doloroso. Uma estimulação mais intensa leva à ativação de nociceptores polimodais (fibras C) que desencadeia uma sensação de dor difusa e persistente, que perdura após o término do estímulo doloroso agudo.

Nesta fase, ocorre o aparecimento dos aspectos emocionais da dor, que se tornam mais importantes nos quadros de dor crônica (AGUGGIA, 2003).

Há ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”) os quais existem em pequena proporção nas fibras aferentes primárias e não respondem normalmente a estímulos. No entanto, quando são estimulados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos (pró-inflamatórios), estes nociceptores apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e passam a responder a estímulos sensoriais (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os nociceptores transmitem as informações dolorosas para a medula espinhal através das fibras sensoriais aferentes, sendo estas de dois tipos: A $\delta$  (delta) e C. As fibras A $\delta$  (delta) são fibras mielinizadas com diâmetro médio variando de 2 - 6  $\mu$ m, que possui velocidade de condução de 12 - 30 m/s e são responsáveis pela condução rápida do estímulo doloroso. As fibras C, por sua vez, são fibras amielínicas responsáveis pela condução lenta do impulso doloroso. Possui diâmetro pequeno que pode variar de 0,4 - 1,2  $\mu$ m e apresenta velocidade de condução de 0,5 - 2 m/s. Estas são as principais fibras responsáveis pela condução deste impulso (FURST, 1999; GRUBB, 1998; SHELLEY; CROSS, 1994). As fibras A $\delta$  são responsáveis pela condução da “primeira dor”, a qual se caracteriza por ser rápida, aguda e pontual, e as fibras C transmitem a “segunda dor”, sendo esta atrasada, difusa e fraca (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A transmissão aferente do estímulo nociceptivo relaciona informações vindas da periferia em direção ao SNC, sendo dependente da integração em três níveis do sistema nervoso: a medula espinhal, o tronco encefálico e o córtex cerebral. As vias nociceptivas aferentes compreendem um sistema regulado por três neurônios que conectam a periferia ao córtex. A ascensão do estímulo nociceptivo inicia-se pelos neurônios de primeira ordem, constituídos por fibras A $\delta$  e C, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal e que recebem informações vindas da superfície corporal. Estes neurônios realizam sinapses com os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem na região da comissura anterior, os quais estão localizados na lâmina II do corno dorsal na medula espinhal. (AGUGGIA, 2003).

Os axônios dos neurônios de segunda ordem, por sua vez, cruzam para o lado oposto da medula espinhal e ascendem em direção ao córtex através do trato espinotalâmico anterolateral, a principal via ascendente para informação sobre dor e temperatura (AGUGGIA, 2003; MUIILLAN, 1999). Estas fibras conectam-se com os neurônios talâmicos de terceira ordem, que se projetam para o córtex somatosensorial primário e para o sistema límbico, conferindo à dor características emocionais (AGUGGIA, 2003).

O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999).

Neurotransmissores e neuropeptídeos, como as taquicininas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG) e aminoácidos excitatórios, como glutamato e aspartato, estão envolvidos na transmissão do impulso doloroso das fibras aferentes primárias para os centros superiores. Eles são liberados pelos terminais dos aferentes primários no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (CAO et al, 1995; ERICSSON et al., 1995; WOOLF, 1994; MILLAN, 1999). Atuam em receptores que estão distribuídos nos nervos periféricos e centrais pela associação à proteína G e formação de segundo - mensageiros, como as proteínas quinases A, C e G, adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e a mobilização de cálcio (MILLAN, 1999).

### **1.1.2 Controle central da dor**

As vias descendentes, responsáveis pelo controle da dor, partem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinhal. Dirigem-se em sentido diametralmente oposto ao da via sensitiva ascendente. Elas exercem um efeito inibitório e modulador sobre estruturas distais, muito particularmente sobre o cordão posterior da medula, onde o balanço entre

aferências nociceptivas e não-nociceptivas pode controlar a transmissão de informação dolorosa para centros superiores (GUTSTEIN et al., 1998; MELZACK; WALL, 1965).

O processo analgésico ocorre pela estimulação de várias regiões como a Substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPV), *locus coeruleus* e o Bulbo Raquidiano Ventromedial Rostral (BRVMR). Projeções diretas conectam o córtex pré-frontal e insular, o hipotálamo, a amígdala e o tronco cerebral à SCPV. Esta se liga ao BRVMR o qual, por sua vez, projeta-se para o corno dorsal da medula. O BRVMR é a maior fonte de neurônios do tronco cerebral para o corno dorsal, principalmente para as lâminas I, II e V (URBAN; GEBHART, 1999). Deste modo, a estimulação da SCPV provoca excitação dos neurônios do BRVMR que, por sua vez, liberam neurotransmissores, como serotonina e encefalina, os quais vão inibir as respostas nociceptivas dos neurônios do corno dorsal, provocando assim uma diminuição das respostas à dor (BASBAUM; JESSEL, 2000; YAKSH; WILSON, 1979).

Existe também a via noradrenérgica proveniente do *locus coeruleus* a qual possui como principal agonista a noradrenalina (CLARK; PROUDFIT, 1991; FRITSCHY et al., 1987). Esta exerce um efeito inibitório sobre a transmissão da dor no corno dorsal (BELCHER; RYALL; SCHAFFNER, 1978).

### **1.1.3 Dor neuropática**

Um tipo de dor crônica que acomete a população é a dor neuropática. Esta é definida, segundo a IASP (1994), como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou Periférico (SNP) (MERSKEY, 1994). Esta condição pode surgir como resultado de lesão a um nervo periférico (amputações, deafferentações), infecções (neuralgia pós-herpética), compressão de nervos (acidentes, cirurgias, tumores), distúrbios cardiovasculares (infarto e acidente vascular cerebral), distúrbios metabólicos (neuralgia diabética), doença viral (herpes zoster), neurotoxicidade farmacológica (quimioterapia antineoplásica), doença

inflamatória e/ou por mecanismos imunológicos (esclerose múltipla) ou ser idiopática (CHONG; BAJWA, 2003; GALLUZZI, 2007; MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999; ZIMMERMANN, 2001).

A injúria ou a disfunção de nervos periféricos, devido à grande variação etiológica, determina uma série de modificações moleculares, bioquímicas e estruturais no axônio, no neurônio primário correspondente e no sistema nervoso central (SNC). Estas modificações podem originar vários sintomas que são classificados em sintomas positivos: como dor espontânea ou intermitente, alodinia (dor em resposta a estímulos não nocivos), hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos nocivos); e em sintomas negativos como perda parcial ou completa de sensibilidade (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001; CHONG; BAJWA, 2003; MACFARLANE et al., 1997; PAPPAGALLO, 2003; WOOLF; MANNION, 1999).

Diversos fenômenos estão envolvidos na origem desse tipo de dor onde os mais relevantes são: sensibilização de receptores; ocorrência de focos ectópicos de potenciais de ação em fibras periféricas (do tipo C e/ou A $\beta$ ); atividade anormal das estruturas supressoras e de processamento central da parte aferente (sensitiva); liberação de substâncias algio gênicas teciduais; liberação de neurotransmissores excitatórios; inflamação neurogênica; e outros fenômenos de ordem física, psíquica e neurovegetativa (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001; WOOLF; MANION, 2002).

O mecanismo que resulta na dor neuropática difere daquele envolvido na gênese da dor nociceptiva que surge em resposta à ativação dos nociceptores por um estímulo potencialmente nocivo. Assim, a dor nociceptiva, que é considerada fisiológica devido ao seu caráter protetor, a qual ativa o reflexo de retirada e impede lesão adicional, tende a ser localizada e finita, deixando de existir com a remoção ou término do estímulo nociceptivo (CHONG; BAJWA, 2003). Já na dor neuropática, a sensação dolorosa persiste após a retirada do estímulo nociceptivo, podendo ocorrer mesmo quando este é indetectável (AGUGGIA, 2003; CHONG; BAJWA, 2003; MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999). Isto se dá em função de alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem a mensagem nociceptiva. Nesse caso, ocorrem os mecanismos de sensibilização periférica e central. Esses mecanismos envolvem a liberação de mediadores químicos no local da lesão e nas regiões do

SNC relacionadas, o que intensifica a transmissão nociceptiva. A partir da sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica que são observadas através da existência de hiperalgesia e alodinia (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001; MILLAN, 1999).

Os mecanismos periféricos de dor neuropática envolvem o disparo de descargas ectópicas pelas fibras nervosas lesadas. Essa atividade elétrica alterada ocorre não apenas nas fibras que conduzem a informação nociceptiva, fibras C e A $\delta$ , mas também nas fibras do tipo A $\beta$ , que em situações fisiológicas conduzem informações referentes à sensibilidade mecânica inócua. Essas descargas ectópicas, após lesão nervosa, podem ocorrer devido a alteração na expressão de canais iônicos nas fibras nervosas danificadas e nos corpos celulares no gânglio da raiz dorsal; e ainda pela liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão, tais como bradicinina e a serotonina, os quais ativam e/ou sensibilizam os neurônios aferentes primários (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; ZIMMERMANN, 2001;).

Dessa forma, a transmissão da informação nociceptiva é gerada pela alteração na excitabilidade dos terminais sensoriais. No entanto, outras regiões do neurônio sensorial primário, e mesmo células pós-sinápticas do corno dorsal, ou de ordem superior, podem contribuir para a fisiopatologia da dor neuropática. Essas alterações no SNC ocorrem devido ao fenômeno de sensibilização central (ZIMMERMANN, 2001; WOOLF; MANNION, 1999). Este pode ocorrer pela estimulação repetitiva das fibras C que produz uma sensibilização dos neurônios de segunda ordem, com subsequente redução no seu limiar de ativação, levando à ocorrência de atividade espontânea (CORTELLI; PIERANGELI, 2003; MACFARLANE et al., 1997).

A liberação de SP e neurocinina A (NKA) na medula espinhal e a superexpressão de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) também parecem ser importantes na indução da sensibilização central (MACFARLANE et al., 1997). Estes neuropeptídeos ligam-se a receptores NK1 e NK2, disparando a liberação de cálcio intracelular. O aumento na concentração intracelular de íons cálcio leva à excitabilidade neuronal, deslocando o íon magnésio que bloqueia fisicamente o canal do receptor NMDA. Uma vez desbloqueado, a ativação do receptor NMDA por

aminoácidos excitatórios, como o glutamato, leva a um influxo de cálcio e sódio para a célula, aumentando ainda mais a excitabilidade neuronal. Além disso, o aumento da concentração intracelular de cálcio permite que este íon atue como segundo mensageiro em mecanismos que contribuem para a manutenção do estado de dor persistente. Dentre estes mecanismos estão a ativação de proteína quinase C, ativação de óxido nítrico sintase (NOS) e da fosfolipase C, levando à produção espinal de óxido nítrico (NO) e prostanoídes os quais contribuem para o desenvolvimento da sensibilização (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF; MANNION, 1999). Além disso, também pode ocorrer acúmulo e uma nova expressão de canais de sódio na periferia e redução da inibição GABAérgica, que atua de modo inibitório na transmissão nociceptiva (JENSEN, 2002).

Tem sido sugerido ainda que a resposta inflamatória desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática decorrente de lesão periférica do nervo (BENOLIEL et al., 2002; CLATWORTHY et al., 1995; MA; DU; EISENACH, 2002). De fato, observa-se que a sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores do processo inflamatório pode ser importante no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia primária, fenômeno limitado à área da lesão e imediatamente adjacente, em que a redução do limiar de dor resulta da participação de bradicinina, serotonina (5-HT), SP e subprodutos do ácido araquidônico (CAMU; SHI; VANLERSBERGHE, 2003; TREEDE et al., 1992), além da liberação de citocinas e fatores de crescimento neural (ANDERSON; RAO, 2001; CAMU; SHI; VANLERSBERGHE, 2003; CLATWORTHY et al., 1995).

Em consequência à manutenção deste estado, ocorrem alterações neuroplásticas nos neurônios do corno dorsal com conseqüente sensibilização central que leva ao desenvolvimento da hiperalgesia secundária, característica da dor neuropática, na qual a dor pode ser desencadeada por estímulos nociceptivos aplicados em regiões não lesadas (CAMU; SHI; VANLERSBERGHE, 2003; PERTOVAARA; KONTINEN; KALSO, 1997; TREEDE et al., 1992).

Foi demonstrado que a redução do controle inibitório descendente exercido pela SCPV sobre a transmissão da resposta nociceptiva pode ter papel fundamental no desenvolvimento da hiperalgesia seguida à lesão do nervo, indicando uma função

fundamental da SCPV na modulação de estímulos nociceptivos originados no complexo trigeminal (KNIGHT et al., 2002; PERTOVAARA; KONTINEN; KALSO, 1997).

#### **1.1.4 Tratamento da dor neuropática**

Quando se considera a complexidade do processo de dor neuropática, torna-se compreensível a dificuldade clínica encontrada no seu tratamento, uma vez que pouco se compreende sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (ALEY; LEVINE, 2002; CAVIEDES; HERRANZ, 2002; GALLUZZI, 2007; SAH; OSSIPO; PORRECA, 2003).

A farmacoterapia é a principal base de tratamento das dores neuropáticas. Além dos analgésicos primários, que possuem resposta total ou parcialmente ineficaz na dor neuropática, é indicado também o uso de fármacos analgésicos adjuvantes, isto é, drogas cuja primeira indicação não é analgesia (CHONG; BAJWA, 2003).

Em função disso, diversas opções terapêuticas vêm sendo desenvolvidas para o controle da dor neuropática, contudo, na maioria dos casos a resposta dos pacientes não é satisfatória (GALER, 1995). Estes tratamentos incluem antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, anti-inflamatórios, analgésicos, corticóides e outros (CAVIEDES; HERRANZ, 2002; GUSTAFSSON; SANDIM, 2009; PAPPAGALLO, 2003; STEPANOVIC-PETROVIC, et al., 2008).

Os antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina, atuam potencializando a ação da noradrenalina e da serotonina por inibirem a recaptação desses neurotransmissores na fenda sináptica. Esse mecanismo está relacionado com o alívio da dor neuropática, uma vez que esses neurotransmissores estão envolvidos no mecanismo endógeno de modulação da dor por via inibitória descendente (McCLEANE, 2008; SINDRUP, 2005; OATWAY; REID; SAWYMOK, 2003). Estudos laboratoriais com amitriptilina demonstraram que esta produz anti-hiperalgesia e analgesia (LYNCH et al., 2005; OATWAY; REID; SAWYMOK, 2003). Também tem

sido mostrado também que a amitriptilina apresenta um potente efeito analgésico em pacientes com neuropatia diabética (NAGATA et al., 2009; SINDRUP et al., 1992). A Duloxetina, que é um potente inibidor seletivo da recaptação de 5-HT e norepinefrina, foi aprovada pela FDA (Food drug administration) como o primeiro antidepressivo utilizado na dor neuropática diabética (GOLDSTEIN et al., 2005).

Os anticonvulsivantes, como carbamazepina, regulam a transmissão dos impulsos nervosos através da modulação de canais para cálcio durante a sensibilização periférica, o que pode ser explicado pela grande similaridade entre a transmissão dos impulsos na sensibilização e na epilepsia (CAVIEDES; HERRANZ, 2002; CHEN; ZEMIN; PAN, 2001; JENSEN; 2002). A carbamazepina (CBZ) atua na dor neuropática bloqueando os canais de sódio voltagem- dependente nos níveis pré e pós-sinápticos estabilizando a membrana do nervo. Dessa forma reduz a hiperexcitabilidade neuronal e suprime a atividade espontânea ectópica das fibras A e C, sem alterar a condução nervosa normal (BAJWA et al., 1999; SODERPALM, 2002). Sabe-se também que, após injúria nervosa, ocorre uma superexpressão de subunidade  $\alpha_2$  de canais para cálcio e isso pode contribuir para uma ação analgésica dos gabapentinóides na dor neuropática (COSTIGAN et al., 2002; LUO et al., 2001; WOOLF, 2004)

Os anti-inflamatórios não-esteróidais possuem uma eficácia controversa no tratamento da hipersensibilidade que se segue após a injúria de nervos periféricos (MacPHERSON, 2002). No entanto, Ferreira et al. (1990) observou bloqueio total da hiperalgesia persistente induzida por prostaglandina  $E_2$  em ratos, após administração intraplantar de dipirona. Embora os fármacos anti-inflamatórios e analgésicos não-esteróidais apresentem ação inibitória da via das ciclooxigenases e conseqüentemente da síntese de prostaglandinas causando alívio nas dores de origem inflamatória, este mecanismo de ação não parece efetivo no controle da dor neuropática (CAMU; SHI; VANLERSBERGUE, 2003; VANE, 1971)

Com relação aos corticóides, sabe-se que em lesões nervosas ocorre uma maior expressão de receptores para glicocorticóides periféricos (GRs) e que esses exercem um papel anti-inflamatório significativo, uma vez que, junto com elementos intracelulares, ativam proteínas que estão envolvidas na transcrição de citocinas no tecido inflamado (NEECK et al., 2002). Estes receptores estão presentes na medula

espinhal e sua ativação contribui para mudanças centrais relacionadas com a injúria neuronal (CAMERON; DUTIA, 1999; CINTRA et al., 1993; DE NICOLA et al., 1989). No entanto os glicocorticóides possuem ação neurotóxica que podem contribuir para um dano neuronal (FUXE et al., 1996). Portanto a ação da ativação dos receptores de glicocorticóides na dor neuropática não é bem elucidada. (WANG, et al., 2004).

Medidas terapêuticas, como acupuntura ou estimulação elétrica do sistema nervoso, também tem sido usadas no tratamento da dor neuropática nervoso, porém não se conhece o efeito dessas terapias quando empregadas por tempo prolongado (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

#### **1.1.4.1 Opióides e dor neuropática**

Opióide é um termo geral usado para identificar qualquer substância, natural ou sintética, cuja ação analgésica é semelhante aos efeitos da morfina e que possuam a naloxona como antagonista (RANG et al., 2008).

Estudos demonstram que o efeito analgésico dos opióides é devido à sua propriedade em inibir, de maneira direta, a transmissão ascendente das informações nociceptivas provenientes do corno dorsal da medula espinhal e ativar os circuitos de controle da dor que descem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinhal. Os peptídeos opióides e seus receptores são encontrados em todos esses circuitos descendentes da dor (GUTSTEIN et al., 1998).

Os tipos de receptores opióides são  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta). Eles diferem entre si por diferentes afinidades aos ligantes opióides endógenos e também às drogas opióides exógenas (CHILDERS, 1997). Os principais ligantes opióides endógenos são: encefalina, seletiva para receptores tipo  $\delta$ ; dinorfina, seletiva para receptores tipo  $\kappa$ ; e endorfina a qual possui alta afinidade para receptores tipo  $\delta$  e  $\mu$  e baixa afinidade para receptores tipo  $\kappa$  (GOLDSTEIN; NAIDU, 1989; LORD et al., 1977).

Acredita-se que os receptores  $\mu$  sejam responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides. A morfina e a maioria de seus análogos exercem seus efeitos analgésicos atuando principalmente nestes receptores. Os receptores  $\delta$ , provavelmente são mais importantes na periferia. Já os receptores  $\kappa$  induzem analgesia mediada principalmente nos locais espinhais (GOLDSTEIN; NAIDU, 1989).

Os receptores opióides atuam acoplando-se a proteínas G e assim, afetam a regulação dos canais iônicos, modulam o processamento do  $\text{Ca}^{++}$  e alteram a fosforilação das proteínas. Dessa forma, os opióides promovem a abertura dos canais de potássio e inibem a abertura dos canais de cálcio regulados por voltagem que constituem os principais efeitos observados na membrana. Esses efeitos sobre a membrana reduzem tanto a excitabilidade neuronal (aumentando a condutância do potássio e provocando hiperpolarização da membrana) quanto à liberação de transmissores (devido à inibição da entrada de cálcio) (CHILDERS, 1991).

Além da especificidade para receptores, os opióides também variam em sua ação farmacológica. Assim, alguns agentes atuam como agonistas puros em um tipo de receptor (possuem um efeito máximo para analgesia, como a codeína, metadona e a maioria das drogas típicas semelhantes à morfina), antagonistas (não possuem atividade farmacológica intrínseca, porém bloqueiam os efeitos dos agonistas. Ex: naloxona, naltrexona) ou como agonistas parciais (possuem baixa eficácia, combinam certo grau de atividade agonista e antagonista em diferentes receptores. Ex: nalorfina e pentazocina) possuindo um quadro farmacológico muito complicado (RANG et al., 2008).

Os opióides são universalmente utilizados no tratamento da dor oncológica e dor aguda, embora alguns clínicos ainda resistam ao uso destes analgésicos principalmente pelo temor de suas complicações, como a depressão respiratória, e pela falta de conhecimento de respostas fisiológicas individuais frente a alguns aspectos farmacológicos, como a tolerância, a dependência física e psicológica (McQUAY, 1999).

Apesar de a dor nociceptiva em geral responder aos analgésicos opióides, a dor neuropática não costuma responder bem a esses fármacos e pode exigir doses maiores desses analgésicos. Portanto, os opióides são mais eficientes no tratamento da dor nociceptiva do que na dor neuropática (COLOMBO et al., 2006; FIELDS, 1988). A ineficácia dos opióides no tratamento da dor neuropática pode ser devido à redução na sensibilidade a estes fármacos (CAVIEDES; HERRANZ, 2002; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este fato, entre eles, redução da expressão ou destruição dos receptores opióides espinhais ou alterando a transdução de sinal após a ligação do agonista ao receptor opióide (ABDULLA; SMITH, 1998; BIAN et al., 1995; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001).

Devido aos diversos efeitos colaterais provocados pelos opióides e outros fármacos utilizados para o tratamento da dor crônica, bem como a eficácia reduzida apresentadas por eles, ressalta-se a necessidade de maiores estudos na descoberta de novas substâncias que atuem no tratamento da dor neuropática de modo mais eficaz e seguro (DWORKIN et al., 2003).

## **1.2 Venenos de anfíbios e antinocicepção**

### **1.2.1 Anfíbios**

Os anfíbios são membros do Reino Animalia, Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Amphibia e se subdividem nas seguintes ordens: Anura ou Salientia (sapos, rãs e pererecas); Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Apoda ou Gymnophiona (cobras-cegas ou cecílias) (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

O nome Anfíbio provém do grego *amphibios* (*amphi*, dual e *bios*, vida) que significa vida dupla e corresponde às duas fases da vida dessa classe de animais, uma na água e outra na terra (DUELLMAN, 1992). Eles possuem a capacidade de sobreviver tanto em ambiente aquático como terrestre devido à evolução de diferentes adaptações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (CLARKE, 1996), como desenvolvimento de pernas em lugar de nadadeiras; modificações na pele para facilitar a respiração; modificações no metabolismo e na

excreção para formar menos produtos nitrogenados tóxicos e também aquisição de órgãos dos sentidos, que funcionam tanto no ar como na água (DUELLMAN, 1992).

Por serem animais desprovidos de estruturas de defesa como espinhos, garras e dentes afiados, desenvolveram um sistema especializado de glândulas cutâneas que secretam veneno como proteção contra os predadores sendo este, durante sua evolução, um mecanismo essencial para sua sobrevivência em um novo habitat (LAZARUS; ATILLA, 1993).

Algumas espécies de anfíbios secretam toxinas extremamente potentes, porém não possuem mecanismo inoculador. Algumas destas espécies consideradas venenosas são: as rãs das famílias Atelopodidae, Dendrobatidae, Discoglossidae, Hylidae, Pipidae, Ranidae, certas salamandras do gênero *Salamandra* e os sapos da família Bufonidae (DUELLMAN, 1992; KARALLIEDDE, 1995; LAZARUS; ATTILA, 1993).

A família Bufonidae contém 528 espécies (AMPHIBIAWEB, 2009), com o número de representantes aumentando anualmente. Possui ampla distribuição em todos os continentes, exceto em Madagascar e regiões oceânicas. Além de ser uma das mais numerosas famílias (em espécies) da classe Amphibia (FROST, 1985).

A grande maioria dos animais da família Bufonidae apresenta uma concavidade na frente e uma superfície convexa no dorso. Logo atrás dos tímpanos estão as glândulas parotóides que produzem secreção venenosa (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Tais glândulas estão dispostas uma de cada lado do corpo, em posição pós-orbital. As parotóides apresentam-se com muitos poros claramente visíveis e exercem função de defesa, através da excreção de um veneno, de aspecto leitoso que é elaborado por glândulas granulosas (TOLEDO; JARED, 1989). Este veneno é constituído por inúmeros compostos, que apresentam várias atividades biológicas como: antileishmaniose, antitripanosoma, antifúngica, antibacteriana (CUNHA-FILHO et al., 2005; TEMPONE et al., 2007; 2008)

Um dos representantes da família *Bufonidae* é a espécie *Rhinella jimi* (CHAPARRO et al., 2007; FROST et al., 2006), anteriormente conhecido como *Bufo*

*paracnemis* e depois *Bufo jimi* (STEVAUX, 2002). É popularmente conhecido como sapo-cururu, sapo endêmico do semi-árido nordestino brasileiro.

### 1.2.2 A pele dos anfíbios

A pele dos anfíbios é um órgão com determinada complexidade morfológica, bioquímica e fisiológica. Exerce várias funções importantes, como respiração, transporte de água e solutos, regulação da temperatura corpórea e defesa contra microorganismos e predadores, sendo considerada como um dos principais fatores que garantem a sobrevivência e a permanência desses animais no ambiente terrestre (CLARKE, 1996; DUELLMAN, 1992; SEBEN et al., 1993). Os principais mecanismos fisiológicos adaptativos relacionam-se com o controle da dessecação e da pressão arterial, bem como a presença de componentes bioativos de atividade antibiótica protegendo os animais de infecções bacterianas, virais e fúngicas (DUELLMAN, 1992)

Muitos componentes bioativos presentes na pele dos anfíbios são sintetizados por glândulas cutâneas distribuídas por toda a pele (DALY, 1995). Estas podem ser de dois tipos, mucosas e granulosas (DUELLMAN, 1992). As glândulas mucosas secretam um muco altamente hidrofílico que controlam o pH e o grau de umidade da pele, proporcionando condições adequadas para a respiração cutânea (TOLEDO; JARED, 1995). Já as glândulas granulosas são as principais responsáveis pela defesa passiva dos anfíbios, devido a sua secreção ser tóxica para diversas espécies de vertebrados. Nos sapos existem duas estruturas denominadas glândulas parotóides, que representam um acúmulo de glândulas granulosas (Figura 1). Essas glândulas produzem e armazenam substâncias que são liberadas após compressão destas glândulas exercendo uma importante função de defesa (JARED et al., 2009; SEBEN et al., 1993; TOLEDO; JARED, 1989).



**Figura 1. *Rhinella jimi* – “Sapo-cururu”.** Observa-se, posteriormente à abertura timpânica e aos olhos, a presença de um aglomerado de glândulas serosas, denominada glândula parotóide (seta). (Foto realizada pelo grupo de coleta Laboratório de Toxinologia e Neurofarmacologia Molecular – ISCB/UECE).

As secreções das glândulas granulares são reguladas por hormônios e mediadas por neurotransmissores. Após a secreção do conteúdo glandular que pode ser induzido por estimulação física do animal, moderado choque elétrico ou injeção de adrenalina, mecanismos regenerativos na região sincicial das glândulas iniciam imediatamente a reposição do conteúdo luminal. Dependendo da espécie, das condições ambientais e nutricionais dos animais, este processo pode levar de três a quatro semanas período em que as glândulas permanecem refratárias à estimulação adrenérgica (FLUCHER et al., 1986; GIOVANNINI; POULTER; GIBSON, 1987; IWAMURO; KUWAGAKI; KIKUYAMA, 1991).

### 1.2.3 Principais produtos secretados pela pele de anfíbios

Os compostos produzidos e estocados pelas glândulas granulares são numerosos e apresenta elevada diversidade. Alcalóides, amins biogênicas, proteínas, peptídeos, enzimas e esteróides são os principais tipos de substâncias presentes nessas secreções (CARVALHO, 1995; DALY, 1995; ERSPAMER, 1984; LAZARUS; ATTILA, 1993; REILLY et al., 1994).

Os alcalóides não são sintetizados pelos anfíbios sendo obtidos da dieta à base de insetos que se alimentam de plantas que sintetizam os alcalóides (DALY et al, 1987; 1995; LAZARUS et al, 1994). Já as aminas biogênicas são sintetizadas pelos anfíbios e tem como representantes presente nas secreções dos anfíbios as indolalquilaminas, imidazolalquilaminas e fenilalquilaminas, além de derivados feniletilamínicos, que incluem adrenalina, noradrenalina e dopamina e derivados triptamínicos como a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (CLARKE, 1996; ERSPAMER, 1984; LAZARUS et al., 1994).

Nas secreções dos anfíbios existem ainda proteínas que podem apresentar ações farmacológicas, sendo utilizadas como ferramentas para o estudo das funções fisiológicas de mamíferos (CARVALHO et al., 1992). Alguns peptídeos secretados pelos anfíbios possuem potente atividade biológica em mamíferos, incluindo, taquicininas, bradicininas, ceruleínas, bombesinas, opióides, xenopsinas, hormônio liberador de tireotropina, angiotensina. Foi verificada atividade antimicrobiana em peptídeos como as magaininas, PGLa, XPF, LPF, CPF (REILLY; TOMASSINI; ZASLOFF, 1994; CARVALHO, 1995) e leptoglicina (SOUSA et al., 2009).

Os esteróides encontrados em secreções cutâneas de sapo são divididos, quanto ao seu mecanismo de ação, em cardiotônicos e não-cardiotônicos. Os esteróides não-cardiotônicos incluem o ergosterol, o colesterol e o  $\alpha$ -sitosterol (CHEN; KOVARIKOVA, 1967; TOLEDO; JARED, 1995; ZELNIK et al., 1964). Os cardiotônicos são constituídos pelas bufotoxinas, e os bufadienólídeos, também denominadas bufaginas ou bufogeninas (TOLEDO; JARED, 1995).

Os bufadienólídeos estão presentes na secreção da pele de alguns anfíbios, e em extratos teciduais de plantas, vegetais, frutas e serpentes (ROSSI et al. 1997). Estes compostos estão amplamente difundidos na família Bufonidae e muitos deles já foram isolados da secreção cutânea de sapos do gênero *Rhinella* como: bufalina, marinobufogenina e telecinobufagina (PORTO; GROSS, 1971; ROSSI; BLUMENTHAL; JARED, 1997).

#### 1.2.4 Componentes com atividade antinociceptiva encontrados na secreção cutânea de anfíbios

Algumas moléculas encontradas na secreção cutânea de anfíbios possuem atividade antinociceptiva como foi demonstrado por Erspamer e colaboradores (1989), os quais pesquisaram a presença de substâncias opióides em anfíbios. Esses estudos basearam-se no conhecimento de que a pele destes animais apresenta uma grande variedade de peptídeos homólogos ou até mesmo idênticos aos hormônios gastrointestinais e neurotransmissores contidos nos mamíferos. Peptídeos isolados da pele de rãs sul americanas da subfamília Phyllomedusinae, como deltorfinas e dermorfinas, apresentaram atividade antinociceptiva. As dermorfinas mostraram efeitos seletivos para receptores opióides do tipo  $\mu$  e as deltorfinas apresentaram alta seletividade para receptores opióides do tipo  $\delta$  (ESPARMER et al., 1989; ZADINA et al., 1997). A descoberta desses peptídeos opióides em anfíbios proporcionou melhores esclarecimentos a respeito das funções dos sistemas opióides  $\mu$  e  $\delta$ , e abriu a perspectiva para o desenvolvimento de novos analgésicos com benefícios terapêuticos.

Outro peptídeo com atividade analgésica é a ceruleína, um decapeptídeo de *Hyla caerulea*, que é estruturalmente relacionado à colecistocinina, produzindo efeitos comportamentais como inibição do apetite, sedação e saciedade. A ceruleína ou seus análogos exibem efeitos anticonvulsivantes e antinociceptivos, os quais provavelmente são mediados pela modulação central das funções dopaminérgicas (ZETLER, 1985).

A epibatidina, um alcalóide isolado da pele de *Epipedobates tricolor*, também apresenta uma potente atividade antinociceptiva, não opióide (SPANDE et al., 1992). Age especificamente em receptores neuronais nicotínicos com eficácia 200 vezes maior do que a morfina (DALY et al, 1987; 1995; LAZARUS et al, 1994; SULLIVAN et al., 1994).

Estudos realizados recentemente em nosso laboratório com um componente bioativo de natureza esteroideal da secreção cutânea da *Rhinella jimi* demonstrou

atividade antinociceptiva em dores agudas (CARVALHO, 2009; PATROCÍNIO, 2004).

Embora existam peptídeos e esteróides da secreção cutânea de sapo analisados com atividade antinociceptiva na dor aguda, pouco se sabe sobre a ação dessas moléculas na dor neuropática.

Observando as diversas atividades biológicas das moléculas presentes na secreção de sapo, bem como a necessidade de encontrar um fármaco mais eficaz no tratamento da dor neuropática, é importante a realização de estudos sobre as potencialidades dessas substâncias encontradas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Aproximadamente 50% dos casos de dores crônicas no Brasil, correspondem à dor neuropática periférica e o seu tratamento ainda é muito controverso, o que demonstra a importância do estudo dessa patologia (SBED, 2009)

A resposta da dor neuropática aos analgésicos primários muitas vezes é ineficaz, sendo indicado o uso de fármacos analgésicos adjuvantes (CHONG; BAJWA, 2003). Em função disso, diversas opções terapêuticas vêm sendo desenvolvidas para o controle da dor neuropática, contudo, na maioria dos casos a resposta dos pacientes ainda não é satisfatória (GALER, 1995) Além disso, o tratamento atual da dor neuropática provoca muitos efeitos adversos nos pacientes.

Diante destes fatos, ressalta-se a necessidade de maiores estudos a respeito do controle da dor neuropática visando encontrar fármacos mais eficazes e mais seguros para o tratamento desta modalidade de dor crônica.

Atualmente os venenos de animais, vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas com finalidade de obter substâncias para uso terapêutico, inclusive na dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2008; LIANG, 2009). Substâncias isoladas da secreção cutânea de alguns anfíbios mostraram ação antinociceptiva em dores agudas experimental. Além disso, estudo recente realizado em nosso laboratório também mostrou que um componente bioativo presente no veneno do sapo *Rhinella jimi* apresenta efeito antinociceptivo sobre as dores agudas. No entanto não existem estudos sobre a ação antinociceptiva dessas substâncias na dor neuropática experimental.

Assim, a relevância do atual projeto reside na busca de novas substâncias biologicamente ativas a partir de recursos naturais do semi-árido do Nordeste, como no veneno de sapo *Rhinella jimi*, que atuam sobre a dor neuropática experimental, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos que poderão ser utilizados de uma maneira mais eficaz no tratamento da dor neuropática.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito antinociceptivo de um componente bioativo isolado do veneno de sapo *Rhinella jimmi* em modelo animal de dor neuropática.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Induzir neuropatia periférica através do modelo de constrição crônica do nervo ciático e detectar a presença de alodinia e hiperalgesia mecânica;
- Purificar em larga escala um componente bioativo do veneno de *Rhinella jimmi*, através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Avaliar a ação antinociceptiva do componente bioativo purificado no modelo de dor neuropática pelo teste de compressão de pata (Randall-Selitto) e o teste de estimulação tátil (von Frey), através de diferentes vias de administração (intraperitoneal e oral);
- Comparar os efeitos antinociceptivos do componente bioativo purificado com morfina, carbamazepina, amitriptilina, codeína, prednisona, diclofenaco sódico e dipirona, que são drogas clássicas utilizadas no tratamento da dor neuropática;
- Verificar se ocorre a participação do sistema opióide no mecanismo de ação do componente bioativo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos pesando entre 200 a 250g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais foram mantidos em gaiolas próprias com cinco animais por caixa sob condições ambientais, em sala adequada com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas. Receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Nas 24 horas antes dos ensaios, os animais foram mantidos na sala onde foi desenvolvido o estudo, a fim de adaptá-los ao ambiente experimental. A manipulação dos animais, antes, durante e depois dos experimentos, foi conduzida de acordo com as regras de manipulação de animais de laboratório, preconizadas pela Sociedade Brasileira de Ciências ou Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE-Nº 58/2009(09233135-1).

Os exemplares de *Rhinella jimi* utilizados para extração do veneno foram coletados em diferentes épocas do ano e em diferentes locais do interior do Ceará. Após a extração do veneno, os animais foram devolvidos ao seu *habitat* natural.

### 4.2 Aparelhos e instrumentos

- Agitador de tubos - modelo AP 56, Phoenix, Brasil;
- Balança Analítica - Marte AM/550, Automarte, Brasil;
- Balança de Precisão - Mettler-Balance, USA;
- Centrífuga PLC – 05, Gemmy Industrial Corp., Taiwan;
- Centrífuga Refrigerada Annita I, Eslovênia;
- Coluna C-18 LC Shim-pack CLC-ODS;
- Cronômetro – Leônidas Trackmater, Alemanha;
- HPLC (Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance) - SPD - 10AV, LC - 10AS, Shimadzu, Japão;
- Liofilizador Adwards – Modulyo, Inglaterra;

- Pipetas Automáticas – Gilson, França e Kacil, Brasil;
- Von Frey - INSIGHT
- Randall Selitto – INSIGHT
- Material cirúrgico
- Catgut cromado 4.0;
- Nylpoint suture 5.0
- Seringa descartável – Plastipak, Brasil;
- Agulha Hipodérmica – Med Needle, Brasil;

### 4.3 Drogas e reagentes

- Acetonitrila - Carlo Erba, Brasil;
- Ácido trifluoroacético - PA Merck, Brasil;
- Água bidestilada - UECE, Brasil;
- Álcool etílico - PA Merck, Brasil;
- Solução salina 0,85% - NaCl – VETEC;
- TRIS-HCL 0,05N.
- Morfina – Sigma, USA;
- Naloxona – Sigma, USA;
- Carbamazepina- CRISTÁLIA
- Dipirona sódica- CRISTÁLIA
- Codeína - CRISTÁLIA
- Diclofenaco sódico- CRISTÁLIA
- Amitriptilina- CRISTÁLIA
- Prednisona – CRISTÁLIA
- Pentobarbital- CRISTÁLIA

#### 4.4 Extração do veneno de *Rhinella jimi*

O veneno foi extraído por compressão das glândulas parotóides dos animais. A secreção obtida foi macerada em gral com pistilo após adição de etanol (1:3; p:v), até sua total homogeneização, sendo, em seguida, mantida a 4° C durante 24 horas. A mistura foi, então, centrifugada a 500 x g por 20 minutos, sendo o sobrenadante armazenado a -80 °C, por no máximo uma semana, até a purificação em HPLC.



**Figura 2. Extração do veneno de *Rhinella jimi* por compressão das glândulas parotóides** (Foto realizada pelo grupo de coleta Laboratório de Toxinologia e Neurofarmacologia Molecular – ISCB/UECE).

#### 4.5 Purificação de um componente bioativo extraído do veneno de *Rhinella jimi* em HPLC

O sobrenadante obtido da extração do veneno foi fracionado por cromatografia líquida da alta performance (HPLC) (Figura 3A e 3B) utilizando-se uma coluna preparativa C-18 de fase reversa, eluída com fluxo de 5ml/min e um gradiente de

acetonitrila entre 0 e 80%. Os picos obtidos foram coletados, liofilizados e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para a realização dos testes experimentais, o pó liofilizado proveniente das frações purificadas do HPLC foi ressuspenso em solução de DMSO (10%) e água destilada.



Figura 3 HPLC: Cromatógrafo Líquido da Alta Eficiência.

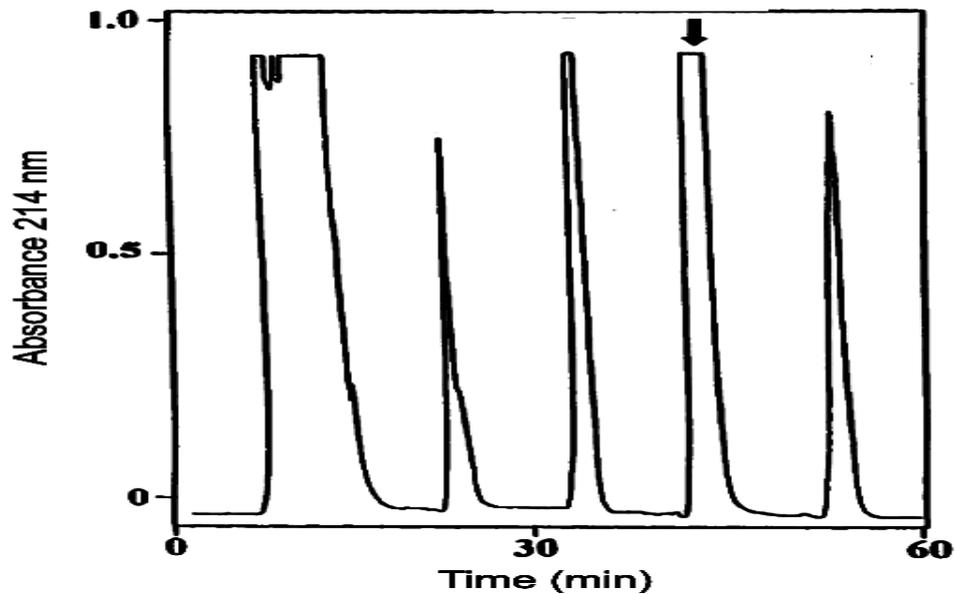


Figura 3B Perfil de eluição do veneno das glândulas parotóides do sapo *Rhinella jimi*. Foi realizada uma Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) preparativa de 1,7 ml da fração sobrenadante do veneno bruto, ressuspenso previamente em etanol (1:3; p:v), utilizando-se uma coluna preparativa de fase reversa C18 (Shim pack prep. ODS 2,5 x 30 cm) com um fluxo de 5 ml/min e uma eluição de acetonitrila com um gradiente de 0 a 80%. O pico, contendo o componente bioativo (ver seta) foi coletado, liofilizado e congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### **4.6 Determinação parcial da estrutura química do fator**

A determinação da estrutura química do componente bioativo foi parcialmente elucidada no CENAUREM (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear) da UFC através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), tratando-se de um composto esteroidal.

A análise da RMN de alta resolução do componente bioativo purificado foi realizada através de seqüências modernas de pulsos tais como <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY e NOESY, correlação heteronuclear (inversa) de carbono e hidrogênio do carbono-hidrogênio acoplados (Hector e HMQC), assim como as seqüências equivalentes de longa extensão (COLOC e HMBC). Os detalhes da metodologia utilizados foram anteriormente descritos (CARVALHO *et al*, 1999).

#### **4.7 Dissolução do componente bioativo e das drogas**

O componente bioativo foi diluído em solução de DMSO (10%) em água destilada. A carbamazepina foi diluída em DMSO 40%. Todas as demais drogas foram diluídas em água destilada.

#### **4.8 Indução da dor neuropática**

A dor neuropática foi induzida por injúria nervosa decorrente da constrição crônica do nervo ciático, de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988). Os ratos (*n*= 6 para cada grupo experimental) foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p - 10 min antes da cirurgia).

Após assepsia com álcool iodado, foi feita uma incisão na região mediana da coxa do animal. O músculo bíceps femoral foi afastado, o nervo ciático foi exposto e um segmento de 5 – 7 mm foi dissecado. Próximo à trifurcação do nervo ciático (7 mm), foram realizadas 3 ligaduras frouxas distantes entre si em aproximadamente 1 mm, com catgut cromado 4-0. Após o procedimento cirúrgico, a incisão foi suturada

em camadas utilizando fio de sutura de seda 5-0. Este mesmo procedimento cirúrgico foi realizado na pata esquerda do animal, com exceção da constrição do feixe nervoso, constituindo-se o controle falso-operado (sham).



**Figura 4 - Constrição crônica do nervo ciático.** A figura mostra a realização do procedimento cirúrgico para a realização da constrição crônica do nervo ciático que consiste em causar injúria nervosa do nervo ciático através da realização de três ligaduras frouxas (com linha catgut cromada 4-0) ao redor do mesmo. O mesmo procedimento cirúrgico foi realizado na pata contralateral sem a constrição crônica do nervo constituindo o controle falso-operado. A incisão foi suturada em camadas utilizando fio de sutura de seda 5-0. O anestésico utilizado foi pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p).

## 4.9 Testes comportamentais

Dois testes mecânicos foram utilizados para verificar a atividade antinociceptiva do componente bioativo em estudo na dor neuropática. O teste de estimulação tátil (von Frey) foi usado para analisar o fenômeno de alodinia mecânica (CHAPLAN et al., 1994), enquanto que o teste de compressão de pata pelo método de Randall-Selitto avaliou o processo de hiperalgesia mecânica (RANDALL; SELITTO, 1957).

### 4.9.1 Teste de estimulação tátil (von Frey)

O presente teste foi usado para analisar o fenômeno de alodinia mecânica, o qual foi determinado por ensaio quantitativo em resposta a um estímulo tátil não nocivo aplicado à pata posterior direita do animal, segundo método descrito por Chaplan et al. (1994) Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas acrílicas (12 X 10 X 17 cm de altura), com fundo de arame, para permitir acesso às patas destes animais. Estes foram inicialmente habituados à gaiola por 30 minutos antes de iniciar os ensaios. Antes da estimulação da pata, os animais estavam quietos, sem praticar movimento exploratório, sem estar defecando e/ou urinando no momento da aferição, além de não estarem descansando sobre suas

patas.

O analgesímetro (von Frey) usado para estimular as patas do animal consiste de um transdutor de força (sustentado pela mão do avaliador) contendo em sua extremidade uma ponta de polipropileno de 0,5 mm<sup>2</sup> de diâmetro (analgesímetro eletrônico von Frey, INSIGHT Equipamentos LTDA, Brasil). A ponta de polipropileno foi colocada perpendicularmente à área central da pata posterior do animal com aumento gradual de pressão, a fim de eliciar um reflexo de flexão seguido de um movimento de retirada. Foram feitas várias estimulações por pata (direita - d e esquerda - e) até o animal apresentar duas medidas similares, sendo esta a forma de determinação final do limiar mecânico de alodinia. O resultado é aferido automaticamente pelo equipamento e expresso em gramas (g).

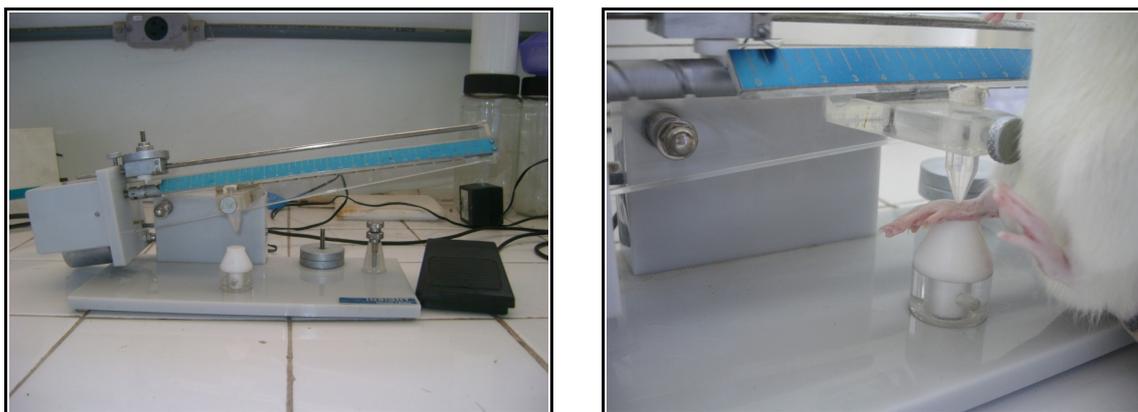


**Figura 5 - Teste de estimulação tátil (von Frey).** A figura a esquerda mostra o analgesímetro eletrônico von Frey. A figura a direita mostra o momento em que a ponta de polipropileno é colocada perpendicularmente à área central da pata posterior do animal com aumento gradual de pressão, a fim de eliciar um reflexo de flexão seguido de um movimento de retirada.

#### 4.9.2 Teste de compressão de pata (Randall-Selitto)

Para avaliar a hiperalgesia, foi utilizado um teste de compressão da pata de ratos desenvolvido por Randall e Selitto (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/seg), é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior direita do animal e interrompida quando este retirar a pata ou apresentar reação de “retirada” do membro, considerando-se o que ocorrer primeiro. O limiar de dor foi representado como a força (g) necessária para induzir essas reações.

O equipamento utilizado consiste de uma superfície pontiaguda ligada a um pequeno motor que desloca um sistema de pesos, exercendo diferentes pressões mecânicas. Estas pressões foram representadas por cargas de pesos diferentes que variam entre 10 a 30 g, exercendo assim uma carga sobre a pata do animal que pode variar de 0 a 750 g.



**Figura 6 – Teste de compressão da pata (Randall-Selitto)** – a figura a esquerda mostra o aparelho Randall-Selitto. Já a figura a direita mostra a realização do teste quando uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior direita do animal.

#### 4.10 Tratamentos experimentais

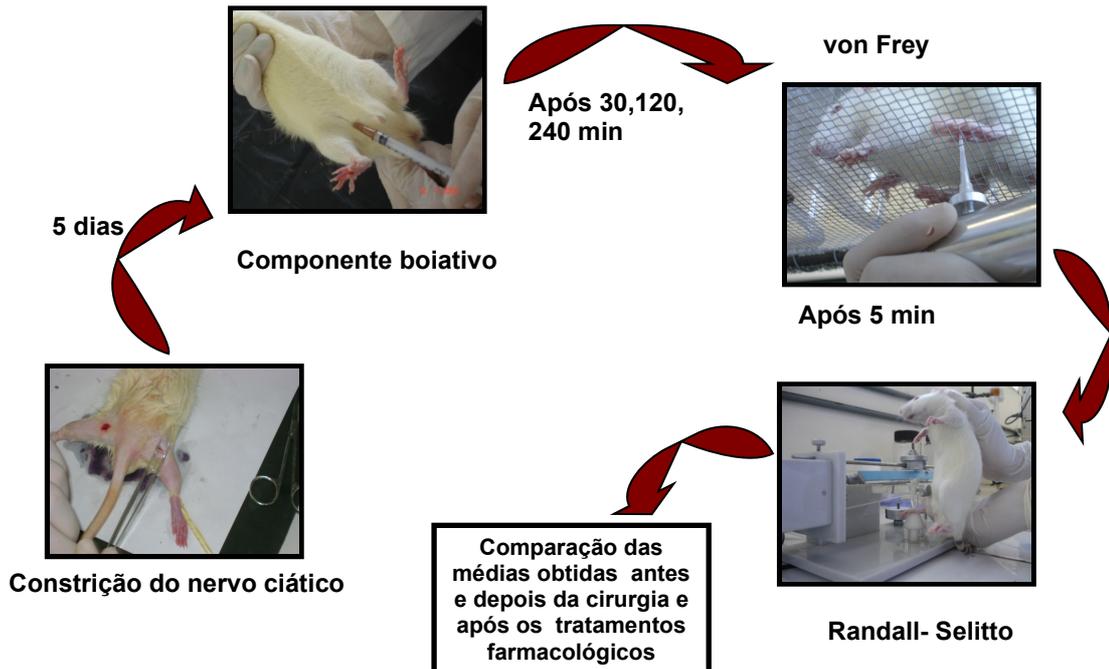
Os animais foram, inicialmente, submetidos aos testes de estimulação tátil (von Frey) e compressão da pata (Randall-Selitto) para verificar o limiar de dor dos animais antes da cirurgia (controle sem cirurgia- CSC). Após 24 horas, foi feita a indução da dor neuropática experimental. Para indução da dor neuropática, o animal passou por uma cirurgia de constrição crônica do nervo ciático na pata direita. A pata esquerda sofreu o mesmo procedimento, mas não a constrição do nervo ciático, sendo considerado como controle falso operado (sham).

Após sete dias da cirurgia (REIS; ROCHA, 2006) os mesmos animais foram submetidos ao testes de estimulação tátil (von Frey) e compressão da pata (Randall-Selitto) para verificar se a cirurgia foi capaz de induzir a dor neuropática na que sofreu constrição do nervo. Os animais que apresentaram a dor neuropática foram selecionados para compor os grupos experimentais (n=6).

Uma hora após a formação dos grupos, os animais receberam o componente bioativo nas doses de 1,0; 2,5; 5,0 e 10 mg/kg por via intraperitoneal. Os testes de estimulação tátil e da compressão da pata foram realizados 30, 120 e 240 min após a administração do componente. O componente bioativo também foi administrado por via oral nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg e após 60, 120 e 240 min da ingestão do composto em estudo foram realizados os testes de estimulação tátil e de compressão da pata.

Para comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo na dor neuropática, foram usados fármacos que são utilizados no tratamento desta dor como: analgésicos opíodes (morfina e codeína); anticonvulsivantes (carbamazepina); antidepressivos tricíclicos (amitriptilina); analgésicos (dipirona); anti-inflamatórios não esteroidais (diclofenaco de sódio) e esteroides (prednisona). Primeiramente foram selecionados os animais que apresentaram a dor neuropática para compor os grupos experimentais ( $n=6$ ). Uma hora após a formação dos grupos, os animais receberam por via intraperitoneal: morfina (5mg/kg), carbamazepina (60mg/kg), codeína (30 mg/kg), amitriptilina, (30mg/kg), dipirona sódica (60 mg/kg), diclofenaco sódico (10 mg/kg) e prednisona (60 mg/kg). Os testes de estimulação tátil e da compressão da pata foram realizados 30, 120 e 240 min após a administração de cada fármaco (BOMHOLT; MIKKELSEN; BLACKBURN-MUNRO, 2005; ERICHSEN, et al 2005; GUITIERREZ et al., 2008; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008).

Para verificar a participação do sistema opióide no mecanismo de ação da dor neuropática do componente bioativo, foi utilizado a naloxona, que é um bloqueador inespecífico dos receptores opióides. Os animais foram pré-tratados com este bloqueador, trinta minutos antes da aplicação do componente bioativo, na dose de 5 mg/kg (i.p.). Os testes de estimulação tátil e de compressão da pata foram realizados 30, 120 e 240 min após a administração de cada fármaco. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle positivo que foi tratado com morfina (5 mg/kg- i.p.)



**Figura 7- Protocolo dos tratamentos experimentais.** Após sete da cirurgia de constrição crônica do nervo ciático foram realizados os tratamentos experimentais. O mesmo protocolo foi realizado para o estudo do componente bioativo e dos medicamentos clássicos usados no tratamento da dor neuropática bem como para verificar a participação do sistema opióide no mecanismo de ação do componente bioativo.

#### 4.11 Análise Estatística

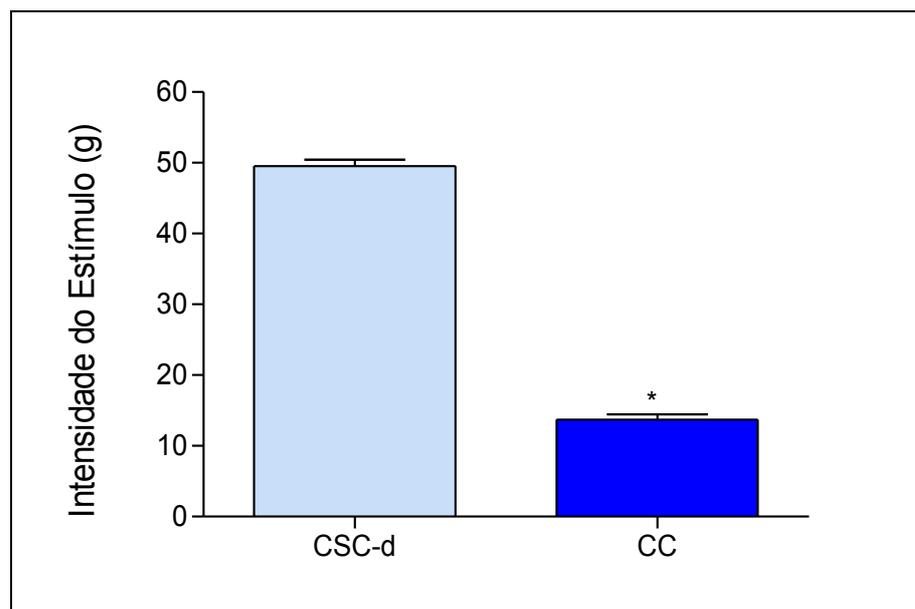
Os dados obtidos experimentalmente foram expressos como Médias ( Erro Padrão da Média (E.P.M). As diferenças estatísticas foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para as comparações múltiplas e, teste t de Student para comparações de apenas dois grupos. Foi utilizado o software

Graph Pad Prism®, versão 5.0, Copyright© foi utilizado. O critério de significância para todos os casos foi de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dor neuropática experimental induzida por constrição crônica do nervo ciático.

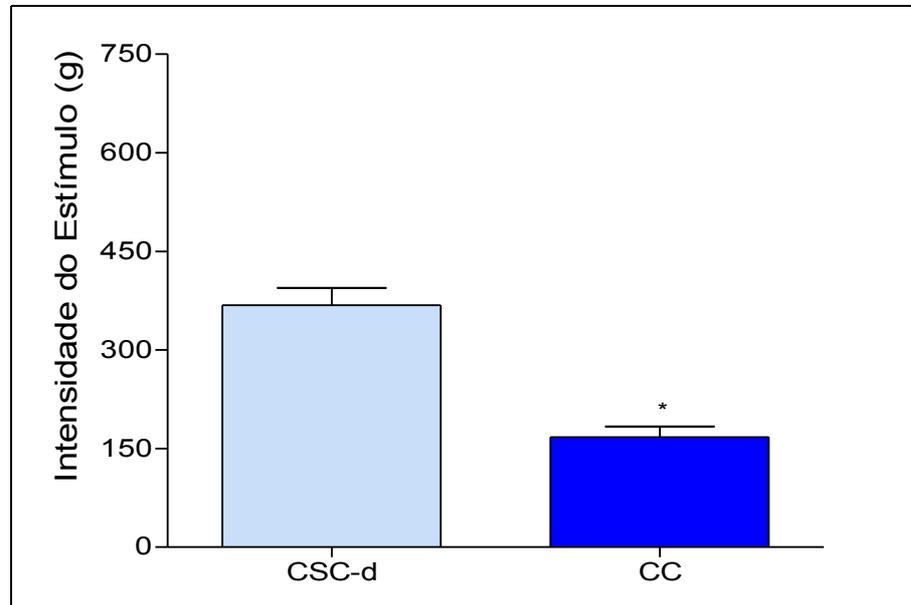
Para verificar a validade do método de indução da dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático, os animais foram submetidos aos testes de estimulação tátil (von Frey) e compressão da pata (Randall - Selitto), antes e após a cirurgia. Os animais que foram submetidos ao teste de estimulação tátil (von Frey) antes da cirurgia apresentaram um limiar nociceptivo de  $49,55 \pm 0,86$  g. Esses mesmos animais, após a cirurgia, mostraram uma redução significativa do limiar nociceptivo ( $14,25 \pm 0,46$  g), caracterizando o processo de alodinia mecânica. (Figura 8).



**FIGURA 8 – Alodinia mecânica induzida por constrição crônica do nervo ciático.** A figura mostra o limiar de dor do animal antes e depois da cirurgia frente a estímulos táteis não-nocivos, evidenciando o surgimento do fenômeno de alodinia mecânica pelo método de estimulação tátil (von Frey). O teste estatístico utilizado foi teste “t student”. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao CSC-d (controle sem cirurgia/pata direita); CC – controle com cirurgia/pata direita);

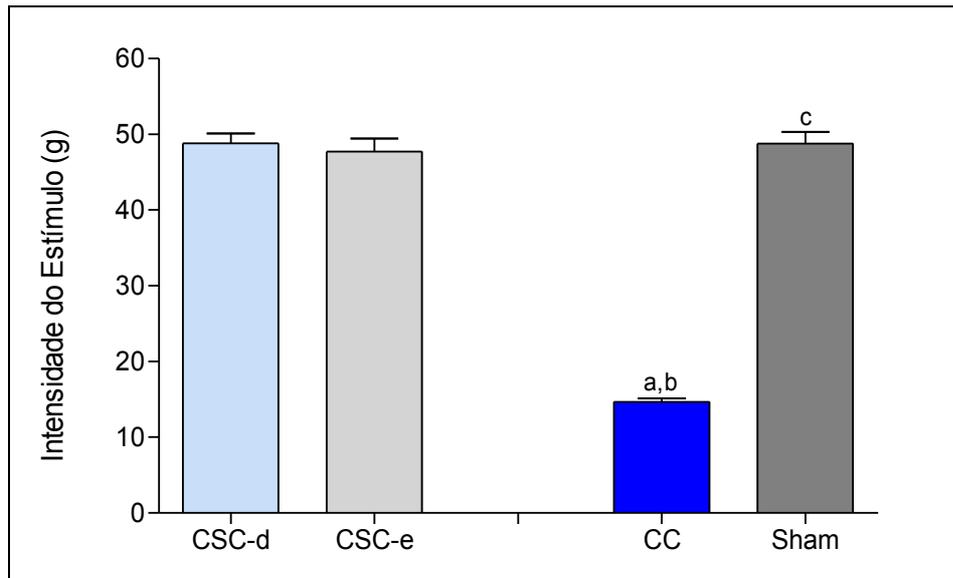
No teste de compressão da pata (Randall–Selitto), verificou-se que o animal antes da cirurgia suportava um peso de  $368,01 \pm 26,52$  g e, após a constrição do nervo, passou a suportar somente  $167,10 \pm 16,02$  g, demonstrando uma redução significativa no seu limiar de dor para estímulos nocivos, o que caracteriza o

fenômeno de hiperalgesia (Figura 9). Esses resultados, portanto, validam este método para o estudo experimental da dor neuropática.

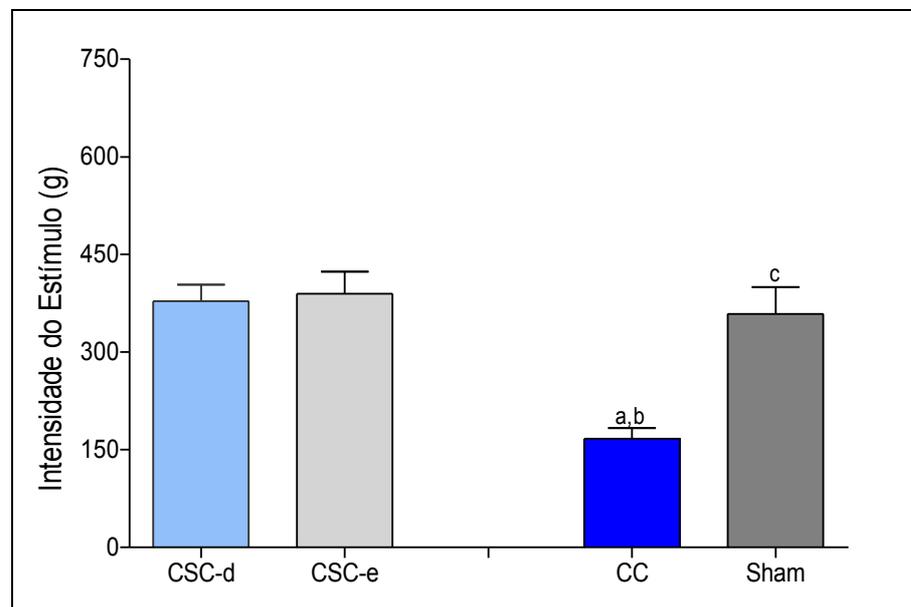


**Figura 9 – Hiperalgesia mecânica induzida por constrição crônica do nervo ciático.** A figura mostra o limiar de dor do animal antes e depois da cirurgia. A hiperalgesia mecânica foi determinada pelo teste de compressão da pata (Randall-sellito). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e teste t “student” com  $p < 0,05$ . Média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$  para cada grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao CSC-d (controle sem cirurgia/pata direita); CC – controle com cirurgia/pata direita.

Com a finalidade de comprovar que a dor induzida não é devido ao estresse provocado pelo procedimento cirúrgico e sim pela constrição do nervo, esse foi realizado nas duas patas, mas somente a direita sofreu a constrição crônica do nervo ciático. A pata que não sofreu constrição do nervo (esquerda) não apresentou, no teste de estimulação tátil (von Frey), diferença significativa no limiar de dor antes ( $48,75 \pm 1,58$  g) e depois ( $47,71 \pm 1,76$  g) da cirurgia (Figura 10). No teste de compressão da pata (Randall – Sellitto), a pata esquerda suportou um peso de  $389,52 \pm 34,18$  g antes de cirurgia e um peso de  $358,60 \pm 41,12$  g após a cirurgia, demonstrando que não houve alteração significativa no limiar nociceptivo da pata em que não foi realizada a constrição do nervo ciático (Figura 11). Já a pata direita, por sua vez, apresentou uma redução do limiar nociceptivo de aproximadamente 71% no teste de estimulação tátil e de 54% no teste de compressão da pata (Figura 10 e 11).



**FIGURA 10—Comparação do limiar de dor nos animais antes e depois da constrição crônica do nervo ciático na alodinia mecânica.** A comparação do limiar de dor foi feita nas patas dos animais (direita e esquerda) antes e depois da cirurgia pelo teste de estimulação tátil (von Frey). A constrição crônica do nervo ciático foi realizada na pata direita do animal enquanto a pata esquerda constituiu o controle falso operado (*sham*). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CSC-d (controle sem cirurgia/pata direita); <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CSC-e (controle sem cirurgia/pata esquerda), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CC (controle com cirurgia/pata direita).



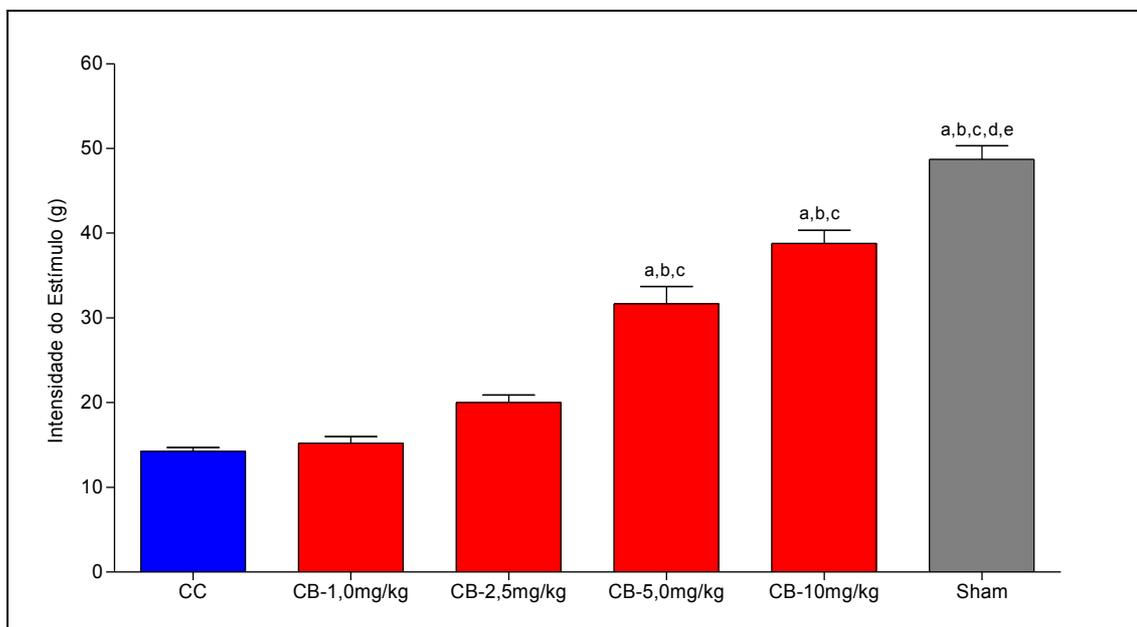
**Figura 11 – Comparação do limiar de dor nos animais antes e depois da constrição crônica do nervo ciático na hiperalgesia mecânica.** A comparação do limiar de dor foi feita nas patas dos animais (direita e esquerda) antes e depois da cirurgia pelo teste de compressão da pata (Randall-Sellito). A constrição crônica foi realizada na pata direita do animal enquanto a pata esquerda constituiu o controle *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CSC-d (controle sem cirurgia/pata direita); <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CSC-e (controle sem cirurgia/pata esquerda), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CC (controle com cirurgia/pata direita).

## 5.2 Componente bioativo apresenta atividade antinociceptiva sobre alodinia mecânica.

### 5.2.1 Efeito antinociceptivo do componente bioativo sobre alodinia mecânica quando administrado por via intraperitoneal.

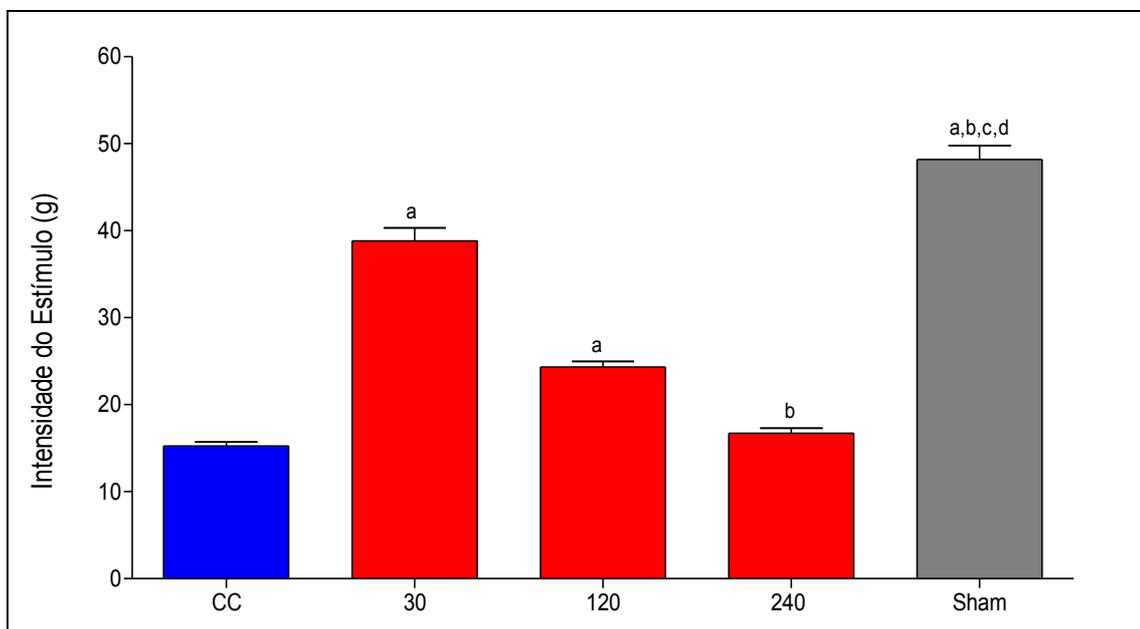
Os ratos tratados com o componente bioativo nas doses de 1; 2,5; 5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) foram avaliados 30 min após a aplicação desse componente pelo teste de estimulação tátil (von Frey), que consistiu em verificar a sensibilidade tátil frente a um aumento gradual de pressão sobre a região plantar da pata do animal.

Antes do tratamento com o componente bioativo, os animais com constrição crônica do nervo ciático foram submetidos ao teste e apresentaram um limiar de dor de  $14,05 \pm 0,86$  g (CC). Resultado semelhante foi observado após o tratamento com o componente bioativo nas doses de 1,0 mg/kg ( $15,24 \pm 0,76$  g) e 2,5 mg/kg ( $20,03 \pm 0,84$  g), não apresentando diferença significativa em relação ao CC. Já nos animais que receberam o componente bioativo nas doses de 5,0 mg/kg ( $31,68 \pm 2,06$  g) e 10 mg/kg ( $38,81 \pm 1,51$  g) apresentaram um aumento significativo do limiar nociceptivo em relação ao mesmo controle, mas não houve diferença significativa entre elas. O controle *sham* (falso-operado) apresentou limiar nociceptivo de  $48,75 \pm 1,58$  g, sendo significativamente diferente em relação a todos os outros grupos (Figura 12).



**Figura 12– Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na alodinia mecânica.** O componente bioativo (1; 2.5; 5 e 10 mg/kg) foi administrado 30 min antes do teste de estimulação tátil (von Frey). A atividade antinociceptiva do componente bioativo (CB) foi avaliada pelo aumento da pressão (g) suportado pela pata do animal a um estímulo tátil não-nocivo quando comparado com o controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o controle sham (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação à CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB- 1,0 mg/kg, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB- 2,5 mg/kg, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao CB- 5,0 mg/kg, <sup>e</sup>p<0,05 em relação ao CB - 10mg/kg.

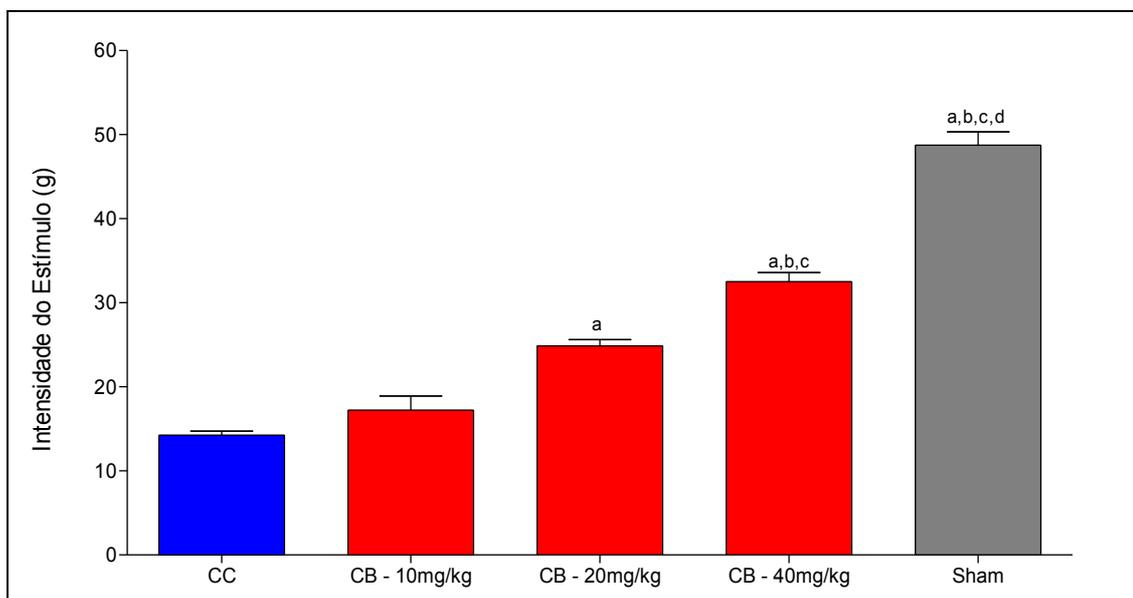
O tempo de duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo na alodinia mecânica foi observado com a maior dose, 10 mg/kg. O controle com constrição do nervo ciático apresentou uma sensibilidade tátil de  $14,05 \pm 0,86$  g e  $15,23 \pm 0,45$  g. Já o grupo tratado com a dose de 10 mg/kg apresentou uma redução significativa da sensibilidade tátil no tempo 30 min ( $38,81 \pm 1,51$  g) e 120 min ( $24,75 \pm 0,61$  g), visto que aumentou o limiar nociceptivo, sendo que este efeito desapareceu no tempo 240 min ( $16,71 \pm 0,79$  g). O controle *sham* ( $48,18 \pm 1,57$  g) apresentou diferença significativa em relação a todos os tempos e ao controle CC (Figura 13).



**FIGURA 13 – Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na alodinia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg) foi administrado i.p, 30min antes do teste de estimulação tátil (von Frey). A intensidade do estímulo doloroso sentido pela pata do animal a um estímulo tátil não-nocivo foi medida antes (tempo zero) e após 30, 120 e 240 min da aplicação do componente bioativo (CB) e comparada ao controle com constrição do nervo ciático sem tratamento (CC) e controle *sham* (falso- operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo) (n=6), <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 30 min, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 120 min, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 240 min.

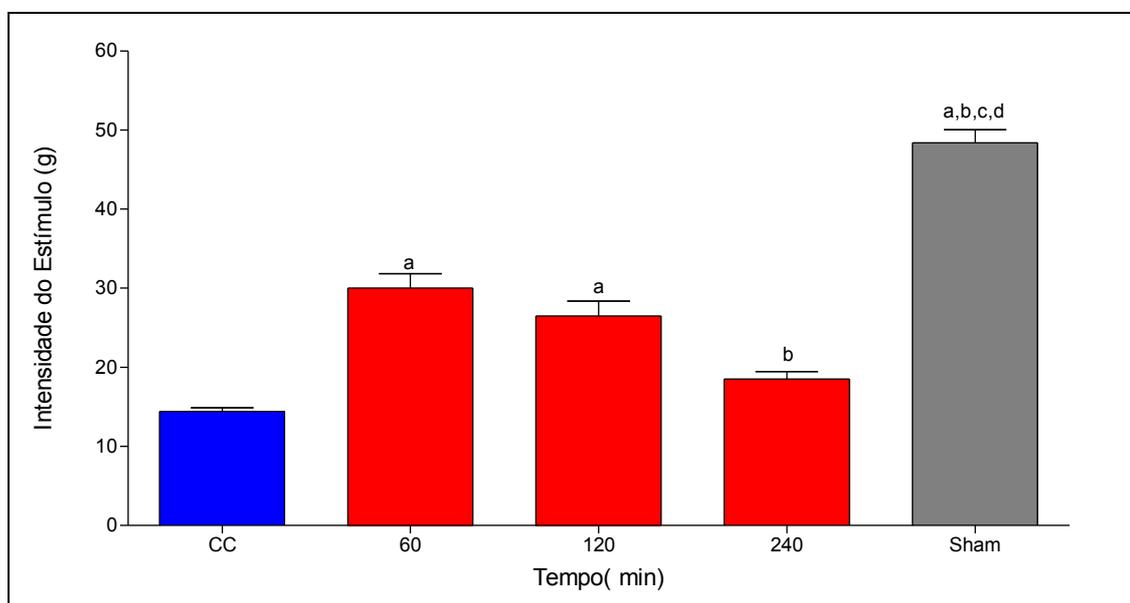
### 5.2.2 Efeito antinociceptivo do componente bioativo sobre alodinia mecânica quando administrado por via oral.

O efeito antinociceptivo do componente bioativo sobre alodinia mecânica também foi verificado por via oral nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. Após os tratamentos com o componente bioativo, observou-se que a dose de 10 mg/kg (17,24  $\pm$  1,64 g) não apresentou diferença significativa no limiar de dor em relação ao controle com cirurgia crônica do nervo ciático (15,23  $\pm$  0,45 g). As doses de 20 mg/kg (24,84  $\pm$  0,77 g) e de 40 mg/kg (32,50  $\pm$  1,09 g) mostraram um aumento significativo do limiar de dor quando comparado ao mesmo controle. O controle *sham* (48,74  $\pm$  1,59 g) apresentou diferença significativa em relação a todas as doses testadas (Figura 14).



**FIGURA 14 – Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na alodinia mecânica.** O componente bioativo (10, 20 e 40 mg/kg) foi administrado 60min antes do teste de estimulação tátil (von Frey). A atividade antinociceptiva do componente bioativo (CB) foi avaliada pelo aumento da pressão (g) suportado pela pata do animal a um estímulo tátil não-nocivo quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB- 10 mg/kg, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB- 20 mg/kg, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao CB- 40 mg/kg.

Com relação a duração da atividade antinociceptiva do componente bioativo por via oral, também na maior dose (40 mg/kg), foi verificada um aumento na sensibilidade tátil no tempo de 60 min (30,02  $\pm$  1,81 g), permanecendo no tempo de 120 min (26,50  $\pm$  1,86 g) e desaparecendo no tempo de 240 min (18,52  $\pm$  0,95 g) quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (14,42  $\pm$  0,44 g). O controle *sham* (48,40  $\pm$  1,64 g) apresentou efeito significativo em relação a todos os tempos e ao CC (Figura 15).



**FIGURA 15 – Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na alodinia mecânica.** O componente bioativo (CB) foi administrado na dose de 40 mg/kg 60min antes do teste de estimulação tátil (von Frey). A intensidade do estímulo doloroso sentido pela pata a um estímulo tátil não-nocivo foi medida antes (tempo zero) e após 60, 120 e 240 min da aplicação do componente bioativo e avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal nos diferentes tempos analisados quando comparado ao controle com constrição do nervo ciático (CC) e controle *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em

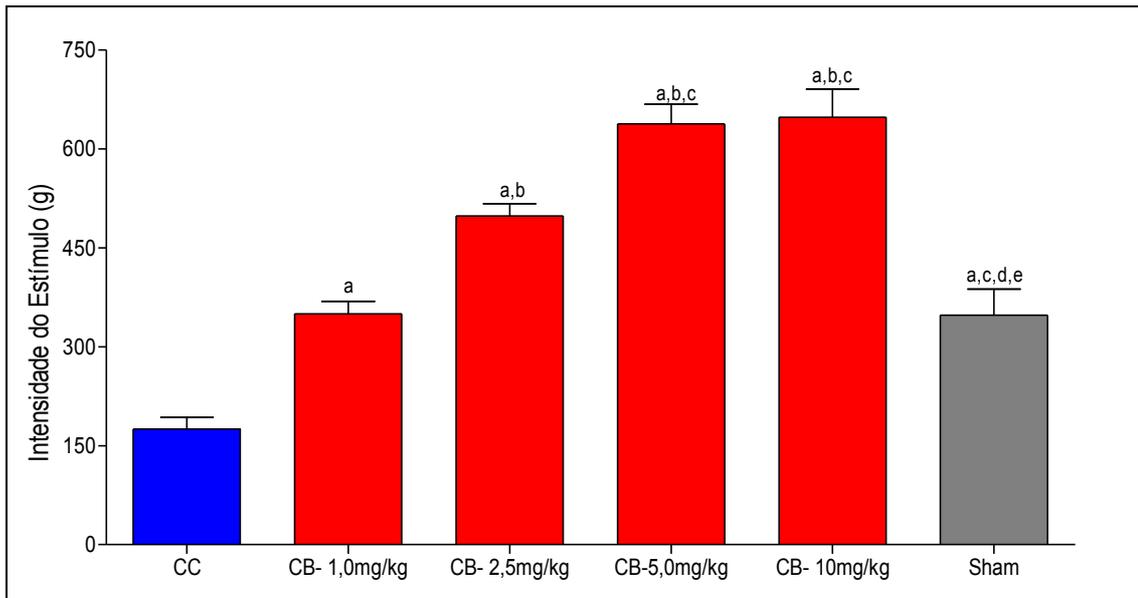
relação ao tempo de 60 min, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 120 min, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 240 min.

### **5.3 Componente bioativo apresenta atividade antinociceptiva sobre hiperalgesia mecânica.**

#### **5.3.1 Efeito do componente bioativo sobre a hiperalgesia mecânica quando administrado por via intraperitoneal**

A atividade antinociceptiva do componente bioativo no processo de hiperalgesia mecânica foi verificada pelo aumento na intensidade da carga suportada pelo animal no teste de compressão da pata (Randall- Selitto). Para tal verificação, os animais foram tratados com o componente bioativo nas doses de 1; 2,5; 5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal.

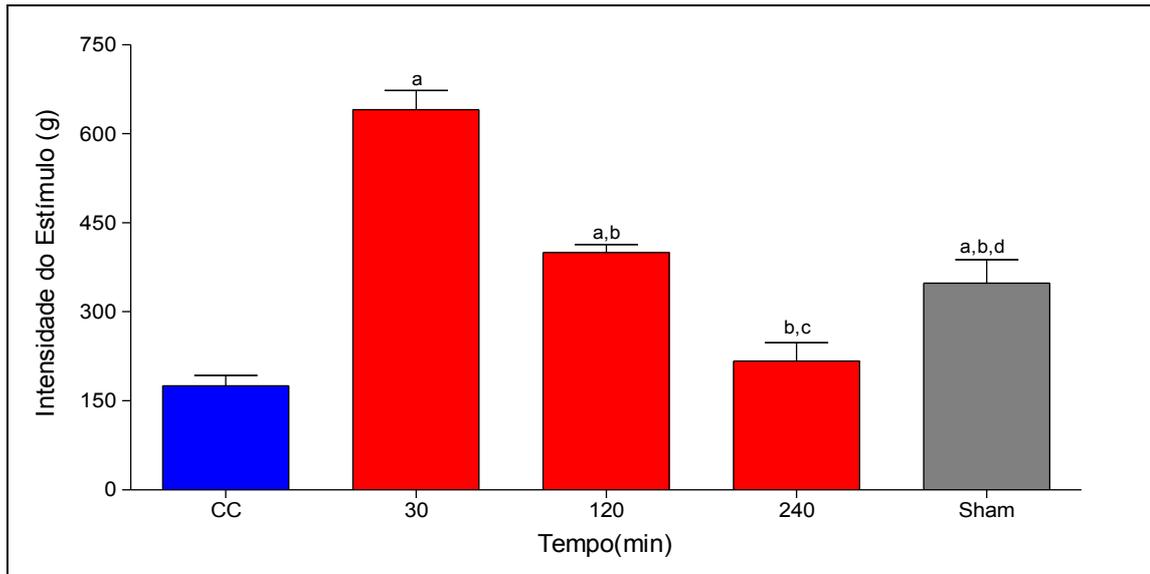
Antes do tratamento com várias doses do componente bioativo, o teste foi realizado nos animais para verificar a intensidade de carga suportada após a constrição do nervo ciático. Este apresentou um limiar de dor de  $175,01 \pm 17,73$  g. Após o tratamento com componente bioativo, observou-se que todas as doses estudadas: 1 mg/kg ( $350,02 \pm 19,16$  g), 2,5 mg/kg ( $498,30 \pm 30,79$  g), 5 mg/kg ( $637,90 \pm 29,93$  g) e 10 mg/kg ( $648,01 \pm 42,71$  g), apresentaram um aumento significativo no limiar de dor em relação ao CC. Quando comparadas entre si, as doses de 1; 2,5 e 5 mg/kg apresentaram diferença significativa, enquanto que a dose de 10 mg/kg somente apresentou diferença significativa com relação à dose de 1 e 2,5 mg/kg. Também foi observado que os animais, quando tratados com o componente bioativo nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg, foram capazes de suportar uma intensidade da carga significativamente superior aos valores obtidos no controle *sham* ( $348,02 \pm 39,72$  g) (Figura 16).



**Figura 16–Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (CB) foi administrado nas doses de 1; 2,5; 5 e 10 mg/kg i.p, 30min antes do teste de compressão da pata (Randall- Selitto). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o sham (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB- 1 mg/kg, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB- 2,5 mg/kg, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao CB- 5 mg/kg, <sup>e</sup>p<0,05 em relação ao CB- 10 mg/kg.

Como no teste de estimulação tátil (von Frey), o tempo de duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo, na via i.p., também foi observado na maior dose, 10 mg/kg. Observou-se que o efeito antinociceptivo do componente bioativo, no tempo 30 min ( $648,64 \pm 32,16$  g) e 120 min ( $400,02 \pm 13,59$  g), foi significativo em relação ao CC ( $175,01 \pm 17,73$  g), desaparecendo no tempo 240 min ( $216,70 \pm 31,56$  g).

Quando comparados ao controle *sham*, foi verificada diferença significativa nos tempos 30 min e 240 min, não observando essa mesma resposta no tempo 120 min (Figura 17).



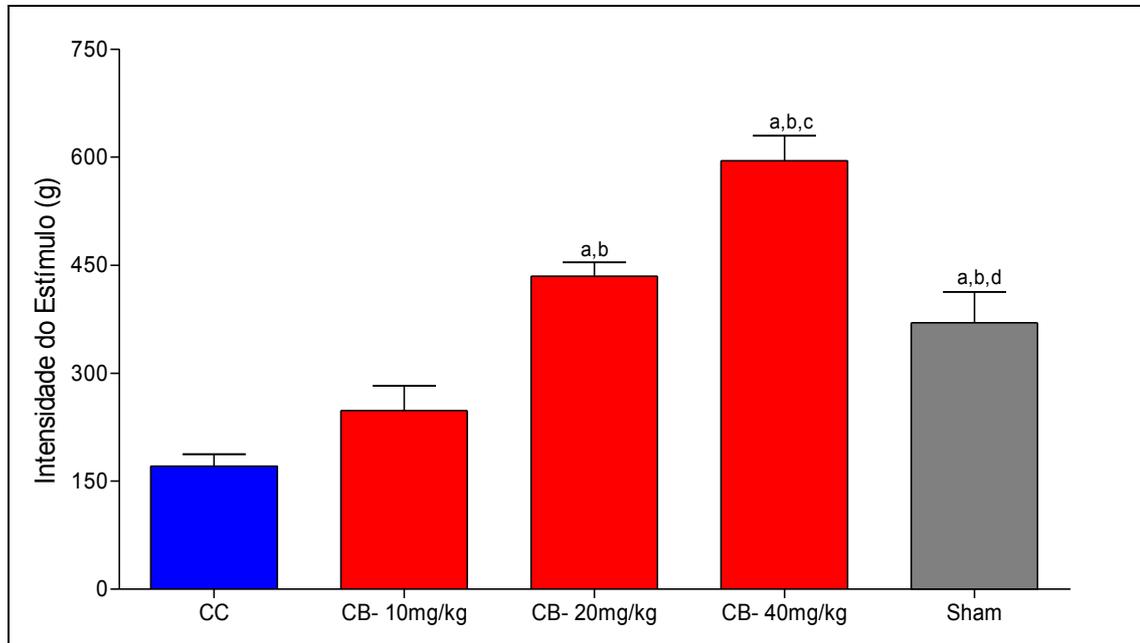
**FIGURA 17– Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via intraperitoneal na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg) foi administrado i.p, 30min antes do teste de compressão da pata (Randall - Selitto). A intensidade do estímulo suportada pela pata do animal foi medida antes (tempo zero) e após 30, 120 e 240 min da aplicação do componente bioativo (CB) e avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal nos diferentes tempos analisados quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 30 min, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 120 min, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 240 min.

### 5.3.2 Efeito do componente bioativo sobre a hiperalgesia mecânica quando administrado por via oral

O efeito antinociceptivo do componente bioativo também foi verificado por via oral nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. O teste de compressão da pata foi realizado após 60 min da aplicação do componente, devido ao tempo de absorção.

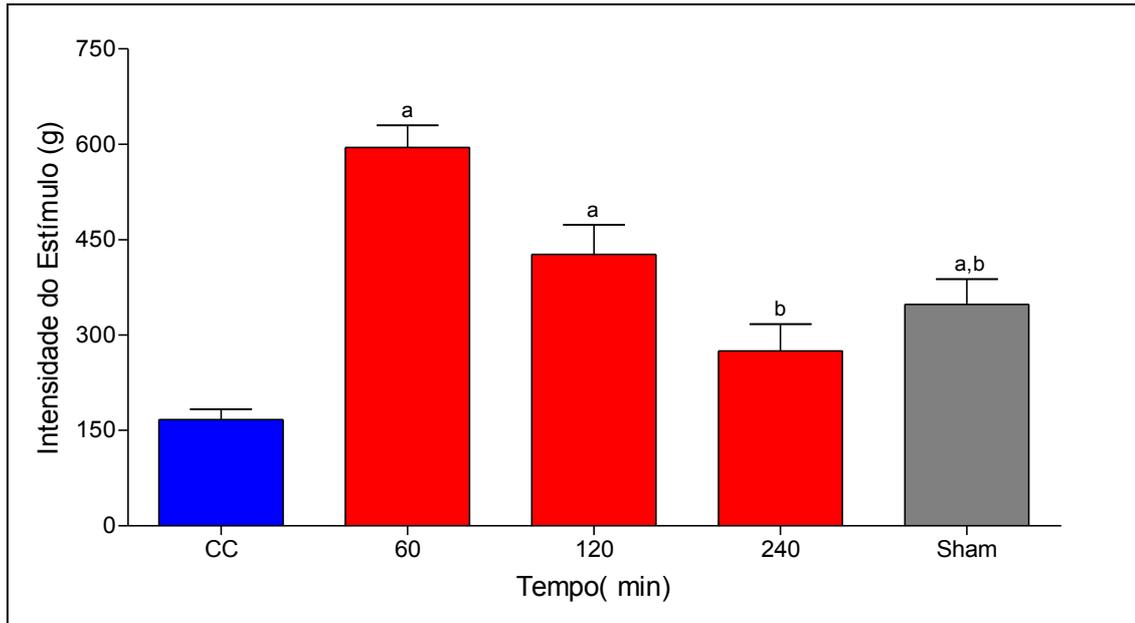
Antes do tratamento com o componente bioativo, o animal apresentou um limiar nociceptivo de  $170,80 \pm 16,85$  g. Após os tratamentos, foi observado que a dose de 10 mg/kg ( $248,01 \pm 34,41$  g) não apresentou diferença significativa com relação ao CC, enquanto que as doses de 20 mg/kg ( $435,00 \pm 18,77$  g) e 40 mg/kg ( $595,02 \pm 34,67$  g) mostraram um aumento significativo do limiar de dor quando comparados com o mesmo. Quando comparadas entre si, todas as doses apresentaram diferença significativa.

Foi observado também que os animais tratados com o a dose de 40mg/kg conseguiram suportar uma intensidade da carga significativamente superior aos valores obtidos no controle *sham* ( $370,03 \pm 42,67$  g) (Figura 18).



**FIGURA 18– Efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (CB) foi administrado nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, 60min antes do teste de compressão da pata (Randall- Selitto). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB- 10mg/kg, <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB- 20mg/kg, <sup>d</sup>p<0,05 em relação ao CB- 40mg/kg.

O tempo de duração da atividade antinociceptiva do componente bioativo, por via oral, foi observado na maior dose efetiva, 40 mg/kg. Este apresentou um comportamento semelhante ao observado no tempo de duração do componente quando aplicado via i.p. Foi verificado um efeito antinociceptivo no tempo 60 min ( $595,05 \pm 34,67$  g) e 120 min ( $426,70 \pm 46,38$  g), desaparecendo no tempo 240 min ( $275,02 \pm 41,88$  g) quando comparados ao CC ( $167,01 \pm 16,02$  g) (Figura 19).



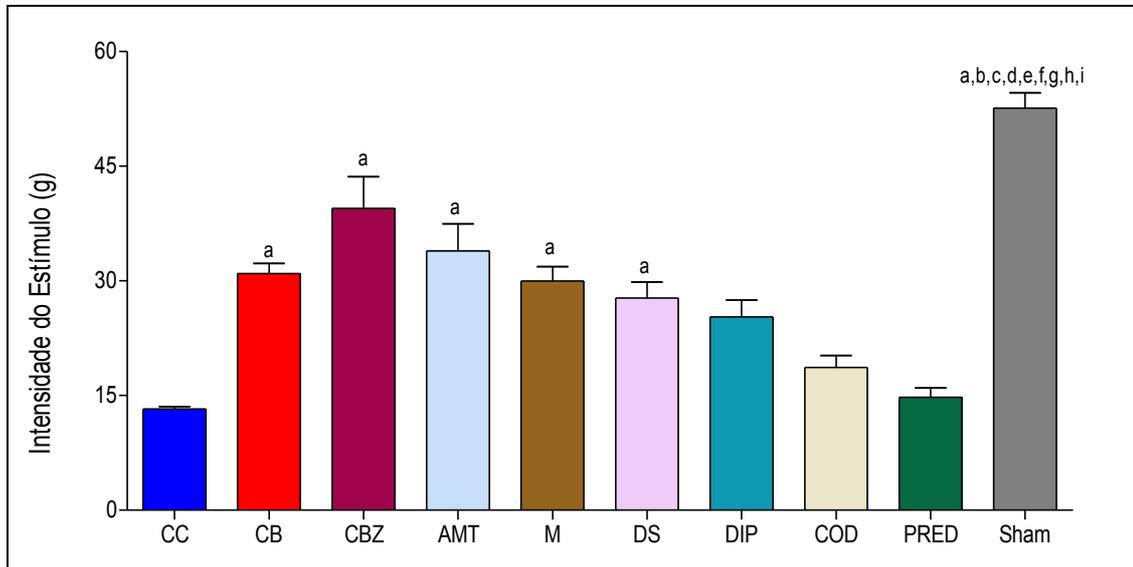
**FIGURA 19 – Duração do efeito antinociceptivo do componente bioativo administrado por via oral na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (40mg/kg) foi administrado 60min antes do teste de compressão da pata (Randall-Selitto). A intensidade do estímulo suportada pela pata do animal foi medida antes (tempo zero) e após 60, 120 e 240 min da aplicação do componente bioativo (CB) e avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal nos diferentes tempos analisados quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o sham (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test.*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao tempo de 60 min.

#### 5.4 Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo com fármacos clássicos utilizados na dor neuropática

O efeito antinociceptivo do componente bioativo foi comparado com algumas classes de medicamentos usadas atualmente no controle da dor neuropática, como morfina e codeína (drogas opióides), carbamazepina (anticonvulsivante), amitriptilina (antidepressivo), prednisona (corticosteróide), dipirona (analgésico não estereoidal) e diclofenaco sódico (anti-inflamatório).

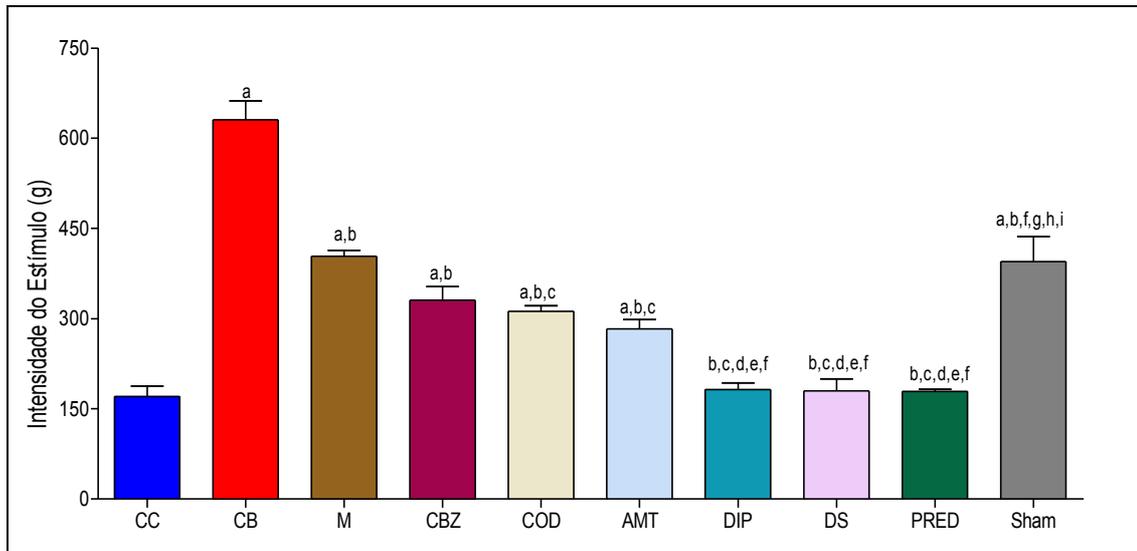
No teste de estimulação tátil (von Frey), os animais apresentaram, antes de receberem os tratamentos, um limiar nociceptivo de  $13,21 \pm 2,05$  g. Após a administração do componente bioativo, este limiar aumentou significativamente para  $29,20 \pm 1,86$  g. A morfina ( $29,99 \pm 1,86$  g), carbamazepina ( $39,45 \pm 4,86$  g), amitriptilina ( $33,96 \pm 3,51$  g) e diclofenaco sódico ( $27,75 \pm 2,08$  g) também mostraram um aumento significativo no limiar nociceptivo quando comparado ao CC. Já a dipirona ( $25,26 \pm 2,24$  g), a codeína ( $18,64 \pm 1,59$  g) e a prednisona ( $14,78 \pm$

1,21 g) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao mesmo controle. Já quando comparados ao controle *sham* ( $56,64 \pm 1,96$  g), todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 20).



**Figura 20—Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo com drogas utilizadas no tratamento de dor neuropática na alodinia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg), carbamazepina (60 mg/kg), amitriptilina (30mg/kg), morfina (5 mg/kg), diclofenado sódico (10 mg/kg), dipirona (60 mg/kg), codeína (30 mg/kg), prednisona (60 mg/kg) foram administrados i.p, 30 min antes do teste de estimulação tátil pelos filamentos de von Frey. A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal quando comparado ao quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB (componente bioativo), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CBZ (carbamazepina), <sup>d</sup>p<0,05 em relação a AMT (amitriptilina), <sup>e</sup>p<0,05 em relação a M (morfina), <sup>f</sup>p<0,05 em relação DS (diclofenaco sódico), <sup>g</sup>p<0,05 em relação a DIP (dipirona), <sup>h</sup>p<0,05 em relação COD (codeína), <sup>i</sup>p<0,05 em relação a PRED (prednisona).

No teste de compressão da pata (Randall-Selitto), o componente bioativo ( $630,70 \pm 31,44$  g) juntamente com morfina ( $403,6 \pm 9,92$  g), carbamazepina ( $330,82 \pm 22,54$  g), codeína ( $311,80 \pm 9,48$  g) e amitriptilina ( $284,10 \pm 17,13$  g) apresentaram diferença significativa quando comparados com o CC ( $170,8 \pm 16,85$  g). A dipirona ( $182,01 \pm 10,94$  g), o diclofenaco sódico ( $179,40 \pm 20,37$  g) e a prednisona ( $178,92 \pm 3,88$  g) não mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao mesmo. O controle *sham* ( $395,00 \pm 41,33$  g) apresentou diferença significativa quando comparado com a dipirona, o diclofenaco sódico, a prednisona, o CC e o componente bioativo (figura 21).



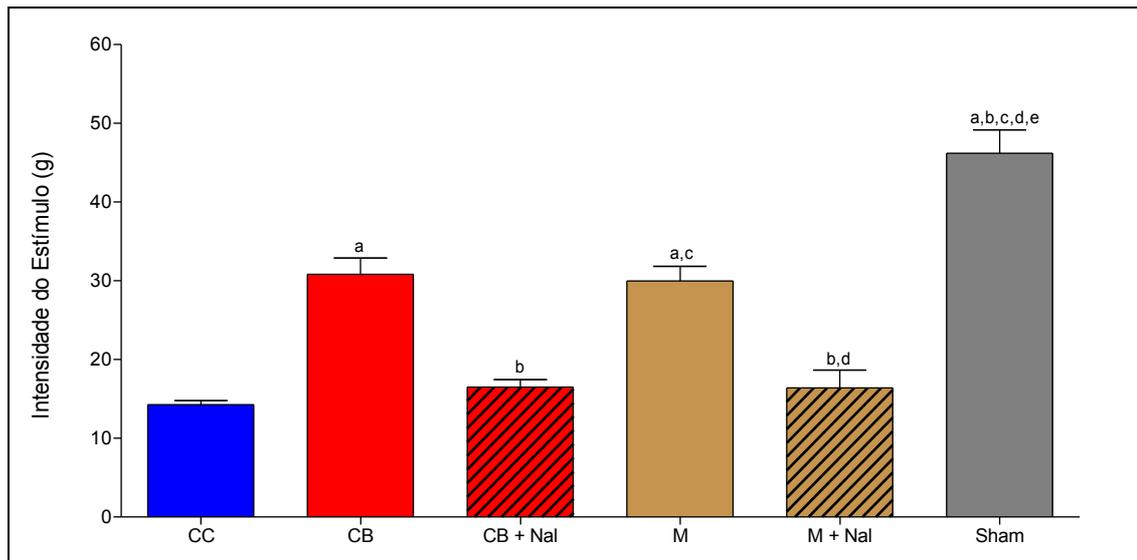
**Figura 21– Comparação do efeito antinociceptivo do componente bioativo com drogas utilizadas no tratamento de dor neuropática na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg), morfina (5 mg/kg), carbamazepina (60 mg/kg), codeína (30 mg/kg), amitriptilina (30 mg/kg), dipirona (60 mg/kg), diclofenado sódico (10 mg/kg) e prednisona (60mg/kg) foram administrados i.p, 30 min antes do teste de compressão da pata (Randall- Selitto). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal após 30min da aplicação do componente bioativo quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB (componente bioativo), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao M (morfina), <sup>d</sup>p<0,05 em relação a CBZ (carbamazepina), <sup>e</sup>p<0,05 em relação a COD (codeína), <sup>f</sup>p<0,05 em relação a AMT (amitriptilina), <sup>g</sup>p<0,05 em relação a DIP (dipirona), <sup>h</sup>p<0,05 em relação DS (diclofenaco sódico), <sup>i</sup>p<0,05 em relação a PRED (prednisona).

### 5.5 Bloqueio do efeito antinociceptivo do componente bioativo pela Naloxona

Para verificar a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do componente bioativo, foi administrada naloxona, que é um bloqueador inespecífico do sistema opióide, na dose de 5 mg/kg (i.p) 30 min antes da aplicação do componente bioativo (5 mg/kg). Os teste de estimulação tátil (von Frey) e compressão da pata (Randall-Sellito) foram realizados 30 min após aplicação do componente bioativo.

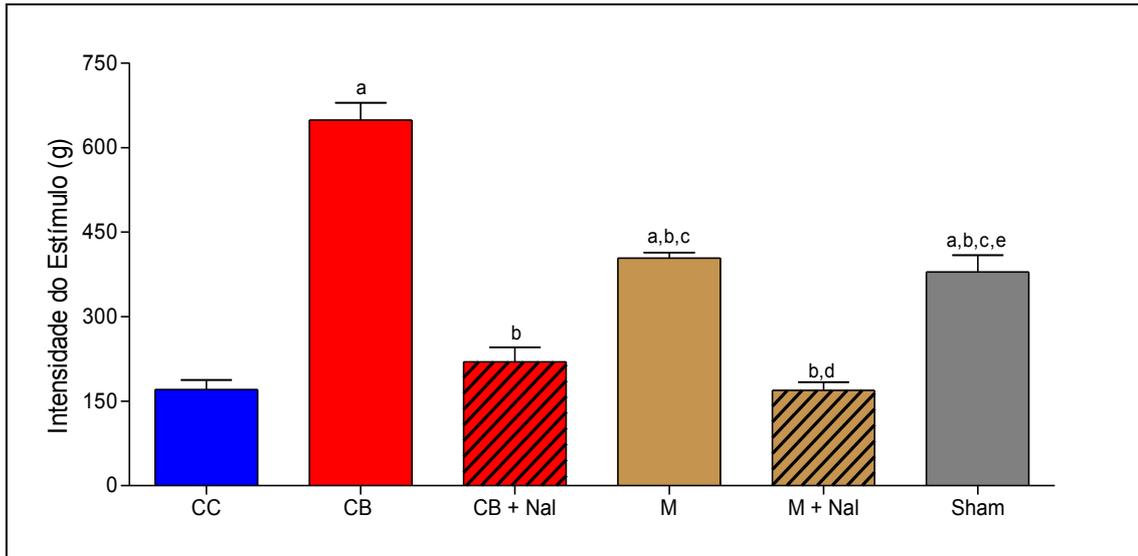
No teste para verificar a alodinia, a naloxona foi capaz de bloquear totalmente o efeito antinociceptivo do componente bioativo ( $16,49 \pm 0,97$  g) quando comparado com grupo que recebeu somente o componente bioativo ( $30,83 \pm 2,05$  g) e com o CC ( $14,49 \pm 2,19$  g). Além disso, foi utilizada a morfina, a qual é a droga padrão de

ação opióide como controle do experimento, com ( $16,39 \pm 2,19$  g) e sem ( $29,99 \pm 1,86$  g) associação com a naloxona. Comparando com o controle *sham* ( $46,21 \pm 2,95$  g), somente a morfina não apresentou efeito significativo (Figura 22)



**Figura 22 – Ação da naloxona sobre o efeito antinociceptivo do componente bioativo na alodinia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg), a naloxona (5 mg/kg) e a morfina (5 mg/kg) foram administrados i.p, 30 min (componente bioativo e morfina) e 60 min (naloxona) antes do teste de estimulação tátil (von Frey). A intensidade do estímulo doloroso sentido pela pata do animal ao leve toque foi medida após 30 min da aplicação do componente bioativo quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*.. Média  $\pm$  E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB (componente bioativo), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB +Nal (componente bioativo + naloxona), <sup>d</sup>p<0,05 em relação à M (morfina), <sup>e</sup>p<0,05 em relação à M + Nal (morfina + naloxona).

Quanto ao teste de hiperalgesia, a naloxona também foi capaz de bloquear a atividade antinociceptiva do componente bioativo ( $252,00 \pm 32,55$  g) quando comparado com o grupo que recebeu apenas o componente ( $648,60 \pm 115,2$  g) e ao CC ( $170,80 \pm 16,85$  g). Como controle foi utilizada a morfina ( $403,60 \pm 9,92$  g) e a naloxona associada à morfina ( $144,00 \pm 9,35$  g). Comparando com o controle *sham* ( $379,50 \pm 29,50$  g), somente a morfina não apresentou efeito significativo (figura 23).



**Figura 23 – Ação do Naloxona sobre o efeito antinociceptivo do componente bioativo na hiperalgesia mecânica.** O componente bioativo (5 mg/kg), a naloxona (5mg/kg) e a morfina (5mg/kg) foram administrados i.p, 30 min (componente bioativo e morfina) e 60 min (naloxona) antes do teste de compressão da pata (Randall- Selitto). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo aumento da intensidade do estímulo doloroso (g) suportado pela pata do animal após a administração do componente bioativo quando comparado ao controle com constrição crônica do nervo ciático (CC) e o *sham* (falso-operado). O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao CC, <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao CB (componente bioativo), <sup>c</sup>p<0,05 em relação ao CB + Nal (componente bioativo + naloxona), <sup>d</sup>p<0,05 em relação à M (morfina), <sup>e</sup>p<0,05 em relação à M + Nal (morfina + naloxona).

## 6 DISCUSSÃO

Toxinas de animais, plantas e microrganismos tem sido foco de inúmeros estudos, principalmente para a descoberta de novas moléculas com potencial uso terapêutico (HARVEY et al., 1998) e possivelmente para a produção de medicamentos a partir dessas substâncias (KARALLIEDDE, 1995). Nas últimas décadas, pesquisas com objetivo de compreender a atividade dos diversos componentes presentes em venenos animais tornou-se maior (MÉNEZ, 1998). As toxinas animais têm sido utilizadas em pesquisas na tentativa de se identificar novas substâncias com propriedades analgésicas (REILLY et al., 1994; CARVALHO, 1995; HARVEY et al., 1998).

No presente trabalho, o componente bioativo foi purificado totalmente em um único passo cromatográfico e em escala preparativa, o que permitiu obter quantidades suficientes deste composto para a realização dos diversos ensaios para estudo da dor neuropática *in vivo*. O rendimento de 5% (p:p) do componente bioativo pode ser considerado muito bom e mostra que este composto é um dos mais abundantes no veneno do sapo *Rhinella jimi*.

Sua estrutura química foi parcialmente determinada pelo CENAUREM e mostrou tratar-se de uma substância de natureza esteroideal o que corrobora com Steyn e Heerden (1998) cujo trabalho aborda o fato de secreções cutâneas de sapos possuírem alto índice desse tipo de substâncias. Ressalta-se ainda que estudos complementares estão sendo realizados para a elucidação da estrutura total deste componente bioativo.

Sabe-se que moléculas presentes em venenos de anfíbios apresentam atividade antinociceptiva, como os peptídeos dermorfinas e deltorfinas, encontrados na pele de rãs da subfamília *Phyllomedusiane*, a caruleína obtida de *Hyla caerulea* e o alcalóide epibatidina isolado de *Epipedobates tricolor* (SPANDE et al., 1992, ZADINA et al., 1997; ZETLER, 1985).

Trabalhos recentes realizados por nosso grupo também mostraram que outros componentes bioativos extraídos da secreção cutânea deste mesmo sapo

apresentam atividade anestésica (PATROCÍNIO, 2000), bem como efeito antinociceptivo na dor aguda (CARVALHO, 2009).

Modelos experimentais em animais para o estudo da dor neuropática têm sido desenvolvidos na tentativa de simular os efeitos clínicos causados por uma lesão neural e, assim, proporcionar uma melhor compreensão fiso-farmacológica dos mecanismos envolvidos na produção, na manutenção e no tratamento de tal dor (PITCHER; RITCHIE; HENRY, 1999).

A constrição crônica do nervo ciático é um modelo bem estabelecido pela literatura, o qual consiste em uma mononeuropatia periférica produzida em ratos adultos por ligaduras constritivas frouxas ao redor do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988). Sugere-se que esta constrição do nervo possa gerar edema intraneural, isquemia local e degeneração axonal (ATTAL, 2000), levando ao desenvolvimento de dor neuropática. Tal modelo reproduz os mecanismos e manifestações neurais de sintomas nociceptivos da dor neuropática observada em humanos (BENNETT; XIE, 1988; DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005). O modelo acima citado foi reproduzido com sucesso no presente estudo, uma vez que reduziu significativamente o limiar nociceptivo dos animais nos testes de estimulação tátil (von Frey) e de compressão da pata (Randall-Selitto).

Um dos sintomas mais frequentemente observado na dor neuropática é a alodinia mecânica, a qual pode se desenvolver após uma injúria neural periférica. Esta se caracteriza por uma hipersensibilidade tátil para estímulos mecânicos normalmente inócuos (WOOLF, 2004).

Trabalhos recentes apresentam componentes isolados de diferentes venenos animais com ação antinociceptiva no fenômeno de alodinia mecânica induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo ciático, quando administrados tanto por via oral quanto por via intraperitoneal (GUTTIERREZ et al., 2008; LIANG et al., 2009; PARK et al, 2008). Em seu trabalho, Gutierrez et al. (2008) mostrou que um peptídeo isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, crotalfina, apresenta efeito antinociceptivo na alodinia mecânica no modelo de constrição crônica do nervo ciático quando administrado por via oral e este efeito perdurou por até 72 h. Já

Liang et al. (2009) realizaram um estudo semelhante e verificaram que najanalgesina extraída do veneno de *Naja naja atra* apresenta efeito antinociceptivo na alodinia mecânica induzida pelo modelo de ligação do nervo ciático quando administrado por via intraperitoneal e que o tempo de duração de sua ação antinociceptiva no teste de estimulação tátil (von Frey) persistiu por uma semana.

No presente trabalho, o componente bioativo mostrou-se eficaz na redução da hipersensibilidade tátil induzida pela constrição crônica do nervo ciático, apresentando ação antinociceptiva em diferentes doses, quando administrado tanto por via intraperitoneal quanto oral (5,0 e 10,0 mg/kg, i.p.; 20 e 40 mg/kg, v.o.).

Com relação à duração do efeito antinociceptivo no teste de estimulação tátil, o componente bioativo em estudo sustentou seu efeito até a segunda hora nas duas vias de administração. Neste caso a via de administração também não alterou a duração do efeito do componente. Entretanto, ao compararmos com ensaios realizados por outros autores, podemos levantar a hipótese de a natureza molecular do componente pode estar envolvida com a diferença de duração de sua ação, visto que o componente bioativo do presente trabalho tem natureza esteroideal e a crotalina (GUTIERREZ et al., 2008) e a najanalgesina (LIANG et al., 2009) são peptídeos.

Outro sintoma positivo também importante na neuropatia periférica é a hiperalgesia mecânica. Esta pode ocorrer pela facilitação da transmissão sensorial pelos receptores dolorosos originando sensibilização periférica e/ou central (DWORKIN et al., 2003; KINGERY; VALLIN, 1989).

Assim como na alodinia mecânica, compostos presentes em venenos animais também tem sido testados no fenômeno de hiperalgesia mecânica com efeitos antinociceptivos bastante eficazes (GUTTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008; PARK et al., 2008;). Park et al. (2008) mostraram que um peptídeo presente no veneno de *Grammostola spatulata* apresenta ação antinociceptiva na hiperalgesia induzida por carragininina, quando aplicado pela via intraperitoneal, com o efeito persistindo até 6 horas. Efeito semelhante foi observado por Nogueira-Neto et al., (2008) observando que a crotoxina, um peptídeo presente no veneno de *C.*

*durissus terrificus*, apresenta efeito antinociceptivo na hiperalgesia mecânica induzida por transecção do nervo ciático. Konno et al. (2008) e Gutierrez et al. (2008), por sua vez, observaram que um outro peptídeo obtido do veneno de *C. durissus terrificus*, crotalina, também é capaz de bloquear a hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandinas e por constrição do nervo ciático, respectivamente, com duração de aproximadamente 72 h. Além disso, conduziu a um aumento no limiar de dor dos animais quando comparado com os valores obtidos no controle antes da cirurgia.

O componente bioativo foi capaz de reduzir esse sintoma em teste de compressão mecânica da pata (Randall – Selitto) em todas as doses testadas por via intraperitoneal (1,0; 2,5; 5,0; e 10,0 mg/kg) e oral (20 e 40 mg/kg). Além desse efeito, esse componente também foi capaz de aumentar o limiar de dor nos animais acima do controle antes da cirurgia, semelhante ao observado nos trabalhos citados acima.

Com relação à duração do efeito antinociceptivo no teste de compressão da pata (Randall-Selitto), o componente bioativo apresentou ação semelhante ao do teste da estimulação tátil (von Frey) nas duas vias de administração (i.p. e v.o.), onde a manutenção de seu efeito persistiu até a segunda hora. Além disso, observou-se também que a via de administração não alterou o tempo de atuação.

Como o componente bioativo foi eficaz no tratamento da alodinia e hiperalgesia induzida pela injúria do nervo ciático, tanto por via oral quanto intraperitoneal, realizou-se um estudo comparativo com fármacos clássicos que atualmente são utilizados para o tratamento da dor neuropática.

Um dos fármacos utilizados para o tratamento da dor neuropática é a carbamazepina, um anticonvulsivante, a qual apresenta um mecanismo de ação bem diversificado, mas com maior atividade em inibir canais para sódio voltagem-dependentes, impedindo assim o surgimento do estímulo doloroso (ELLIOTT, 1990; MACDONALD; KELLY, 1993). Já a amitriptilina é um antidepressivo tricíclico que atua na dor neuropática por muitos mecanismos, com evidência na inibição da recaptação de monoaminas (5-HT e NE) e bloqueio de receptores para NMDA e

canais para sódio (BOMHOLT; MIKKELSEN; BLACKBURN-MUNRO, 2004; MAX et al., 1987; SINDRUP et al., 1989).

Outros dois fármacos muito utilizados para o tratamento da dor neuropática são a morfina e a codeína, as quais atuam em receptores opióides que estão acoplados a proteína G, e essa estimulação resulta na inibição de canais para cálcio e ativação de canais para potássio, sendo que a codeína tem um efeito menos potente (CHILDERS, 1991; COLLER; CHRISTRUP; SOMOGYI, 2009; NORTH, 1993; LOTSCH, 2005). Já o diclofenaco sódico parece atuar na inibição da dor neuropática através da ativação dos canais para potássio e inibição de canais para sódio (LEE et al., 2003; ORTIZ et al., 2002).

Os corticóides, como a prednisona, atuam em receptores citoplasmáticos interferindo no processo de transcrição e são usados como adjuvantes analgésicos para dor em pacientes com câncer e pacientes com dor neuropática devido a herpes zoster e compressão da medula espinhal (ZOROB; CENDER, 1998).

O componente bioativo, quando comparado com a carbamazepina, amitriptilina, morfina e diclofenaco sódico, mostrou resposta semelhante no que diz respeito à redução da hipersensibilidade tátil. O mesmo comportamento não foi observado quando comparado com a dipirona, codeína e prednisona, uma vez que estas não apresentaram efeito na alodinia mecânica no teste de estimulação tátil (von Frey). Já na hiperalgesia mecânica, o componente bioativo mostrou efeito significativo no teste de compressão da pata, aumentando o limiar nocicepetivo em relação a todos os fármacos utilizados na comparação, chegando a níveis superiores ao dos animais sem hiperalgesia.

Quando comparado dose a dose, o componente bioativo, na alodinia, apresentou uma potência igual a da morfina, porém apresentou-se mais potente que a carbamazepina (12 vezes), amitriptilina (6 vezes) e diclofenaco sódico (2 vezes). Na hiperalgesia, sua potência foi superior a da morfina 9,156 vezes), carbamazepina (22 vezes), amitriptilina (13 vezes) e codeína (12 vezes).

Com relação ao provável mecanismo de ação da droga em estudo, verificou-se a participação do sistema opióide através da utilização da naloxona, um bloqueador inespecífico desse sistema. Desta forma verificou-se que a naloxona foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo do componente bioativo tanto no teste da compressão da pata quanto no teste da hipersensibilidade tátil, sugerindo que tal componente possa agir também via sistema opióide.

Alguns componentes peptídicos de outros venenos estudados recentemente na dor neuropática parecem também agir através da via opióide, como é o caso da crotalina, najanalgesina (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO; 2008; LIANG et al., 2009), agindo em receptores específicos diferentes.

A partir do exposto, pode-se sugerir que nosso componente pode ter ação tanto de forma direta quanto indireta sobre o sistema opióide. Contudo, pelo fato de ser um esteróide, acredita-se que ele não se liga diretamente a um receptor dessa via, podendo preferencialmente agir de maneira indireta através da produção e/ou liberação de opióides endógenos.

Sabe-se que muitas substâncias apresentam efeito antinociceptivo nas dores agudas, mas não na dor neuropática. O mesmo comportamento não foi observado com o componente bioativo em estudo, uma vez que este apresentou efeito antinociceptivo tanto na dor aguda (CARVALHO, 2009) quanto na dor neuropática experimental, tornando-o uma possível substância com potencial terapêutico nas dores agudas e crônicas.

## 7 CONCLUSÕES

- O componente bioativo apresentou atividade antinociceptiva para alodinia mecânica no teste de estimulação tátil (von Frey) e para hiperalgesia mecânica no teste de compressão da pata (Randall-Selitto).
- O componente de estudo apresentou efeito antinociceptivo não só por via intraperitoneal, mas também por via oral, com duração de ação de pelo menos durante 120 minutos.
- O componente bioativo mostrou potência semelhante à morfina, porém foi superior a carbamazepina, amitriptilina e diclofenaco sódico na alodinia mecânica e, na hiperalgesia mecânica, apresentou-se 1 mais potente que a morfina, carbamazepina, amitriptilina e codeína, além de apresentar um aumento no limiar nociceptivo acima dos valores considerados normais, sugerindo um efeito analgésico.
- O bloqueio das respostas antinociceptivas do componente bioativo pela naloxona sugere que o seu mecanismo de ação envolva a participação do sistema opióide.
- O componente bioativo em estudo pode ser um modelo para o desenvolvimento de novos analgésicos com potencial terapêutico no controle da dor neuropática humana.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDULLA, F. A.; SMITH, P. A. Axotomy reduces the effect of analgesic opioids yet increases the effect of nociceptin on dorsal root ganglion neurons. **J Neurosci.**, v. 18, n. 23, p. 9685-9694, 1998.

AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. **Neurological Sciences**, v. 24, p. S57 S60, 2003.

ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v. 111, p. 389-397, 2002.

AMPHIBIAWEB: **Information on amphibian biology and conservation.** [web application]. 2009. Berkeley, California. Disponível em: <http://amphibiaweb.org/>. (Acesso em: 2009).

ANDERSON, L. C.; RAO, R. D. Interleukin-6 and nerve growth factor levels in peripheral nerve and brainstem after trigeminal nerve injury in the rat. **Archives of Oral Biology**, v. 46, p. 633 - 640, 2001.

ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **Clin J Pain.**, v. 16, p. S118-130, 2000.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**, New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-491.

BAJWA, Z. H.; SAMI, N.; WARFIELD, C. A.; WOOTTON, J. Topiramate relieves refractory intercostal neuralgia. **Neurology**, v. 52, 1917, 1999

BELCHER, G.; RYALL, R. W.; SCHAFFNER, R. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe interneurons in the cat. **Brain Research**, v. 151, p. 307-21, 1978.

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

BENOLIEL, R.; WILENSKY, A.; TAL, M.; ELIAV, E. Application of a pro-inflammatory agent to the orbital portion of the rat infraorbital nerve induces changes indicative of ongoing trigeminal pain. **Pain**, v. 99, p. 567-578, 2002.

BESSION, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, p.1610–15, 1999.

BIAN, D.; NICHOLS, M. L.; OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; PORRECA, F. Characterization of the antiallodynic efficacy of morphine in a model of neuropathic pain in rats. **Neuroreport**, v. 6, p.1981-1984, 1995.

BOGIN, O. Venom Peptides and their Mimetics as Potential Drugs. **Modulator**, v. 19, p. 14-20, 2005

BOMHOLT, S. F.; MIKKELSEN, J. D.; BLACKBURN-MUNROA, G. Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 252–263, 2005.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W. N.; RICE, A. S. C. Mechanisms of neuropathic pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 1, p. 12-26, 2001.

CAMERON, S. A.; DUTIA, M. B. Lesion-induced plasticity in rat vestibular nucleus neurons is dependent on glucocorticoid receptor activation. **J. Physiol.**, v. 518, p. 151–158, 1999.

CAMU, F.; SHI, L.; VANLERSBERGHE, C. The Role of COX-2 inhibitors in pain modulation. **Drugs**, v. 63, p. 1-7, 2003.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain. Its possible role in the febrile response. **Brain Res.**, v. 697, p. 187-196, 1995.

CARVALHO, K. M. Metabolismo de hormônios-peptídios: descoberta de uma nova família de metaloenzimas. **Tese (Professor Titular)** – Universidade Federal do Ceará, UFC, 1995.

CARVALHO, I. F.; **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri***. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2009.

CARVALHO, K. M.; JOUDIOU, C.; BOUSSETA, H.; [LESENEY, A. M.](#); [COHEN, P.](#) A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in xenopus laevis skin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 84-88, 1992.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev Neurol.**, v. 35, p. 1037-48, 2002.

CHAPARRO, J. C.; PRAMUK, J. B.; GLUESENKAMP, A. G. A new species of arboreal Rhinella (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, p. 203–212, 2007.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Meth.**, v. 53, p. 55-63, 1994

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9171, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, K. K.; KOVARIKOVA, E. Farmacology and toxicology of toad venom. **J. Pharman. Sci.**, v.56, p.1535, 1967.

CHEN, S. R.; ZEMIN, X.; PAN, H. L. Stereos pacific effects of pregabalin on ectopic afferent discharges an neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation in rats. **Anesthesiology**, v. 95, p. 1473-1479, 2001.

[CHILDERS, S. R](#) Opioid receptor-coupled second messenger systems. **Life Sci.**, v. 48, p. 1991-200, 1991.

CHILDERS, S. R. Opioid receptors: pinning down the opiate targets. **Curr Biol** , v. 7, p. 695-697, 1997.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, p. S4 - S11, 2003.

CINTRA, A.; MOLANDER, C.; FUXE, K. Colocalization of Fos- and glucocorticoid receptor-immunoreactivities is present only in a very restricted population of dorsal horn neurons of the rat spinal cord after nociceptiva stimulation. **Brain Res.**, v. 632, p. 334–338, 1993.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions their normal function and potential medical applications. *Biol. Rev. Camb. Philos Soc*, v. 72, p. 365-379, 1996.

CLARK, F. M.; PROUDFIT, H. K. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain research*, v. 547, p. 279-288, 1991.

CLATWORTHY, A. L.; ILLICH, P. A.; CASTRO, G. A.; WALTERS, E. T. Role of periaxonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, v. 184, p. 5-8, 1995.

COLLER, J. K.; CHRISTRUP, L. L.; SOMOGYI, A. A. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 65, p. 121–139, 2009.

COLOMBO, B.; ANNOVAZZI, P. O.; COMI, G. Medications for neuropathic pain: current trends. *Neurological Science*, v. 27, p.183-189, 2006.

CORTELLI, P., PIERANGELI, G. Chronic pain-autonomic interactions. *Neurological Sciences*, v. 24, p. S68 - S70, 2003.

COSTIGAN, M.; BEFORT, K.; KARCHEWSKI, L.; GRIFFIN, R. S.; D'URSO, D.; ALLCHORNE, A.; SITARSKI, J.; MANNION, J. W.; PRATT, R. E.; WOOLF, C. J. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.*, v. 25, p. 3-16, 2002.

CUNHA-FILHO, G. A.; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S. S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES JR, O. R.; LEITE, J. R., BLOCH JR, C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon*, v. 45, p. 777–782, 2005.

DALY, J. W. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. *Braz J Med Biol Res*, v. 28, p. 1033-1042, 1995.

DALY, J.W.; MYERS, C.W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon*, v.25, n.10, p.1023-1095, 1987.

DE NICOLA, A. F.; MOSES, D. F.; GONZALEZ, S.; ORTI, E. Adrenocorticoid action in the spinal cord: some unique molecular properties of glucocorticoid receptors. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 9, p. 179–192, 1989.

DUELLMAN, W. E. Reproductive strategies of frogs. **Sci.Am**, v. 267, p. 80-87, 1992.

DUELLMAN, W. E; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw Hill, p.670, 1986.

DWORKIN, R. H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; ALLEN, R. R.; ARGOFF, C. R.; BENNETT, G. J.; BUSHNELL, M. C.; FARRAR, J. T.; GALER, B. S.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; HEWITT, D. J.; LOESER, J. D.; MAX, M. B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K. E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; WATKINS, L. R.; WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol.**, v. 60, p. 1524-34, 2003.

DOWDALL, T.; ROBINSON, I.; MEERT, T. F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 80, p. 93–108, 2005.

ELLIOTT, P. Action of antiepileptic and anaesthetic drugs on Na- and Ca-spikes in mammalian non-myelinated axons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 175, p. 155–163, 1990.

ERICHSEN, H. K.; HAO, J.; XU, X.; BLACKBURN-MUNRO, G. Comparative actions of the opioid analgesics morphine, methadone and codeine in rat models of peripheral and central neuropathic pain. **Pain**, v. 116, p. 347–358, 2005.

ERICSSON, A. C.; BLOMQVIST, A.; CRAIG, A. D.; OTTERSEN, O. P.; BROMAN, J. Evidence for glutamate as neurotransmitter in trigemino- and spinothalamic tract terminals in the nucleus submedius of cats. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, p. 305-317, 1995.

ERSPAMER, V. Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 79, p. 1-7, 1984.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; NEGRI, L.; CORSI, R.; SEVERINE, C.; BARRA, D; SIMMACO, M.; KREIL, G. Deltorphins: A family of naturally occurring peptide with high affinity and selectivity for  $\delta$ - opioid binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 5188-5192, 1989.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, p. 365-371, 1990.

FIELDS, H. L. Can opiates relieve neuropathic pain? **Pain**, v. 35, p.365–367, 1988.

FLUCHER, B. E.; LENGELACHNER-BACHINGER, C.; POHLHAMMER, K.; ADAM, H.; MOLLAY, C. Skin peptides in *Xenopus laevis*: morphological requirements for precursor processing in developing and regenerating granular skin glands. **J. Cell Biol.**, v. 103, p. 2299-2309, 1986.

FRITSCHY, J. M.; BLOMQUIST, A.; CRAIG, A. D.; OTTERSEN, O. P.; BROMAN, J. Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: a combined anterograde transport and immunohistochemical study. **Brain Research**, p. 176-180, 1987.

FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, F.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; SA, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, p. 1-371, 2006.

FROST, E. A. Management of head injury. **Can. Anaesth. Soc. J.**, v. 32, p. S32-39, 1985

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 129-141, 1999.

FUXE, K.; DIAZ, R.; CINTRA, A.; BHATNAGAR, M.; TINNER, B.; GUSTAFSSON, J. A.; OGREN, S. O.; AGNATI, L. F. On the role of glucocorticoid receptors in brain plasticity. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 16, p. 239–258, 1996.

GALER, B. S. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. **Neurology**, v. 45, p. S17-25, 1995.

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **JAOA**, v. 107, p. 39-48, 2007

GIOVANNINI, M. G.; POULTER; GIBSON, B. W. et al. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. **Biochem.**, v. 243, p. 113-20, 1987.

GOLDSTEIN, A.; NAIDU, A. Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding signatures. **Mol. Pharmacol.** v. 36, p. 265-72, 1989.

GOLDSTEIN, D. J.; LU, Y.; DETKE, M. J.; LEE, T. C.; IYENGAR, R. Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. **Pain**, v. 116, p. 109-118, 2005.

GRUBB, B. D. Peripheral and central mechanism of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 81, n. 1, p. 8-11, 1998.

GUSTAFSSON, H.; SANDIN, J. Oral pregabalin reverses cold allodynia in two distinct models of peripheral neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 605, p. 103–108, 2009.

GUTIERREZ, V. P.; KONNO, K.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S. C.; PICOLO, G.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; CURY, Y. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, p. 84–92, 2008.

GUTSTEIN, H. B.; MANSOUR, A.; WATSON, S. J.; AKIL, H.; FIELDS, H. L. Mu and Kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuroreport**, v. 9, n. 8, p.1777-1781, 1998.

IASP (International Association for the Study of Pain). *IASP Pain Terminology*. 2<sup>a</sup> ed. Seattle, 1994. Disponível em: <[http:// www.iasp-pain.org/terms-p.html](http://www.iasp-pain.org/terms-p.html) >. Acesso em 21 Fev. 2009.

IWAMURO, S.; KUWAGAKI, D.; KIKUYAMA, S. Effect of arginine vasocitin (AVT) and AVT-related peptide on skin gland secretion in *Xenopus laevis*. **Zool Sci.**, v. 8, p. 743-746, 1991.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M., JORDÃO, A. E. C.; SILVA, J. R. M. C.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, v. 54, p. 1–12, 2009.

JENSEN, T. S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. **European Journal of Pain**, v. 6, p. 61 -68, 2002.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Bri J Anaest.**, v. 74, p.319-327, 1995.

KINGERY, W. S.; VALLIN, J. A. The development of chronic mechanical hyperalgesia, autotomy and collateral sprouting following sciatic nerve section in rat. **Pain**; v. 38, p. 321– 32, 1989.

KNIGHT, Y. E.; BARTSCH, T.; KAUBE, H.; GOADSBY, P. J. P/Q-type calciumchannel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 1-6, 2002.

KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; Camargo, A. C. M.; CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, p.1293–1304, 2008.

LAZARUS, L. H; ATTILA, M. The toad ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Prog. Neurobiol.**, v. 41, p. 473-507, 1993.

LEE, H. M.; KIM, H. I.; SHIN, Y. K.; LEE, C. S.; PARK, M.; SONG, J. Diclofenac inhibition of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research.**, v. 992, p. 120–127, 2003.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, p. 790–802, 2003.

LIANG, Y.; JIANG, W.; HAN, L.; ZHAO, S. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of najanalgesin isolated from *Naja naja atra* in a rat experimental model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 460, p. 191–195, 2009.

LORD, J. A.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267, p. 495-499, 1977.

LÖTSCH, J. Opioid metabolites. **J Pain Symptom Manage**, v. 5, p. S10-24,2005

LYNCH, M. E.; CLARK, A. J.; SAWYNOK, J.; SULLIVAN, M. J. Topical amitriptyline and ketamine in neuropathic pain syndromes: an open-label study. **J. Pain**, v. 6, p. 644-9, 2005.

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

MA, W.; DU, W.; EISENACH, J. C. Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Brain Research Interactive**, v. 937, p. 94-99, 2002.

MACDONALD, R. L.; KELLY, K. M. Antiepileptic drug mechanism of action. **Epilepsia**, v. 34, p. S1-S8, 1993.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; CALLAGHAN, J. O.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its controls by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 1, p.1-19, 1997.

MacPHERSON, R. D. New directions in pain management. **Drugs Today**, v. 38, p. 135-145, 2002.

MCCLEANE, G. Antidepressants as analgesics. **CNS Drugs**, v. 22, p.139-56, 2008.

MCQUAY, H. Opioids in pain management. **Lancet**, v. 353, p. 2229-2232, 1999.

MAX, M. B.; CULNANE, M.; SCHAFER, S. C.; GRACELY, R. H.; WALTHER, D. J.; SMOLLER, B.; DUBNER, R. Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. **Neurology**, v. 37, p. 589-596, 1987.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, n. 699, p. 971-79, 1965.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. Seattle: International Association for the Study of Pain Press, 210, 1994

MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, v. 3, p. S1-S226, 1986.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p.1-164, 1999.

NAGATA, K.; IMAI, T.; YAMASHITA, T.; TSUDA, M.; TOZAKI-SAITOH, H.; INOUE, K. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. **Molecular Pain**, v. 5, p. 1-12, 2009.

NEECK, G.; RENKAWITZ, R.; EGGERT, M. Molecular aspects of glucocorticoid hormone action in rheumatoid arthritis. **Cytokines Cell Mol. Ther.**, v. 7, p. 61–69, 2002.

NOGUEIRA-NETO, F. S.; AMORIM, R. L.; BRIGATTE, P.; PICOLO, G.; FERREIRA JR, W. A.; GUTIERREZ, V. P.; CONCEIÇÃO, I. M.; DELLA-CASA, M. S.; TAKAHIRA, R. K. B; NICOLETTI, J. L. M.; CURY, Y. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, p. 252–260, 2008.

OATWAY, M.; REID, Q.; SAWYMOK, J. Peripheral antihyperalgesia and analgesic actions of ketamine and amitriptyline in a model of wild thermal injury in the rat. **Anest Analg.**, v. 97, p. 168-73, 2003.

OLIVEIRA, L. F. Dor: fisiopatologia, **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 28, n. 3, p. 227-288, 1979.

ORTIZ, M. I.; TORRES-LÓPEZ, J. E.; CASTANEDA-HERNÁNDEZ, G.; ROSAS, R.; VIDAL-CANTÚ, G. C.; GRANADOS-SOTO, V. Pharmacological evidence for the activation of K<sup>+</sup> channels by diclofenac. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 438, p. 85–91, 2002.

PAPPAGALLO, M. Newer Antiepileptic Drugs: Possible Uses in the Treatment of Neuropathic Pain and Migraine. **Clinical Therapeutics**, v. 25, p. 2506-2538, 2003.

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

PATROCÍNIO, M. C. A. **Efeitos farmacológicos do telocinobufagin, um bufadienolídeo oriundo das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*: estudo comparativo com o anestésico local bupivacaína.** Tese (Faculdade de Medicina) - Universidade Federal do Ceará - UFC, 2004.

PERTOVAARA, A.; KONTINEN, V. K.; KALSO, E. A. Chronic spinal nerve ligation induces changes in response characteristics of nociceptive spinal dorsal horn neurons and in their descending regulation originating in the periaqueductal gray in the rat. **Experimental Neurology**, v. 147, p. 428 - 436, 1997.

PIRES, A. F. **Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* MART.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2007.

PITCHER, G. M.; RITCHIE, J.; HENRY, J. L. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. **Pain**, v. 83, p. 37-46, 1999.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur J Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001

RANDALL, L. O., SELITTO, J. J., A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* v. 111, p. 409-419, 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. Fármacos analgésicos. In: **Farmacologia.** 588-607. 6a ed. Editora Guanabara, 2008.

REILLY, D. S.; TOMASSINI, N.; ZASLOFF, M. Expression of magainin antimicrobial peptide Genes in developing granular glands of *Xenopus* skin and induction by thyroid hormone. **Dev Biol.**, v. 162, p. 123-133, 1994.

REIS, F. J.; ROCHA, N. P. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 513-522, 2006.

ROSSETTO, E. G.; DELLAROZA, M. S. G.; KRELING, M. C. G. D.; CRUZ, D. de A. L.; PIMENTA, C. A. de M. Epidemiologia da dor em crianças, adultos e idosos: Análise crítica. **Arq. Bras. Neurocir.**, v. 18, p. 213-224, 1999.

ROSSI, H.; BLUMENTHAL, E. E. A.; JARED, C. Bufodienolides from the venom of *Bufo paracnemis* (anphibia, anura, bufonidae). **Anais Assoc. Bras. Quim.**, v. 46, p. 21-26, 1997.

SAH, D. W.; OSSIPO, M. H.; PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, p. 460-472. 2003.

SBED – Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (São Paulo). **Projeto "Controle da Dor no Brasil"**: Brasil sem Dor. Web site desenvolvido por Had Net Comunicação,

2005. Disponível em: <[http://www.dor.org.br/sbed\\_projetoBrasil.asp](http://www.dor.org.br/sbed_projetoBrasil.asp)>. Acesso em: 19 jun. 2009.

SEBBEN, A; SCHWARTZ, C. A; CRUZ, J. S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v. 15, p. 25-35, 1993.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389. p.237–243, 2004.

SHELLEY, A.; CROSS, M. D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc.**, v. 69, p. 375-383, 1994.

SERRA, J. Overview of neuropathic pain syndromes [new advances in the treatment of neuropathic pain]. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 100 (Supplementum), p. 7-11, 1999.

SINDRUP, S. H.; EJLERTSEN, B.; FRØLAND, A.; SINDRUP, E. H.; BRØSEN, K.; GRAM, L. F. Imipramine treatment in diabetic neuropathy: relief of subjective symptoms without changes in peripheral and autonomic nerve function. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 37, p. 151–153, 1989.

SINDRUP, S. H.; OTTO, M.; FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 96, p. 399-409, 2005.

SINDRUP, S. H.; TUXEN, C.; GRAM, L. F.; GRODUM, E.; SKJOLD, T.; BROSEN, K.; BECK-NIELSEN, H. Lack of effect of mianserin on the symptoms of diabetic neuropathy. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 43, p. 251-255, 1992.

SODERPALM, B. Anticonvulsivants: aspects of their mechanism of action. **Eur J Pain**; v. 6 p. 3-9, 2002.

SOUSA, J. C. **Leptoglicina: Um novo peptídeo antimicrobiano rico em glicina e prolina isolado da secreção da pele da rã Sul-Americana *Leptodactylus pentadactylus***. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, UECE, 2009.

SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M.; YEH, H. J.; PU, Q. L.; PANNELL, L. K.; DALY, J. W. A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. **J. Nat. Prod.**, v. 55, p. 707–722, 1992.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; [TOMIC, M. A.](#); [VUCKOVIC, S. M.](#); [PARANOS, S.](#); [UGRESIC, N. D.](#); [PROSTRAN, M. S.](#); [MILOVANOVIC, S.](#); [BOSKOVIC, B.](#) The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth analg.**, v.106, p. 1897-1903, 2008.

STEVAUX, M. N. A new species of *Bufo Laurenti* (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. **Revta. bras. Zool.** v. 19, p. 235 - 242, 2002.

STEYN, P. S.; VAN HEERDEN, F. R. Bufadienolides of plant and animal origin. **Nat. Prod. Rep.**, v. 15, p. 397–413, 1998.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. D. C.; PRADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Lett. Drug. Des. Discov.**, v. 4, p. 67–73, 2007.

TEMPONE, A.; PIMENTA, D.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.; ANDRADE JR. H.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13–21, 2008.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutâneos granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 111, p. 1-29, 1995.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Estudo histológico das glândulas lombares de *Pleurodema thaul* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 49, p. 421–428, 1989.

TREEDE, R. D.; MEYER, R. A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 38, p. 397 - 421, 1992.

URBAN, M. O.; GEBHART, G. Central mechanism in pain. **Medical Clinics of North America**, v. 83, p. 585-596, 1999.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New Biol.**, v. 231, p. 232-235, 1971.

VITOR, A. O.; PONTE, E. L.; SOARES, P. M.; RODRIGUES, M. E. S.; LIMA, R. C. S.; CARVALHO, K. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; VASCONCELOS, S. M. M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **RECIIS**, v. 2, n. 1, p. 87-96,

2008. <http://www.reciis.cict.fiocruz.br/index.php/reciis/article/view/133/153>.

WANG, S.; LIM, G.; ZENG, Q.; SUNG, B.; AI, Y.; GUO, G.; YANG, L.; MAO, J. Expression of Central Glucocorticoid Receptors after Peripheral Nerve Injury Contributes to Neuropathic Pain Behaviors in Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 8595-8605, 2004.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**, v. 74, p. 2605–2610, 2004.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, v. 353, p.1959-1964, 1999.

YAKSH, T. L.; WILSON, P. R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 208, p. 446-453, 1979.

ZADINA, J. E.; LASZLO, H.; GE, L. J; KASTIN, A. J. A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. **Nature**, v. 386, p. 499-502, 1997.

ZELNIK, R. R.; ZITI, M.; GUIMARÃES, C. V. A. chromatographic study of bufadienolides isolated from the venom of the parotoid glands of *Bufo paracnemis* Lutz. **J. Chromatogr**, v. 15, p. 9-14, 1964.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 23-37, 2001.

ZETLER, G. Caerulein and its analogues: neuropharmacological properties. **Peptides**, v. 6, p. 33–46, 1985.

ZIVIANI, ROSANA LAVORENTE. **Dor Crônica: Diagnóstico e Tratamento**. Monografia (Especialista - Curso de Pós-graduação em Farmacologia) - Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2003.

ZOOROB, R. J.; CENDER, D. A different look at corticosteroids. **Am Fam Physician.**, v. 58, p. 443-450, 1998.

# 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](#)