UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ANA CAROLINA CAMPOS OLINDA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM NOVO FATOR EXTRAÍDO DO VENENO DE *Crotalus durissus collilineatus*

FORTALEZA
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ANA CAROLINA CAMPOS OLINDA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM NOVO FATOR EXTRAÍDO DO VENENO DE *Crotalus durissus collilineatus*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestrado em Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho

FORTALEZA
2010

ANA CAROLINA CAMPOS OLINDA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM NOVO FATOR EXTRAÍDO DO VENENO DE *Crotalus durissus collilineatus*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Da Universidade Estadual do Ceará. Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.

Aprovada em ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará

_____

Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi
Universidade Estadual do ceará

_____

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará

À minha família e ao meu amor, que nas lutas da vida são meus pilares; nas derrotas, meus ombros consoladores; e nas vitórias, meus mais ardentes torcedores. O estimulo e carinho de vocês foram armas desta vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e me protege desde o momento em que fui gerada e que nunca me deixou nos momentos difíceis, me permitindo chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho, por sua valiosa orientação nos últimos cinco anos no Laboratório de Toxinologia e Farmacologia Molecular, e também por sua valiosa contribuição na minha longa escalada da vida profissional.

Ao Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi, pela orientação e ajuda na elaboração deste trabalho. Pelos seus conselhos durante esses anos de convivência.

A Prof. Dr. Gislei Frota Aragão, por ter aceito o convite para participar da banca e por todas as valiosas correções e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao meu grande amigo Rebouças, por sua indispensável ajuda na realização deste trabalho e por sua amizade durantes todos estes anos.

As minhas amigas de laboratório Milena e Karol, pela grande ajuda nos experimentos e pelos divertidos momentos de convivência.

Aos meus amigos de mestrado e por toda a vida, Raquel, Jones, Leidiane, Sarah, Albertina e Graciana, por todas as noites de estudo e pela amizade em todos os momentos divertidos e difíceis durante essa caminhada.

Aos Professores do Mestrado, pelo precioso conhecimento transmitido durante o curso.

À Rosa Germana, pela grande colaboração nos experimentos no laboratório e por sua amizade.

A CAPES, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

“Os que esperam no Senhor, adquirirão sempre novas forças, tomarão asas como de águia, correrão e não fatigarão, andarão e não desfalecerão.”

Isaías 40:31

RESUMO

Estudo da atividade antinociceptiva de um novo fator extraído do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. ANA CAROLINA CAMPOS OLINDA. Orientador: Prof°. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho. Dissertação de Mestrado. Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2010.

A propriedade antinociceptiva dos venenos de algumas subespécies de serpentes, principalmente o da espécie *Crotalus durissus*, tem sido demonstrada em diversos modelos experimentais. O atual trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização farmacológica de uma substância com efeito analgésico periférico e central presente no veneno da subespécie *Crotalus durissus collilineatus*. E, como objetivos específicos, fracionar o veneno da *Crotalus durissus collilineatus*, purificando um fator que possui atividade analgésica, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em uma coluna preparativa de fase reversa C18; estudar, utilizando ensaios farmacológicos, as suas atividades analgésicas periférica, central, de origem neurogênica e inflamatória, comparando-as com a do analgésico clássico morfina e verificar o envolvimento do sistema opióide no efeito analgésico da nova substância através do uso da naloxona – antagonista opióide clássico. Foram realizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, da formalina, do aquecimento da cauda (*tail-flick*) e da placa quente. Em todos os testes realizados foram utilizados camundongos swiss (*Mus musculus*) (n=6) e a via de administração do fator Cdc e da morfina foi a intravenosa. No teste de contorções abdominais, o fator Cdc apresentou atividade analgésica periférica nas doses de 1 mg/Kg (19,75 ± 0,32); 5 mg/Kg (9,90 ± 2,10) e 10mg/Kg (4,20 ± 0,85) em relação ao controle negativo (43,10 ± 2,51). Quando comparado, mol a mol com a morfina, o fator Cdc foi, aproximadamente, 174% mais potente. No teste da formalina, fase 1, o fator Cdc, apresentou atividade antinociceptiva de origem neurogênica nas doses de 2,5 mg/Kg (95,75 ± 8,20); 5 mg/Kg (68,33 ± 3,45) e 10 mg/Kg (35,50 ± 7,10) em relação ao controle negativo (152,90 ± 11,22). Também foi observado que o fator Cdc foi 157% mais potente que a morfina, quando comparados mol a mol. Na fase 2 do teste da formalina, o fator Cdc inibiu, de forma significativa, o tempo de lambidas na pata injuriada nas doses de 1 mg/Kg (116,00 ± 6,14); 5 mg/Kg (47,25 ± 2,90) e 10 mg/Kg (20,67 ± 6,20) em relação ao controle negativo (175,70 ± 12,51), demonstrando atividade analgésica de origem inflamatória. Comparando mol a mol com a morfina, o fator Cdc foi, aproximadamente, 170% mais potente. No teste da placa quente, o fator Cdc apresentou atividade antinociceptiva central-cerebral nas doses de 2,5 mg/Kg (7,55 ± 0,64); 5 mg/Kg (8,08 ± 0,90) e 10 mg/Kg (9,60 ± 0,78) em relação ao controle negativo (4,76 ± 0,26). Também foi observado que o fator Cdc foi, aproximadamente, 108% mais potente que a morfina, quando comparados mol a mol. No teste do *tail-flick*, o fator Cdc, nas doses de 1 mg/Kg (67,28 ± 1,72); 2,5 mg/Kg (66,50 ± 2,26); 5 mg/Kg (66,26 ± 1,49) e 10 mg/Kg (66,05 ± 1,81), aumentou significantemente o tempo de reação reflexa de retirada da cauda em relação ao controle negativo (51,15 ± 0,77), demonstrando uma ação analgésica central-medular. Quando comparado com a morfina, mol a mol, o fator Cdc foi, aproximadamente, 153% mais potente. Foi verificado também que a naloxona (5mg/kg-i.p.) foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo do fator em todos os testes realizados, indicando uma provável participação da via opióide no seu mecanismo de ação. A descoberta de um fator com ação analgésica periférica e central, extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, abre uma grande perspectiva para o desenvolvimento futuro de novas drogas mais potentes que os atuais opióides e com menos efeitos colaterais.

Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*, atividade analgésica, sistema opióide.

ABSTRACT

Study of the antinociceptive activity of a new factor extracted from the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. ANA CAROLINA CAMPOS OLINDA. Supervisor: Prof°. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho. Master's Dissertation. Course of Academic Master in Physiology Science. Superior Institute of Biomedics Science, UECE, 2010.

The antiniciceptive property of venoms of some snakes, especially the specie *Crotalus durissus* has been demonstrated in several experimental models. The current study aimed at the isolation and pharmacological characterization of a substance with peripheral and/or central analgesic effect in the venom of the subspecies *Crotalus durissus collilineatus*. And, how specific objectives, fractionate the venom of *Crotalus durissus collilineatus*, purifying a factor with analgesic activity, by high performance liquid chromatography (HPLC) in a preparative column reversed phase C18; study, by pharmacologic tests, their peripheral, central, neurogenic and inflammatory analgesic activity, comparing it with the classic analgesic morphine and check the opioid system involvement on analgesic effect of the new substance by the use of naloxone – classic opioid antagonist. Were realized the writhing test induced by acetic acid, the formalin test, the tail-flick test and the hot plate test. In all tests were used swiss mouse (*Mus musculus*) (n=6) and the administration route of factor Cdc and morphine was intravenous. In the writhing test, the factor Cdc showed peripheral analgesic activity at doses of 1 mg/Kg (19,75 ± 0,32); 5 mg/Kg (9,90 ± 2,10) e 10mg/Kg (4,20 ± 0,85) compared to negative control (43,1 ± 2,51). When mol a mol compared with morphine, the factor Cdc was approximately 174% more powerful. In the formalin test, phase 1, the factor Cdc showed antinociceptive activity at doses of 2,5 mg/Kg (95,75 ± 8,20); 5 mg/Kg (68,33 ± 3,45) e 10 mg/Kg (35,50 ± 7,10) compared to negative control (152,90 ± 11,22). It was also observed that the factor Cdc was 157% more powerful than morphine, when mol a mol compared. In the phase 2 of the formalin test, the factor Cdc inhibited significantly the time of licking the injured paw at doses of 1 mg/Kg (116,00 ± 6,14); 5 mg/Kg (47,25 ± 2,90) e 10 mg/Kg (20,67 ± 6,20) compared to negative control (175,70 ± 12,51), showing analgesic activity. When mol a mol compared with morphine, the factor Cdc was approximately 170% more powerful. In the hot plate test, the factor Cdc showed central-cerebral antinociceptive activity at doses of 2,5 mg/Kg (7,55 ± 0,64); 5 mg/Kg (8,08 ± 0,90) e 10 mg/Kg (9,60 ± 0,78) compared to negative control (4,76 ± 0,26). It was also observed that the factor Cdc was, approximately, 108% more powerful than morphine, when mol a mol compared. In the tail-flick test, the factor Cdc, at doses of 1 mg/Kg (67,28 ± 1,72); 2,5 mg/Kg (66,50 ± 2,26); 5 mg/Kg (66,26 ± 1,49) e 10 mg/Kg (66,05 ± 1,81), increased significantly the reflex reaction time of the tail flick compared with negative control 51,15 ± 0,77), showing a central-spinal analgesic action. When mol a mol compared with morphine, the factor Cdc was, approximately, 153% more powerful. It was also checked that naloxone (5mg/kg-i.p.) was able to block the antinociceptive effect of the factor Cdc in all realized tests, indicating a probable opióide route involvement in its mechanisms of action. The discovery of analgesic substances with peripheral and central action, extracted from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom, open a great prospect for the future development of new drugs more potent than the current opióide with fewer side effects.

Key-words: *Crotalus durissus collilineatus*, analgesic activity, opioid system.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- ºC - graus Célsius
- ATP – adenosina trifosfato
- β – beta
- CCK – colecistoquinina
- CEUA – comitê de ética no uso de animais
- C.d. – *Crotalus durissus*
- Cdc – *Crotalus durissus collillineatus*
- CDME – corno dorsal da medula espinhal
- CGRP - peptídeo relacionado ao gen da calcitonina
- cm - centímetros
- δ - delta
- g - grama (s)
- GMPc – guanilato-monofosfato-cíclico
- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
- IASP – associação internacional para o estudo da dor
- i.p. - intraperitoneal
- i.v. - intravenosa
- k – kappa
- K^+ - potássio
- Kg - quilograma (s)
- m – metro (s)
- mg - miligrama (s)
- min - minuto (s)
- mL - mililitro (s)
- μ – mu
- μL – microlitro (s)
- NKA – neurocinina A
- NKB – neurocinina B
- NRM - núcleo da rafe magna
- NO - óxido nítrico

- PAG - área cinzenta periaquedutal
- PG – prostaglandinas
- s - segundo (s)
- SBCAL – Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório
- SG - substância gelatinosa
- SNC - sistema nervoso central
- SNP – sistema nervoso periférico
- SP - substância P
- TFA – ácido trifluoracético
- P.M. – peso molecular

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Serpente *Crotalus durissus colillineatus* 16
Figura 02: Via ascendente da nocicepção 25
Figura 03: Teoria do portão de MELZACK e WALL 26
Figura 04: Cromatógrafo preparativo de elevada performance (Laboratório de Toxinologia e Farmacologia Molecular – UECE) 37
Figura 05: Via de administração intraperitoneal 38
Figura 06: Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 38
Figura 07: Injeção do fator Cdc na via intravenosa 39
Figura 08: Desenho experimental do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 39
Figura 09: Injeção subplantar de formalina 4% 40
Figura 10: Desenho experimental do teste da formalina 41
Figura 11: Aparelho placa quente (Insight ® eff361) 42
Figura 12: Teste da placa quente – animal respondendo ao estímulo (lambidas) 42
Figura 13: Desenho experimental do teste da placa quente 43
Figura 14: Aparelho para o teste da retirada da cauda (*tail flick*) (insight ® eff300) 44
Figura 15: Animal imobilizado com 1/3 apical da cauda introduzida no filamento do aparellho *tail flick* 44
Figura 16: Desenho experimental do teste *tail-flick* 45
Figura 17: Cromatograma do veneno bruto da Cdc 49
Figura 18: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 50
Figura 19: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 51
Figura 20: Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 1 52
Figura 21: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 1 53
Figura 22: Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 2 54
Figura 23: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 2 55
Figura 24: Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da placa quente 56

Figura 25: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da placa quente 57
Figura 26: Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da retirada da cauda (*tail-flick*) 58
Figura 27: Efeito da Naloxona na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da retirada da cauda (*tail-flick*) 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Exame físico e observação de animais em estudo de toxicidade 45
Tabela 02: Exame físico e observação de animais em estudo de toxicidade – Resultados do Fator Cdc 60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

1.1. SERPENTES E VENENO CROTÁLICO 15
1.2. ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A ATIVIDADE ANALGÉSICA DO VENENO DA ESPÉCIE *Crotalus durissus* 17
1.3. MECANISMOS DA NOCICEPÇÃO 20
1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANALGÉSICOS OPIÓIDES 27
1.5. PEPTÍDIOS OPIÓIDES ENDÓGENOS 29
1.6. ANALGÉSICOS OPIÓIDES:INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS, TOXICIDADE E EFEITOS COLATERAIS 30

2. JUSTIFICATIVA 33

3. OBJETIVOS 34

3.1. OBJETIVO GERAL 34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34

4. MÉTODOS 35

4.1. REAGENTES 35
4.1.1. Substâncias e reagentes 35
4.1.2. Aparelhos e instrumentos 35
4.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS 36
4.2.1. Animais 36
4.2.2. Fracionamento do veneno de *crotalus durissus collillineatus* 36
4.3. DETERMINAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA QUÍMICA DO FATOR ... 37
4.4. MODELOS DE NOCICEPÇÃO 38
4.4.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 38
4.4.2. Teste da formalina 40
4.4.3. Teste da placa quente 42
4.4.4. Teste da retirada da cauda (*tail-flick*): determinação da atividade analgésica medular 43
4.5. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS (TOXICIDADE DO FATOR Cdc 45
4.6. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE RESPOSTA DO FATOR EM RELAÇÃO À MORFINA (MOL A MOL) 47
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 48

5. RESULTADOS 49

5.1. CROMATOGRAFIA DO VENENO BRUTO DA Cdc 49
5.2. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POE ÁCIDO ACÉTICO 50
5.3. TESTE DA FORMALINA 52
5.3.1. Fase 1 52

5.3.2. Fase 2 54
5.4. TESTE DA PLACA QUENTE 56
5.5. TESTE DA RETIRADA DA CAUDA (*Tail-flick*): determinação da atividade analgésica medular 58
5.6. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS (TOXICIDADE DO FATOR Cdc 60

6. DISCUSSÃO 62

7. CONCLUSÃO 67

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

1. INTRODUÇÃO

1.1. SERPENTES E VENENO CROTÁLICO

Nas últimas décadas, toxinas de serpentes, bem como de outros animais, plantas e microrganismos vêm sendo utilizados como ferramentas na descoberta e no estudo de receptores (VITAL-BRAZIL; FONTANA, 1993; RAJENDRA *et al.*, 2004), assim como para a descoberta de novas moléculas com potencial uso terapêutico (HARVEY *et al.*, 1998; LEWIS; GARCIA, 2003; CURY; PICOLO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009) ou para a produção de medicamentos a partir dessas moléculas (KARALLIEDDE, 1995; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

As serpentes pertencem ao Filo Chordata, Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Serpentes. Aproximadamente 3000 espécies de serpentes são conhecidas no mundo, sendo que, apenas aproximadamente 10 a 14% destas são consideradas peçonhentas (CARDOSO; BRANDO, 1982; PINHO; PEREIRA, 2001). As serpentes peçonhentas são classificadas de acordo com suas características morfológicas, compreendendo quatro famílias (Crotalidae, Elapidae, Hidrophidae e Colubridae) (BARRAVIEIRA, 1997). No Brasil, são encontradas em torno de 10% do total das espécies do mundo estando distribuídas em nove famílias, 75 gêneros e cerca de 320 espécies (FRANCO, 2003).

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* (*C.d.),* e distribuídas em seis subespécies: *C.d. cascavella*, *C.d. ruruima*, *C.d. collilineatus* (Figura 01), *C.d. terrificus*, *C. d. marajoensis* e a *C. d. dryinas* (VANZOLINI; CALLEFFO, 2002).

Figura 01 - Serpente *Crotalus durissus colillineatus.* Fonte: Instituto Butantan

Os venenos das serpentes são compostos de substâncias simples e complexas, cujas proporções, características específicas e atividade biológica variam entre as diferentes espécies conhecidas (TU, 1977, RANGEL-SANTOS *et al*, 2004). A complexidade do veneno das serpentes está associada à alta variabilidade de seus componentes majoritários, como enzimas e toxinas e em menor proporção outros componentes como lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos e minerais. A toxicidade dos venenos deve-se à presença de enzimas e proteínas e sua ação letal é atribuída principalmente às neurotoxinas (STOCKER, 1990).

De acordo com MEBS (2001), podem ser encontradas algumas diferenças na composição do veneno de indivíduos pertencentes à mesma família, gênero e espécie, demonstrando a existência de diferenças evolutivas entre as mesmas.

Considerando a espécie *C.durissus.*, foram identificadas e isoladas principais substâncias tóxicas até o momento, sendo estas: crotoxina, convulxina, giroxina e crotamina (BARRAVIEIRA, 1995; BOLDRINI-FRANÇA *et al*, 2009). A crotoxina é a neurotoxina responsável pela alta toxicidade do veneno crotálico e é o principal componente tóxico e o mais abundante do veneno das serpentes *Crotalus* encontradas na América do sul, podendo chegar a 70% do peso bruto do veneno (AIRD *et al*, 1986; AMORA *et al*., 2006; BOLDRINI-FRANÇA *et al*, 2009). A crotamina é uma miotoxina que foi isolada primeiramente do

veneno da *C.d. terrificus* por Gonçalves e Vieira em 1950 e pode estar presente ou ausente entre as serpentes da espécie *C.d.* (SCHENBERG, 1959; RANGEL-SANTOS *et al*, 2004). De acordo com Mancin *et al* (1998) a crotamina, extraída do veneno da *C.d terrificus*, possui atividade analgésica central e periférica, com participação da via opióide.

O veneno crotálico pode afetar a permeabilidade dos vasos sangüíneos, os rins, músculos esqueléticos e componentes do sangue, tendo, assim, como principais ações: miotóxica, coagulante, neurotóxica e nefrotóxica (AMARAL *et al*., 1998; RANGEL-SANTOS *et al*, 2004; YAMASAKI *et al*, 2008). O quadro clínico local habitualmente causa manifestações discretas, como dor, eritema, edema, e parestesia local ou regional que persiste por tempo variável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; PINHO; PEREIRA, 2001).

Diante desse contexto, torna-se evidente o surgimento de numerosos estudos com o objetivo de compreender a atividade dos diversos componentes dos venenos animais (MÉNEZ, 1998; LEWIS; GARCIA, 2003). Diversos estudos neurofarmacológicos têm demonstrado a presença de atividade analgésica, tanto periférica quanto central, em venenos de serpentes e de substâncias isoladas destes (RAJENDRA *et al*., 2004; CURY; PICOLO, 2006).

1.2. ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A ATIVIDADE ANALGÉSICA DO VENENO DA ESPÉCIE *Crotalus durissus*

O uso dos venenos de serpentes no controle experimental da dor vem sendo relatado em vários trabalhos desde o início do século XX e estão baseados em estudos liderados pelo Dr. Vital-Brazil (VITAL-BRAZIL, 1934; 1950). Relatos mostravam o uso de venenos de serpentes no controle da dor e de certas doenças como hanseníase e epilepsia (VITAL-BRAZIL, 1934; HABERMEHIL, 1981).

O veneno das cascavéis da América do Sul induz sintomas neurológicos quando injetados em homens e animais. O veneno das *C.durissus*, ao contrário dos venenos de outras espécies, não provoca dor ou destruição tecidual no local da inoculação, mas sim uma sensação de parestesia na área afetada pela picada (ROSENFELD, 1971; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Em 1993 GIORGI *et al.* observaram uma atividade antinociceptiva no veneno da *C.d. terrificus,* sugerindo que a responsável por esta atividade semelhante a da endorfina seria uma substância de baixo peso molecular. O envolvimento do sistema opióide foi demonstrado utilizando a naloxona, sendo a atividade antinociceptiva do veneno antagonizada por ela. Complementando, PICOLO *et al.* (1998), verificaram que o efeito analgésico central é devido principalmente a uma resposta supra-espinhal integrada que se torna evidente no teste da placa-quente, mas não no teste *tail-flick* – que observa a resposta ao nível espinhal. Já o efeito analgésico periférico envolve uma cascata de eventos moleculares caracterizada pela ativação local de receptores opióides *delta* (δ) e *Kappa* (κ), seguido por estimulação da via GMPc-óxido nítrico com subseqüente abertura de canais de K^+ sensíveis ao ATP (PICOLO *et al*., 2000; BRIGATTE, 2001; PICOLO *et al*., 2003).

Brigatte (2001), utilizando o mesmo veneno, observaram tolerância à atividade antinociceptiva central com o tratamento prolongado em camundongos, onde esta tolerância teria como mediadores os receptores opióides do tipo k, de acordo com o teste da placa quente. Complementando, Picolo e Cury (2004) verificaram através do teste de indução de hiperalgesia por prostaglandina (PGE_2), que tanto o receptor opióde δ quanto o κ estariam envolvidos no efeito antinociceptivo do veneno da *C.d. terrifucus*. Também sugeriram que o óxido nítrico envolvido na antinocicepção é decorrente apenas da NO sintase neuronal presente na periferia.

A crotoxina, uma neurotoxina isolada do veneno da *C.d. terrificus*, possui atividade analgésica em modelos de dor aguda (ZHANG *et al*, 2006), bem como em modelos de dor neuropática (NOGUEIRA-NETO *et al*, 2008), mas esta parece não envolver a via opióide, pois seu efeito não foi antagonizado pela naloxona. Também foi observado que a crotoxina é a fração responsável pela potente e duradoura atividade antiinflamatória do veneno bruto da *C.d. terrificus* em camundongos (NUNES *et al*, 2007, 2010).

Em 2008 verificou-se que um novo peptídeo, crotalfina, presente em veneno de *C.d. terrificus*, possui um potente efeito antinociceptivo na dor neuropática, induzida por constrição do nervo ciático em ratos (GUTIERREZ *et al.*, 2008), bem como na hiperalgesia induzida pela administração de carragenina ou prostaglandina (KONNO *et al*., 2008). A crotalfina é um peptídio muito estável que atua em baixas doses quando administrada por via oral e possui um efeito muito duradouro. O efeito antinociceptivo da crotalfina também foi avaliado em modelos de nocicepção térmica através do teste da placa quente, que avalia a

atividade no sistema nervoso central, e o teste do *tail-flick*, que avalia a atividade central medular. Foi observado que a crotalfina aumentou o tempo de permanência do animal na placa quente, mas não aumentou o tempo de reação do animal no teste do tail-flick, demonstrando uma atividade cerebral, mas não medular (KONNO *et al*., 2008).

Foi evidenciado, através da administração da naloxona, que a atividade antinociceptiva da crotalfina é mediada pela ativação de receptores opióides (GUTIERREZ *et al.*, 2008; KONNO *et al*., 2008). KONNO *et al* (2008) mostrou que os receptores opióides κ e δ estão envolvidos no efeito antinociceptivo da crotalfina no modelo de hiperalgesia induzida por prostaglandina e carragenina.

Levando em consideração o fato de que a atividade analgésica envolve mecanismos centrais e periféricos mediados por receptores opióides e sendo a fração testada de baixo peso molecular, os autores sugeriram que a mesma poderia conter peptídeos que seriam responsáveis por esta ação (GIORGI *et al*.; 1993; PICOLO *et al*., 2003). Entretanto, Mancin *et al* (1998) sugeriram que a crotamina seria a fração do veneno da *C.d. terrificus* responsável pela maior ação antinociceptiva tanto central como periférico, já que a mesma constitui cerca de 22% do veneno total.

Moreira (2003) demonstrou através de testes clássicos de antinocicepção com o veneno de *C.d. collilineatus*, que, tanto o veneno crotamina positivo quanto o crotamina negativo, possuem atividade antinociceptiva, sugerindo que a antinocepção do veneno crotamina positivo envolve tanto mecanismos periféricos quanto centrais espinhal e supra-espinhal, enquanto o veneno crotamina negativo apresentaria apenas antinocicepção periférica. Esse estudo indicou a existência de outras substâncias, além da crotamina, envolvidas na analgesia periférica, mas não excluiu o papel da crotamina.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados no Laboratório de Toxinologia e Farmacologia Molecular, na Universidade Estadual do Ceará, com o veneno da subespécie *C.d. collillineatus (*Figura 01), uma serpente típica do Centro-Oeste brasileiro, na tentativa de isolar a substância responsável por essa ação analgésica.

Em 2005, LOPES isolou uma fração do veneno da *C.d. collilineatus* por meio de uma cromatografia líquida de alta eficiência isolando uma fração responsável pela ação analgésica periférica. A autora observou que a ação era mediada pelo sistema opióide, visto

que foi bloqueada pelo uso de naloxona. Essa fração apresentou uma ação (dose-a-dose) 500% maior que a morfina no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

GOMES (2007) aprofundou o estudo sobre o mecanismo de ação da fração isolada do veneno da *C.d. collilineatus* crotamina negativa e demonstrou que ela atua em receptores opióides periféricos do tipo *k*, sem ação no sistema nervoso central.

Verifica-se, através desses estudos na atualidade, a necessidade da descoberta de novas drogas com potencial terapêutico analgésico exclusivamente periférico, que além de apresentarem a vantagem de serem desprovidas dos efeitos colaterais típicos dos analgésicos de ação central, como a morfina, poderão ser capazes de tratar uma grande variedade de dores como as viscerais (pancreatites, dismenorréia, dores do parto), as odontogênicas, dentre outras dores agudas.

1.3. MECANISMOS DA NOCICEPÇÃO

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; DIAS, 2007).

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 dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), 1994, como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. 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 o organismo da causa da agressão, preservando-o (MILLAN, 1999; WOOLF *et al.*, 1999; VITOR *et al*, 2008).

A dor se manifesta de diferentes formas e por isso não pode ser entendida ou tratada como uma entidade única (BESSON, 1999). Cada tipo de dor possui mecanismos próprios e necessita de manejo específico, sendo, portanto, necessário o entendimento preciso de cada um deles. 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.

A dor apresenta dois componentes importantes: o sensorial e o emocional/afetivo. O componente sensorial corresponde ao mecanismo neurofisiológico e permite a transmissão e interpretação do estímulo nocivo através da ativação de receptores. O componente emocional é a percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN; BANSINATH, 1996; JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al*, 2004).

De acordo com o tipo de lesão e/ou mediadores envolvidos, a dor pode ser denominada em nociceptiva (estimulação excessiva dos nociceptores), neurogênica (associada a lesão do tecido neural), neuropática (associada a disfunção de um nervo) e psicogênica (associada com fatores psicológicos). Além disso, podem ocorrer manifestações dolorosas decorrentes de algumas desordens como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso), alodinia (dor em resposta a um estímulo não-doloroso) e hiperstesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON; CHAOUCH, 1987; DRAY *et al*, 1994; BESSON, 1999; CARR; GOUDAS, 1999).

A dor aguda tem um valor biológico adaptativo já que se desenvolve em resposta a um estímulo potencialmente nocivo ao tecido atuando como um sinalizador da integridade tecidual, promovendo respostas protetoras (SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CORTELLI; PIERANGELI, 2003; VITOR *et al*, 2008).

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 (SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CHONG; BAJWA, 2003). Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, contínua ou recorrente.(MERSKEY *et al.*, 1986; SMITH *et al*, 1986; FÜRST, 1999; VITOR *et al*, 2008). A dor crônica pode acarretar conseqüências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas e psicossociais, além de envolver grave estresse emocional. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação à sua persistência, alterações adaptativas, tais como neuroplasticidade em vários

níveis do sistema nervoso, e dificuldade de tratamento (IADAROLA; CAUDLE, 1997; BESSON, 1999; BASBAUM *et al*, 2009).

A dor aguda consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja térmico, químico ou mecânico, ocorrendo ativação contínua das vias centrais da dor (MILLAN, 1999; BASBAUM *et al*, 2009). Já a dor neuropática, segundo a IASP, é definida como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou Periférico (SNP). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores (GALLUZZI, 2007).

Em condições normais, a dor está associada a uma atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos. Os nociceptores são estruturas não mielinizadas e ramificadas que sinalizam quando o tecido corporal está sofrendo injúria ou em risco de sofrer lesão e estão presentes nas terminações sensoriais dos tecidos periféricos (CESARE; MCNAUGHTON, 1997; VITOR *et al*, 2008). Eles estão presentes na maioria dos tecidos corporais, são ausentes no encéfalo, embora sejam encontrados nas meninges (BEAR *et al.*, 2002). Os nociceptores podem ser ativados por estímulos de vários tipos, tais como: mecânicos, térmicos e químicos (CESARE; MCNAUGHTON, 1997; BASBAUM *et al*, 2009), sendo considerados polimodais, com alguns sendo seletivos (BEAR *et al.*, 2002).

Existem também os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”) os quais existem em pequena proporção nas fibras aferentes primárias e não respondem normalmente a estímulos. (JULIUS; BASBAUM, 2001).

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. Os nociceptores ativados geram estímulos que são conduzidos à medula por dois tipos de fibras aferentes periféricas que se ligam a eles: A-delta (Aδ) e C (SAWYNOK, 2003). As fibras A-δ são de condução rápida (10-30 m/s) e mielinizadas, enquanto que as fibras C conduzem lentamente (0,5-2 m/s) o impulso e não são mielinizadas, com algumas atuando como quimiorreceptores. As fibras A-δ estão localizadas na pele e membranas mucosas e as fibras C estão largamente distribuídas nos tecidos e na pele (CARVALHO; VIANNA, 1994). Existem ainda as fibras Aβ, que também são mielinizadas e

de grande diâmetro sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso, respondendo a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, faz sinapses com neurônios secundários do corno da medula dorsal (BESSON, 1999; MILLAN, 2002).

Um estímulo doloroso mais intenso leva à ativação de nociceptores polimodais (fibras C) que desencadeiam uma sensação de dor difusa e persistente, que persiste após o término do estímulo (PERL, 2007). Os aspectos emocionais da dor já aparecem nesta fase e se tornam mais importantes nos quadros de dor crônica (AGUGGIA, 2003). As fibras Aδ são responsáveis pela condução da "primeira dor" que se caracteriza por ser rápida, aguda e pontual, enquanto que as fibras C transmitem a "segunda dor", sendo esta atrasada, difusa e fraca (JULIUS; BASBAUM, 2001; MEYER *et al*, 2008).

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídios são liberados pelos terminais dos aferentes primários no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias destacam- se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotrasmissores e neuropeptídios, incluindo as taquicininas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídio geneticamente relacionado com a calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide-CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), galanina, encefalinas e endorfinas (WOOLF, 1994; CAO *et al*, 1995; MILLAN, 1999; VITOR *et al*, 2008).

O glutamato é o maior neurotransmissor que comunica os neurônios aferentes periféricos com os neurônios do corno dorsal promovendo a estimulação das fibras aferentes primárias gerando rápidos potenciais pós-sinápticos nos neurônios do corno dorsal da medula (NESTLER *et al.*, 2001; SAWYNOK, 2003).

Existem mecanismos de regulação ascendente e descendente da transmissão dos estímulos nociceptivos (Figura 02), determinando a intensidade da dor. A regulação ascendente age na transmissão periférica para o cérebro; já a descendente pode controlar a transmissão no sentido inverso (JOHNSON, 2000; BASBAUM *et al*, 2009).

A transmissão aferente do estímulo nociceptivo relaciona informações vindas da periferia em direção ao córtex, sendo estreitamente dependente da integração em três níveis

do sistema nervoso: a medula espinhal, o tronco cerebral e o cortéx cerebral (ALMEIDA, 2004).

A transmissão da dor se faz por uma via bem estudada e conhecida, onde os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, em lâminas distintas (BASBAUM; JESSELL, 2000) (fibras C – lâminas I e II, fibras Aδ – lâminaV e fibras Aβ – lâminas III, IV e V) (BASBAUM *et al*, 2009), na substância gelatinosa (SG) da medula espinhal e os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO; BROSE, 1998; VITOR *et al*, 2008). O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. (FÜRST, 1999). Esta transmissão da dor representa sua via clássica (figura 02), mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (BESSON, 1999; JABBUR; SAADÉ, 1999).

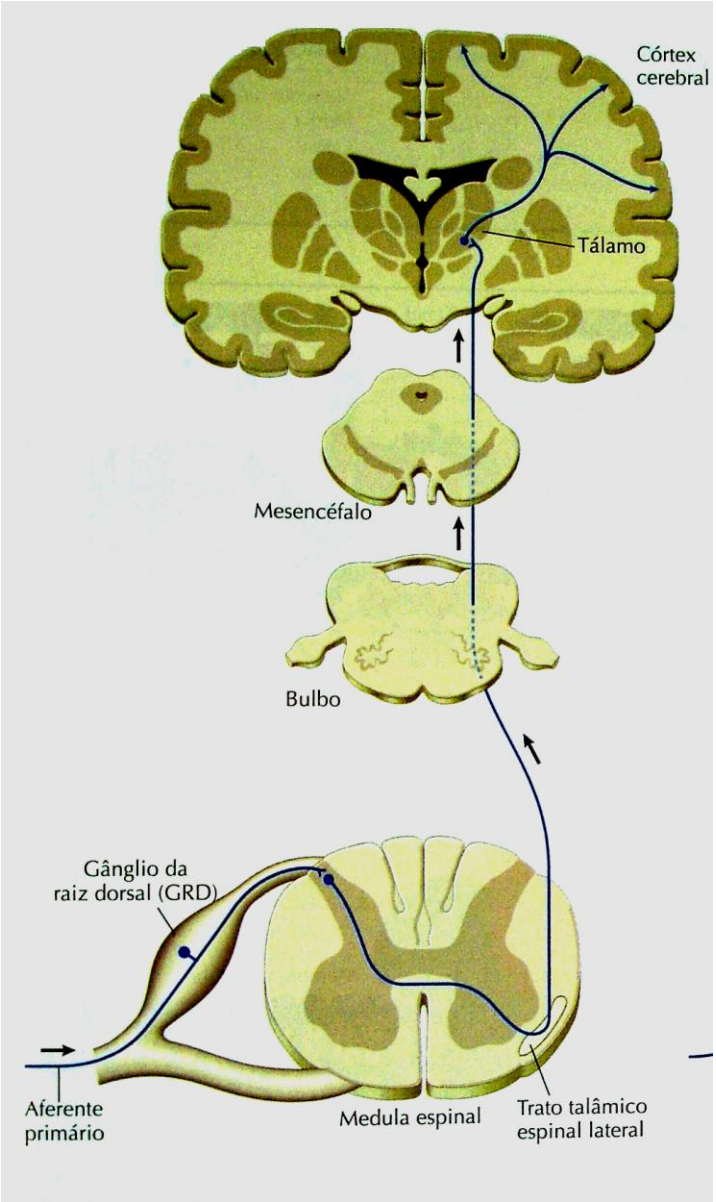


Figura 02 - Via ascendente da nocicepção.
Fonte: BEYZAROV, 2006

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da sensação dolorosa, o organismo humano dispõe de sistemas moduladores da dor. Isto significa que o sistema nervoso central (SNC) não atua apenas como um centro receptor destes estímulos, mas que também modula a transmissão desta informação permitindo-nos selecionar determinadas informações sensoriais como o que ocorre, por exemplo, em circunstâncias de alto estresse para o indivíduo (VITOR *et al*, 2008). A descoberta destas vias regulatórias da dor iniciou-se em 1965, quando MELZACK e WALL propuseram a existência de um sistema de controle da dor por comporta, a "Teoria do portão" (Figura 03), pelo qual a entrada dos impulsos nociceptivos no SNC seria regulada pela atividade de interneurônios inibitórios

presentes no corno dorsal da medula espinhal, mais especificamente na área denominada substancia gelatinosa (SG, lâmina II de Rexed). Posteriormente, ocorreram descobertas que demonstraram que a eficácia de comporta também poderia ser regulada por estruturas supraespinhais. Pesquisas subseqüentes comprovaram que a substancia cinzenta pareaquedutal, faz parte de um circuito central que controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (CDME) (FIELDS; BASBAUM, 1999).

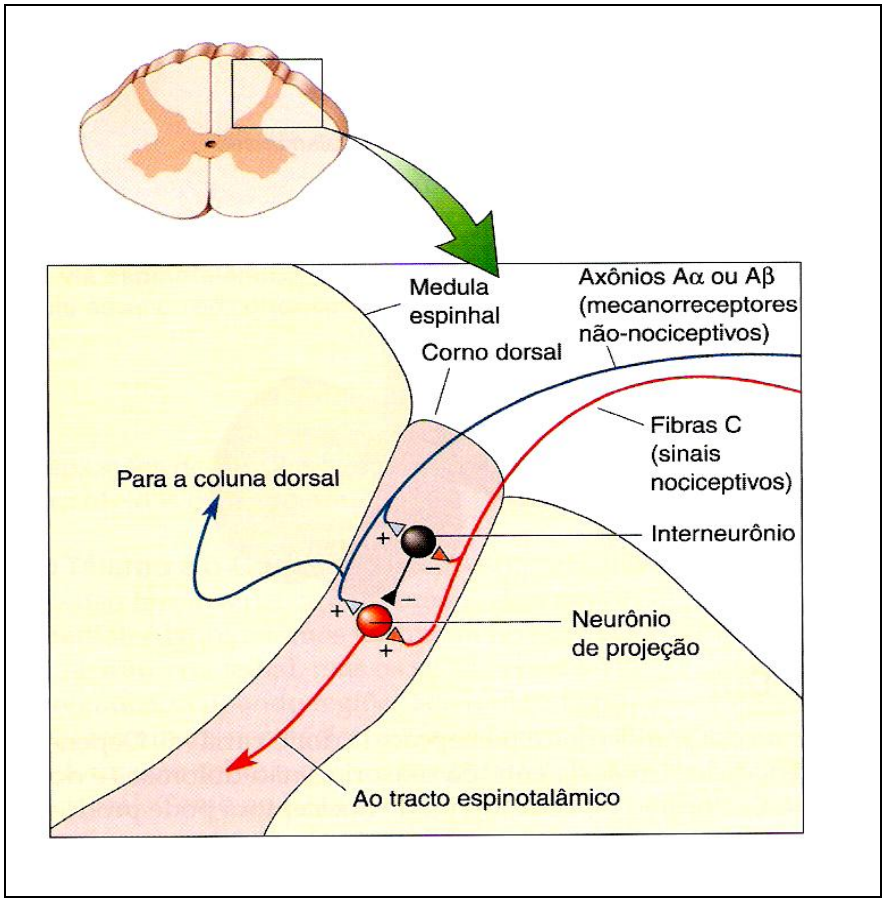


Figura 03: Teoria do Portão de MELZACK & WALL. Fonte: BEAR *et al,* 2002

As vias descendentes, que 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 (MELZACK; WALL, 1965; GUTSTEIN *et al*., 1998).

Existe também a participação de vias descendentes no "mecanismo de portão" (Figura 03), que controlam a transmissão de impulsos no corno dorsal que se origina na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), área do tronco encefálico. A PAG recebe informações de várias áreas do encéfalo relacionadas com o estado emocional, enviando-as, por projeções descendentes, para a ponta dorsal da medula espinhal, onde ocorrerá a depressão dos neurônios nociceptivos. Nesta via, foi evidenciada a endorfina, um tipo de neurotransmissor fabricado por células na PAG, sendo liberada na ponta dorsal para interagir com receptores inibitórios nos neurônios nociceptivos (JOHNSON, 2000; RANG *et al.*, 2001).

A via inibitória descendente constitui um importante alvo para ação dos analgésicos opióides (RANG *et al*, 2001; BENNETT, 2005). Visto que baixas doses de morfina ou endorfinas no PAG, no NRM ou no corno dorsal podem causar analgesia, além de tal efeito ser inibido pela naloxona, que é um bloqueador específico opióide. Assim, supõe-se que os receptores opióides sejam os locais dessas drogas (BEAR *et al*., 2002).

1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANALGÉSICOS OPIÓIDES

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).

Em 1973, Snyder e colaboradores conseguiram provar que os opióides são reconhecidos por receptores específicos. Conclusivamente, estudos farmacológicos confirmaram, por clonagem dos receptores, que existem três tipos principais de receptores de opióides, chamados de: *um* (μ), κ e δ que medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opiáceos (WAY *et al.*, 2002; STEIN *et al*, 2009). Esses receptores podem, ainda, ser subdivididos em diferentes subtipos: μ_1, μ_2, k_1, k_2, k_3, δ_1, δ_2 (KRAYCHETE, 2002).

A morfina e a maioria de seus análogos exercem seus efeitos analgésicos atuando principalmente nos receptores μ. Os agonistas dos receptores δ também são analgésicos potentes, só que não atravessam a barreira hematoencefálica, por essa razão, precisam ser administrados via intratecal. Já os agonistas k seletivos induzem analgesia mediada principalmente nos locais espinhais. No entanto, em relação aos efeitos neurais, estudos

demonstram que os agonistas μ e k exercem efeitos antagônicos, enquanto o primeiro provoca euforia, o segundo causa efeitos disfóricos (GUTSTEIN; AKIL, 2003; MERRER *et al*, 2009).

Uma elevada concentração de receptores está localizada no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal cinzenta, núcleos da rafe, na região ventral superior do bulbo e da ponte e *locus ceruleus* (MERRER *et al*, 2009). Algumas dessas substâncias estão relacionadas às vias inibitórias descendentes que modulam a transmissão do estímulo doloroso. Observa-se, também, a presença de receptores nas amígdalas e córtex cerebrais, no hipocampo, no núcleo caudado e globo pálido, na medula supra-espinhal, nos plexos nervosos e glândulas exócrinas do estômago e intestino, sugerindo a participação dos opióides na regulação o comportamento motor, afetivo, neurovegetativo e neuroendócrino (KRAYCHETE, 2002; MERRER *et al*, 2009).

Os receptores opióides estão expressos nos nervos envolvidos na transmissão da dor (trajetória ascendente sensorial) e modulação (trajetória inibitória descendente) na periferia, na medula espinhal e no cérebro (MANSOUR *et al*., 1994). Eles previnem a ativação e sensibilização dessas fibras e inibem a liberação de neurotransmissores, por estarem presentes nas fibras C dos nervos aferentes primários sensitivos (STEIN *et al.*, 1993).

Os receptores opióides são acoplados à proteína G inibindo a adenilato ciclase e reduzindo o conteúdo intracelular de AMPc (DHAWAN *et al.*, 1996). Os três subtipos de receptores exercem esse efeito, além de efeitos sobre os canais iônicos através de um acoplamento direto da proteína G ao canal. Através desse mecanismo, 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) (NORTH, 1993; WAY *et al.*, 2002).

Os agonistas κ exercem uma potente atividade analgésica em uma grande variedade de modelos viscerais de dor mediados por receptores κ periféricos e, possivelmente, por uma ação não opióide em canais de sódio nas terminações periféricas de aferentes sensoriais primários. A presença de inflamação potencia a atividade analgésica dos agonistas κ na dor visceral, relatada por modelos de dor somática envolvendo inflamação. Dessa forma, uma grande variedade de dores viscerais incluindo cirurgias abdominais, pancreatites,

dismenorréia, dores do parto e desordens funcionais como síndrome do intestino irritado e dispepsia o poderão ser tratadas por agonistas k periféricos (RIVIÈRE, 2004).

VANDERAH *et al* (2004) verificaram a presença de atividade antinociceptiva periférica e antihiperalgésica através do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, com ausência dos efeitos colaterais típicos dos agonistas κ centrais, com a utilização de um novo peptídeo agonista k e com provável possibilidade da aplicação terapêutica do mesmo.

Os agonistas do receptor δ opióide mostram uma forte atividade antinociceptiva com relativamente poucos efeitos colaterais e uma reduzida propensão ao desenvolvimento da tolerância, já que possuem um potencial analgésico atrativo (VARGA *et al*., 2004).

1.5. PEPTÍDIOS OPIÓIDES ENDÓGENOS

Devido o conhecimento e a caracterização de receptores opióides os pesquisadores passaram a buscar ligantes endógenos para os mesmos chegando à descoberta de um número de peptídeos endógenos que se liga a receptores opióides e têm efeitos semelhantes aos da morfina (SMITH; REINARD, 1995; VAN REE *et al.*, 2000). Esta descoberta esclareceu que as ações da morfina baseavam-se na sua capacidade de imitar as ações de uma família de mediadores endógenos, denominados peptídios opióides.

HUGHES *et al* em 1975 e 1976 descobriram os primeiros peptídeos endógenos, as encefalinas e as β-endorfinas, respectivamente. Anos mais tarde foi identificado um novo peptídio, a dinorfina, que é cerca de 200 vezes mais potente que a morfina (GOLDSTEIN *et al* 1979). ZADINA *et al*, em 1997, encontraram no cérebro um novo grupo de peptídeos, as endomorfinas. Outro peptídeo endógeno encontrado é o sistema pronociceptina que consiste de peptídeos derivados deste pró-hormônio (MEUNIER, 1997; MORAN *et al.*, 2000).

Esses peptídios encontram-se amplamente distribuídos no cérebro e nos tecidos periféricos (TRIGO *et al*, 2009). Na medula espinhal, a dinorfina ocorre principalmente nos interneurônios, enquanto as encefalinas são encontradas principalmente nas vias descendentes longas que se estendem do mesencéfalo até o corno dorsal. Os peptídios opióides também são produzidos por muitas células não-neuronais, incluindo glândulas endócrinas e exócrinas do sistema imune, bem como em áreas cerebrais distintas daquelas envolvidas na nocicepção;

correspondentemente, têm função reguladora em muitos sistemas fisiológicos diferentes, refletindo-se nas propriedades farmacológicas bastante complexas dos opiáceos (RANG *et al.*, 2001).

Os diferentes peptídeos opióides mostram alguma preferência por diferentes receptores: β-endorfina por μ, encefalinas por δ e dinorfinas por k (DHAWAN *et al.*, 1996; STEIN *et al*, 2009). Já as endomorfinas 1 e 2, possuem alta seletividade para o receptor opióide μ. (FICHNA *et al*., 2007).

Estudos atuais indicam que vários opióides fenantrênicos (morfina, codeína) também podem ser encontrados como substâncias endógenas em concentrações muito baixas (da ordem de picomolar) em tecidos de mamíferos, porém o seu papel nesses locais ainda não foi estabelecido (WAY *et al.*, 2002).

Algumas das funções dos peptídeos endógenos parecem já conhecidas, como a função sensorial (importante na inibição das respostas aos estímulos dolorosos), um papel modulador nas funções gastrointestinais, endócrinas e autônomas, uma função emocional que se evidencia pela propriedade poderosa de gerar gratificação e dependência e uma função cognitiva na modulação da aprendizagem e memória (GUTSTEIN; AKIL, 2003; BODNAR, 2008).

1.6. ANALGÉSICOS OPIÓIDES: INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS, TOXICIDADE E EFEITOS COLATERAIS

O alívio da dor é um dos principais objetivos da Medicina, por isso, um dos temas mais importantes na farmacologia tem sido a busca por drogas que aliviem a dor, juntamente com o sofrimento causado por esta. Todos os medicamentos usados para o alívio da dor têm a marca e o padrão dos opióides, especificamente a morfina, que após séculos continua sendo utilizada como importante agente terapêutico para o alívio de dores moderadas a severas (SMITH; REYNARD, 1995; CHILDERS, 1997; WAY *et al.*, 2002; OSSIPOV, *et al.*, 2003).

O alcalóide mais importante do ópio é a morfina, que pertence ao grupo fenantrênico e possui na sua fórmula estrutural dois grupos hidroxilas (CARVALHO; VIANNA, 1994). Da molécula da morfina, foram produzidos variantes por substituição de um

ou ambos os grupos hidroxila (o OH fenólico na posição 3 e o OH alcoólico na posição 6), por substituição no átomo de nitrogênio na posição 17 (RANG *et al.*, 2008) e por eliminação de anéis (KRAYCHETE, 2002). A palavra opióide é utilizada para qualquer substância, endógena ou sintética, capaz de agir de forma semelhante à morfina e que pode ser bloqueada por antagonistas como a naloxona (HERZ, 1993).

Os opióides variam não apenas na sua especificidade para receptores, mas também na sua eficácia sobre os diferentes tipos de receptores. Assim, alguns agentes atuam como agonistas puros (possuem um efeito máximo para analgesia, e incluem a maioria das drogas típicas semelhantes à morfina. Ex: codeína, metadona e dextropropoxifeno) em um tipo de receptor, antagonistas (drogas que 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) (RANG *et al.*, 2008; KRAYCHETE, 2002), possuindo um quadro farmacológico muito complicado.

Os opióides foram estudados mais intensamente do que qualquer outro grupo de drogas, na tentativa de se compreender seus poderosos efeitos em termos moleculares, bioquímicos e fisiológicos, permitindo o desenvolvimento de novos agentes dotados de vantagens significativas em relação à morfina. Mesmo com esse estudo, a morfina continua sendo o agente convencional para avaliação de qualquer novo agente (DUGGAN; NORTH, 1984; PASTERNAK, 1993; YAKSH, 1997).

A morfina e todos os seus derivados mostram-se eficazes na maioria dos tipos de dor aguda e crônica, embora os opióides sejam, em geral, menos úteis nas síndromes de dor neuropática (como o membro fantasma e outros tipos de dor de desdiferenciação, neuragia do trigêmio, etc.) do que na dor associada à lesão tecidual, inflamação ou crescimento de tumor (RANG *et al.*, 2008).

Como utilização clínica, os agonitas opióides são empregados no alívio da dor aguda intensa ou crônica moderada, como as associadas às dores pós-operatórias, dores associadas às lesões agudas, cólica renal ou biliar, infarto agudo do miocárdio ou câncer. Essas substâncias podem ser utilizadas, também, na sedação pré-operatória e anestesia suplementar (CLAYTON; STOCK, 2006; BODNAR *et al*, 2008).

Os opióides causam diversas reações colaterais: depressão respiratória, náusea, vômito, constipação, distúrbios cardiovasculares (como hipotensão e bradicardia), aumento da pressão intracraniana, miose, espasmo dos tratos biliar e urinário e, mais raramente, fenômenos de hipersensibilidade, *rach* e reações anafilactóides (JEFFE; MARTIN, 1996; ZÖLLNER; STEIN, 2007). CLAYTON; STOCK (2006) relataram outros efeitos colaterais dos opióides como cefaléia leve, confusão, sedação, sudorese (sintomas que aparecem, geralmente, com a dose inicial), desorientação, hipotensão ortostática (manifestada por tonteira e fraqueza, ocorrendo no início da terapia).

Os agonistas opióides podem produzir tolerância ou dependência psicológica e física com o uso contínuo e prolongado, sendo essas as principais limitações clínicas aos seus usos (JEFFE; MARTIN, 1996; OSSIPOV *et al.*, 2003; MERRER *et al*, 2009). A tolerância ocorre na necessidade de doses cada vez maiores para se conseguir o mesmo efeito analgésico. O uso contínuo de agentes opióides pode ocasionar respostas hiperalgésicas durante uma retirada precipitada dos mesmos. Esta observação sugere que um processo pró-nociceptivo possa ser desenvolvido. Uma sensibilidade dolorosa anormal incluindo hiperalgesia e alodinia ocorre em animais que estão recebendo administração de opióides na ausência de interrupções. Esse efeito paradoxal de sensibilidade dolorosa induzida por opióides pode contribuir para a manifestação de tolerância aos mesmos (MAO, 2002; OSSIPOV *et al.*, 2003).

A dependência pode aparecer após três a seis semanas do seu uso contínuo, tendo como sinais iniciais de suspensão, a sudorese, o cansaço, erupções cutâneas, corrimento nasal, lacrimejamento e midríase. Esses sintomas aumentam nas próximas 24 horas, onde o paciente desenvolve dores intensas nas costas, abdome e pernas, espasmos abdominais e musculares, sensações rápidas de calor e frio, insônia, náuseas, diarréia e vômitos, aumento a temperatura corporal e coriza intensa, assim como da pressão arterial e das freqüências respiratória e cardíaca. Esses sintomas desaparecem de 5 a 14 dias, tendo seu pico máximo em 36 a 72 horas após interrupção do medicamento (CLAYTON; STOCK, 2006).

A morfina também produz acentuada dependência psicológica, manifestada na forma de desejo mórbido pela droga, que é provavelmente mais importante do que a síndrome da abstinência física como fator responsável pela dependência do ser humano - apesar de ser muito mais difícil de estudar (RANG *et al*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os atuais analgésicos utilizados para o tratamento de dores agudas e crônicas apresentam muitos efeitos colaterais, devido suas ações sobre o sistema nervoso central, tais como tolerância, dependência física, depressão respiratória e distúrbios cardiovasculares, intensas pesquisas tem sido realizadas na atualidade em busca de novas drogas que possuam menos efeitos colaterais e uma maior eficácia no tratamento da dor. A relevância do atual projeto reside na busca de uma nova substância biologicamente ativa no veneno da serpente *C.d. collilineatus* que atue sobre a dor aguda experimental, com menos efeitos colaterais, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos que poderão ser utilizados de uma maneira mais eficaz no tratamento da dor no homem, melhorando conseqüentemente a sua qualidade de vida.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e estudar um fator com efeito analgésico presente no veneno da serpente *C.d. collillineatus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar, em escala preparativa, uma substância responsável pelo efeito antinociceptivo nesse veneno por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) preparativa;

2. Realizar estudos de analgesia *in vivo* em camundongos, sobre dores agudas através dos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina (dores de origem neurogênica e inflamatória), teste do *tail-flick* (dores envolvendo mecanismo a nível medular) e teste da placa quente (dores envolvendo mecanismo de origem cerebral);

3. Comparar a atividade analgésica do fator com a da morfina, analgésico opióide clássico;

4. Verificar o envolvimento do sistema opióide no efeito analgésico da nova substância através do uso da naloxona – antagonista opióide clássico.

4. MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. REAGENTES

- Ácido acético glacial; Merck, Brasil
- Formaldeído 37%; Merck, Brasil
- Cloreto de Sódio; Reagen, Brasil
- Álcool etílico P.A.; Merck, Brasil
- Água bidestilada; Universidade Estadual do Ceará, Brasil
- Morfina; Sigma, USA
- Naloxona; Sigma, USA

4.1.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS

- Agitador de tubos; Phoenix AP56, Brasil
- Balança Analítica; Marte- AM550, Brasil
- Balança de precisão; Mettler- Balance, USA
- Centrífuga refrigerada; Annita I, Eslovênia
- Cronômetro; Leônidas Trackmater, Alemanha
- Coluna preparativa; C18(2,4x 5 cm)Vydac
- HPLC; Shimadzu LC- 10AS,Japão
- Liofilizador; Edwards- Modulyo, Inglaterra
- pH ; Micronal, Brasil
- Pipetas automáticas; Gilson, França
- Placa Quente; Socrel DS37
- Refrigerador
- Tail Flick; Insigth
- Termômetro; ASPIN 09654.10,Brasil

4.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.2.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), adultos-jovens, de 2 a 4 meses, machos, com peso variando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (UECE). Os animais foram mantidos em gaiolas próprias, recebendo ração padrão 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 Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará - CEUA/UECE - 58/2009(09233135-1).

4.2.2. FRACIONAMENTO DO VENENO DE *Crotalus durissus collillineatus*

O veneno bruto da *C.d.collilineatus* foi gentilmente cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo. A fração sobrenadante do veneno bruto da *C.d. collillineatus* foi ressuspendido previamente em solução de ácido trifluoroacético (TFA) (0,05%) na concentração de 20 mg/ml e 200 μl foram aplicados de cada vez em uma coluna preparativa de fase reversa C18 (Shim pack prep. ODS 30 x 2,5 cm) acoplada ao HPLC (Figura 04) e eluída com um fluxo de 5 ml/min com gradiente de acetonitrila de 0 a 80% em 30 minutos para purificação de peptídeos e substâncias de baixo peso molecular. As frações correspondentes aos picos obtidos foram coletadas, liofilizadas e em seguida ressuspensas em salina, cujas alíquotas foram testadas para a atividade biológica (fator Cdc).

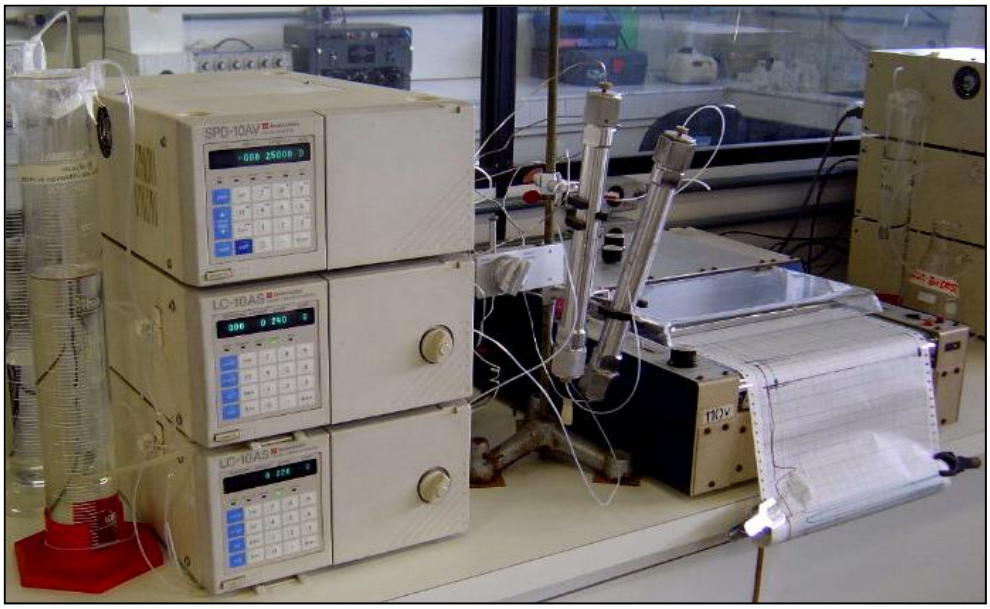


Figura 04 – Cromatógrafo Preparativo de Elevada Performance (Laboratório de Toxinologia e Farmacologia Molecular – UECE).

4.3. DETERMINAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA QUÍMICA DO FATOR

A determinação da estrutura química do fator foi parcialmente elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no CENAUREM (Centro Nordestino de Ressonância Magnética Nuclear). A análise da RMN de alta resolução do fator purificado foi realizada através de sequências modernas de pulsos tais como 1H, 1H-COSY e NOESY, correlação heteronuclear (inversa) de carbono e hidrogênio do carbono-hidrogênio acoplados (Hector e HMQC), assim como as sequências equivalentes de longa extensão (COLOC e HMBC). Os detalhes da metodologia utilizados foram anteriormente descritos (CARVALHO *et al*, 1999).

4.4. MODELOS DE NOCICEPÇÃO

4.4.1 TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

Foi realizado o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) capaz de produzir contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de pelo menos uma das patas posteriores em uma injeção intraperitoneal (i.p.) (Figura 05) de ácido acético (contorções abdominais) (Figura 06) (COLLIER *et al*., 1968; BENTLEY *et al*, 1981). Embora seja um modelo simples e pouco específico, o teste das contorções abdominais é muito sensível e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico.

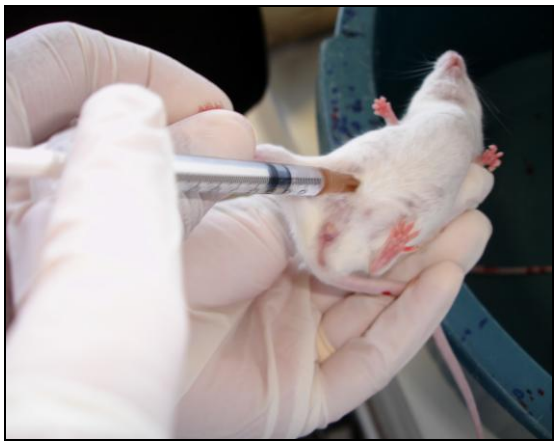


Figura 05 – Via de administração intraperitoneal.

Figura 06 – Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Grupos distintos de animais (n = 06) foram pré-tratados, pela via intravenosa (i.v.) (Figura 07) com o fator isolado do veneno da *C.d. collillineatus* (Cdc) nas doses de 1mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg. Após 05 minutos da administração do fator Cdc, foi administrado o ácido acético (0,8%) i.p. num volume de 300µl por animal (camundongos com peso de 25-30g cada) (Figura 08). Os grupos controle receberam o mesmo volume de salina, veículo utilizado para diluir o composto em análise, na mesma via de administração (i.v.).

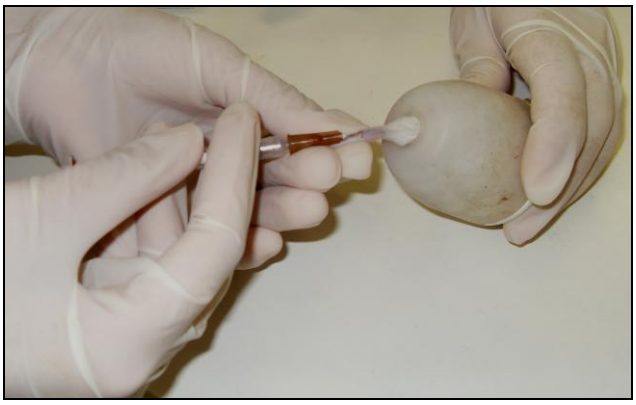


Figura 07 – Injeção do fator Cdc na Via intravenosa

Após a injeção do ácido acético, os animais foram observados quantificando-se, cumulativamente, o número de contorções abdominais, durante um período de 25 minutos (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1956) (Figura 08). A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções dos animais tratados em relação ao número de contorções dos animais do grupo controle.

Foi administrada a morfina, opióide clássico, na concentração de 5mg/kg i.v. como controle positivo. O fator Cdc (10mg/kg) e a morfina (5mg/kg) foram testados em relação ao efeito opióide através do uso conjunto com a naloxona – antagonista opióide clássico, administrada na via i.p., 20 minutos antes das substâncias supracitadas, na concentração de 5mg/kg (Figura 08).

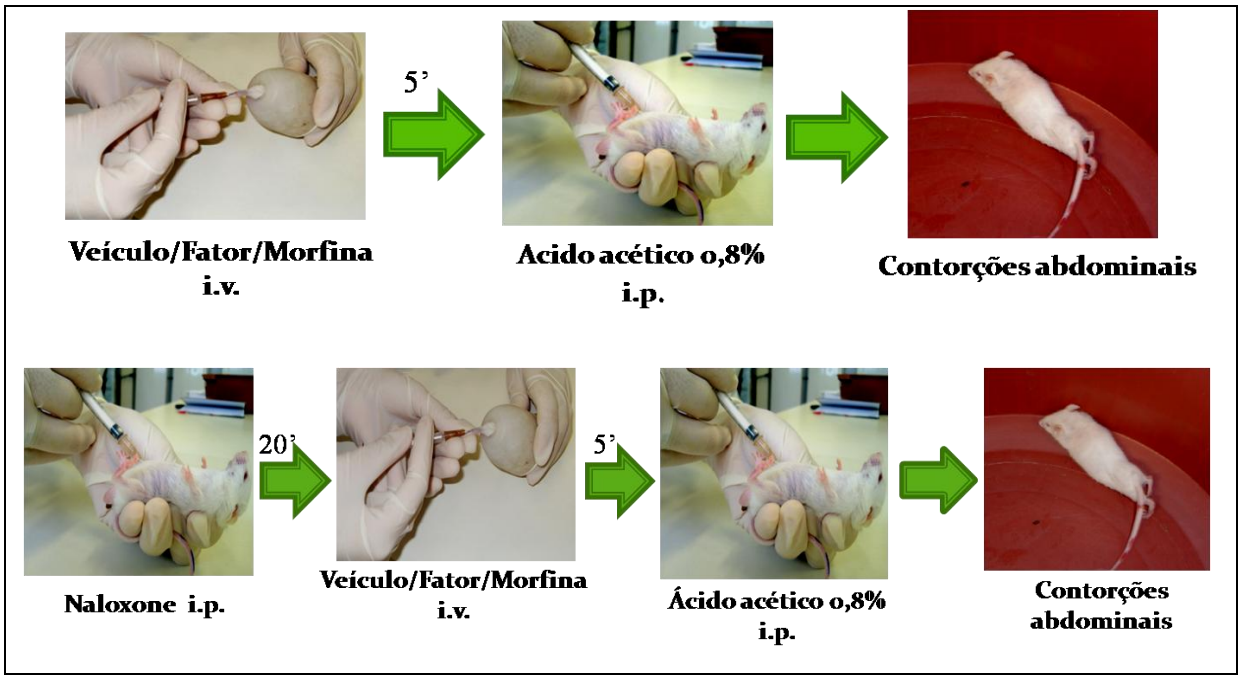


Figura 08 – Desenho experimental do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

4.4.2. TESTE DA FORMALINA

O teste da injeção subplantar de formalina (4%), um modelo mais específico que o teste das contorções abdominais, permitiu avaliar dois tipos de dor: uma de origem neurogênica, como resultado da estimulação direta dos neurônios nociceptivos, observada nos primeiros 5 minutos após a administração da formalina, e outra de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, observada entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina e representando a resposta tônica à dor.

Os procedimentos para esse modelo foram como os já descritos na literatura (HUNSKAAR *et al*, 1985; TJÆLSEN *et al*, 1992; CORRÊA; CALIXTO, 1993). O teste foi realizado à temperatura ambiente de 24-25°C e na ausência de fatores experimentais que possam afetar o fluxo sanguíneo periférico, devido à grande sensibilidade da resposta na segunda fase (tardia). Este teste consistiu na injeção subplantar de formalina (4% diluído em água bidestilada; 20µl/pata) na pata traseira direita (Figura 09) em um grupo de 6 camundongos, onde foi induzida a nocicepção química, segundo o método de HUNSKAAR *et al* de 1987. Foi registrado o tempo gasto, em segundos, pelo animal para responder ao estímulo notando-se dois períodos: 0-5 min (primeira fase - neurogênica) e de 15 – 30 min (segunda fase - inflamatória) após a administração da formalina (TJÆLSEN *et al*, 1992). A resposta foi caracterizada por sacudidas rápidas da pata injetada e por mordidas e/ ou lambidas leves.

Figura 09 – Injeção subplantar de formalina 4%.

O fator Cdc foi administrado pela via intravenosa nas doses 1mg/kg; 2,5mg/kg; 5mg/kg e 10mg/kg (n=6) e, após 5 min, os animais receberam uma injeção subplantar de formalina 4% na pata traseira direita. O grupo controle recebeu também na via i.v., o veículo salina. Como controle positivo foi administrada, por via i.v., morfina (5mg/kg) e após 5 minutos foi realizado teste (Figura 10).

Para avaliar o envolvimento do sistema opióide, a naloxona, um antagonista opióide clássico, foi administrada por via i.p., na dose de 5mg/kg, 20 minutos antes do tratamento com o fator Cdc (10mg/kg i.v.) e da morfina (5mg/kg, i.v.) (Figura 10).

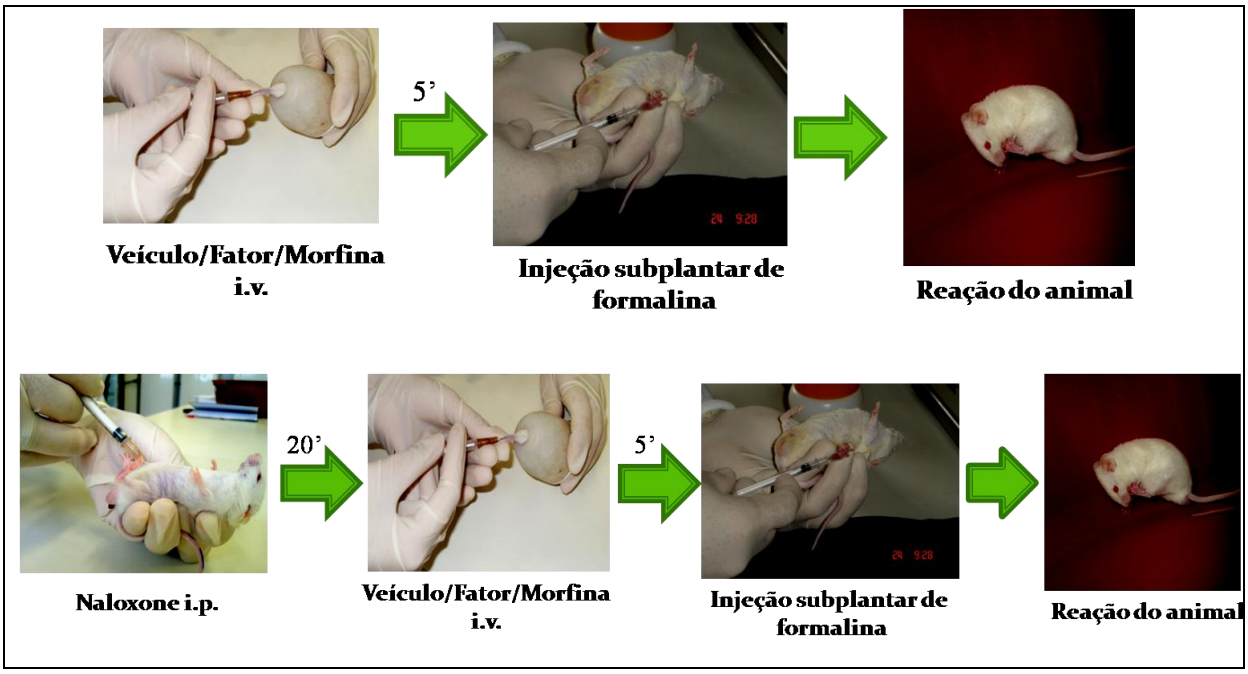


Figura 10 – Desenho experimental do teste da formalina

4.4.3. TESTE DA PLACA QUENTE

O teste da placa quente teve como objetivo determinar a atividade analgésica central do fator. Este teste, proposto por WOOLFE; MC DONALD (1944) consiste em colocar os animais sobre uma placa quente (55 °C ± 1,0 °C) (Figura 11) e observar quanto tempo levam para manifestar uma resposta (lamber, morder, saltar ou levantar as patas) (Figura 12).

Figura 11 – Aparelho Placa Quente

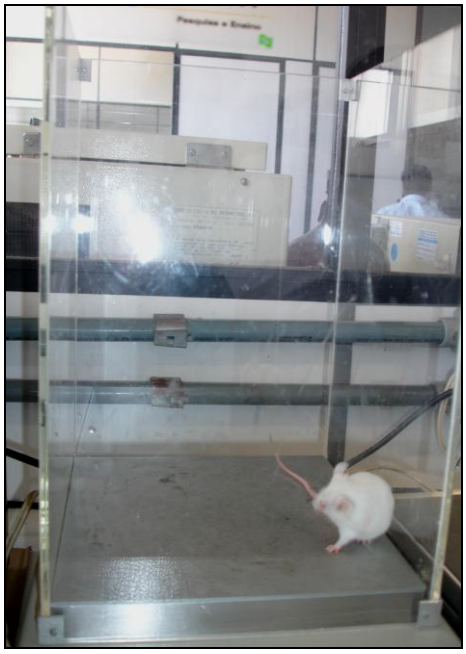


Figura 12 – Teste da placa quente – animal respondendo ao estímulo (lambidas)

Cada grupo tratado foi constituído por 06 animais. O grupo controle recebeu o veículo salina pela via de administração i.v. antes do teste, enquanto os grupos tratados receberam doses crescentes do fator Cdc (1mg/kg; 2,5mg/kg; 5mg/kg e 10mg/kg), também i.v.. Como controle positivo, foi administrada, por via i.v., morfina (5mg/kg) e após 5 minutos os animais foram colocados na placa quente (Figura 13). Para prevenir danos nas patas dos animais, foi considerado como tempo máximo de reação 40 segundos.

Tanto o fator Cdc (10mg/kg) quanto à morfina (5mg/kg) foram testados em relação ao efeito opióide através do uso conjunto com a naloxona – antagonista opióide clássico, usada i.p. 20 minutos antes das substâncias supracitadas, na concentração de 5mg/kg (Figura 13).

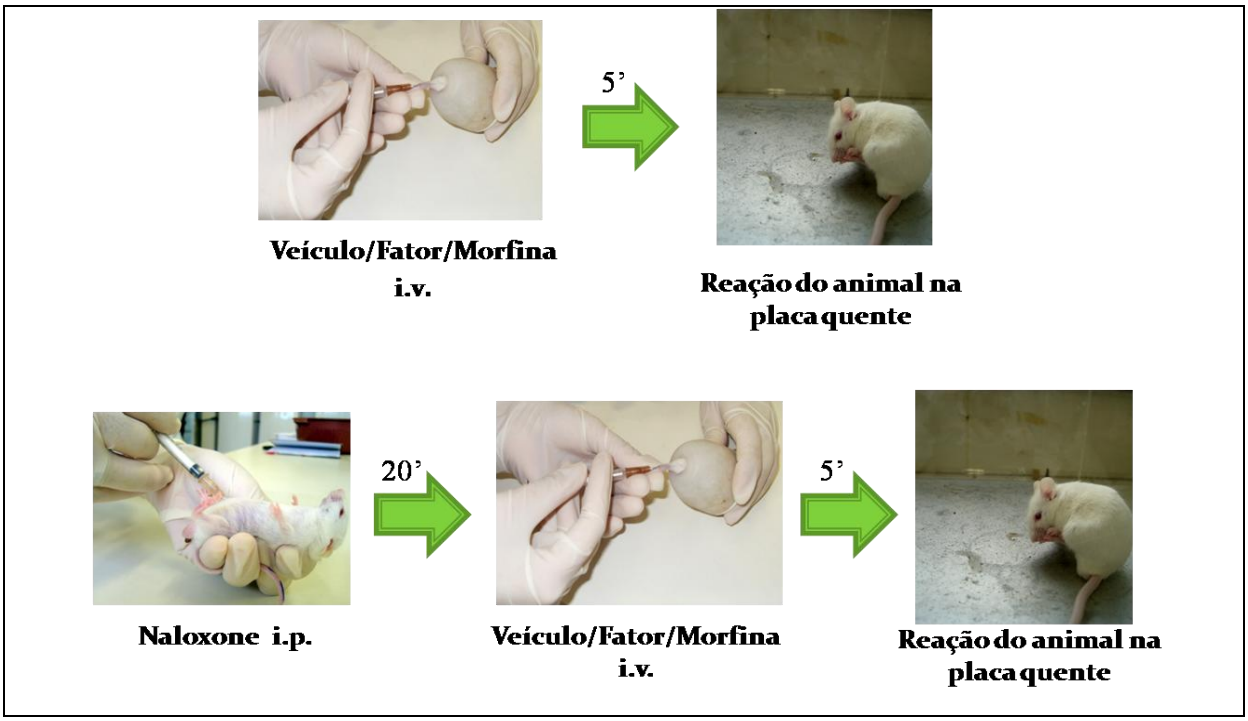


Figura 13 – Desenho experimental do teste da placa quente

4.4.4. TESTE DA RETIRADA DA CAUDA (*Tail Flick*): DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA MEDULAR

Este método teve como objetivo verificar a eficácia do fator contra a nocicepção térmica e seu envolvimento central medular. O teste consistiu na aplicação de radiação térmica através de um filamento que é aquecido, gradativamente até 70°C durante 16 s, em contato com uma pequena superfície da cauda do animal (HARDY, 1953; HARDY *et al*., 1957) (Figuras 14 e 15). Este estímulo térmico provoca uma reação de retirada da cauda dos animais do grupo controle através de um movimento reflexo de origem espinhal rápido e vigoroso. Quando há um aumento do tempo ou da temperatura de retirada da cauda, este é interpretado como uma ação analgésica. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base o aumento da temperatura para retirada da cauda dos animais tratados em relação às mesmas respostas dos animais do grupo controle (D'AMOUR; SMITH, 1941; SMITH *et al*., 1943; RAFFA *et al*., 1992).

Figura 14 - Aparelho para o teste da retirada da cauda (*Tail Flick)*

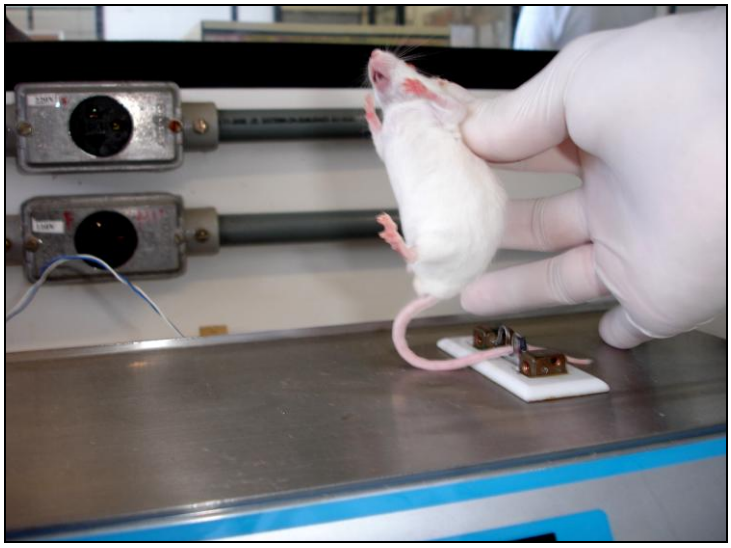


Figura 15 - Animal imobilizado com 1/3 apical da cauda introduzida no filamento do aparelho do *Tail Flick*.

Nos grupos experimentais (*n*=6), o fator Cdc foi administrado pela via intravenosa nas concentrações de 1mg/kg; 2,5 mg/kg; 5mg/kg e 10mg/kg, 5 min antes da realização do teste. O grupo controle recebeu, também por via i.v., o veículo salina. Como controle positivo, foi administrada a morfina, opióide clássico, na concentração de 5mg/kg i.v. (Figura 16).

Tanto o fator Cdc (10mg/kg) quanto à morfina (5mg/kg) foram avaliados quanto ao seu envolvimento na via opióide através do uso conjunto com a naloxona – antagonista opióide clássico, usada intraperitonealmente na concentração de 5mg/kg, 20 minutos antes da administração do fator e da morfina (Figura 16).

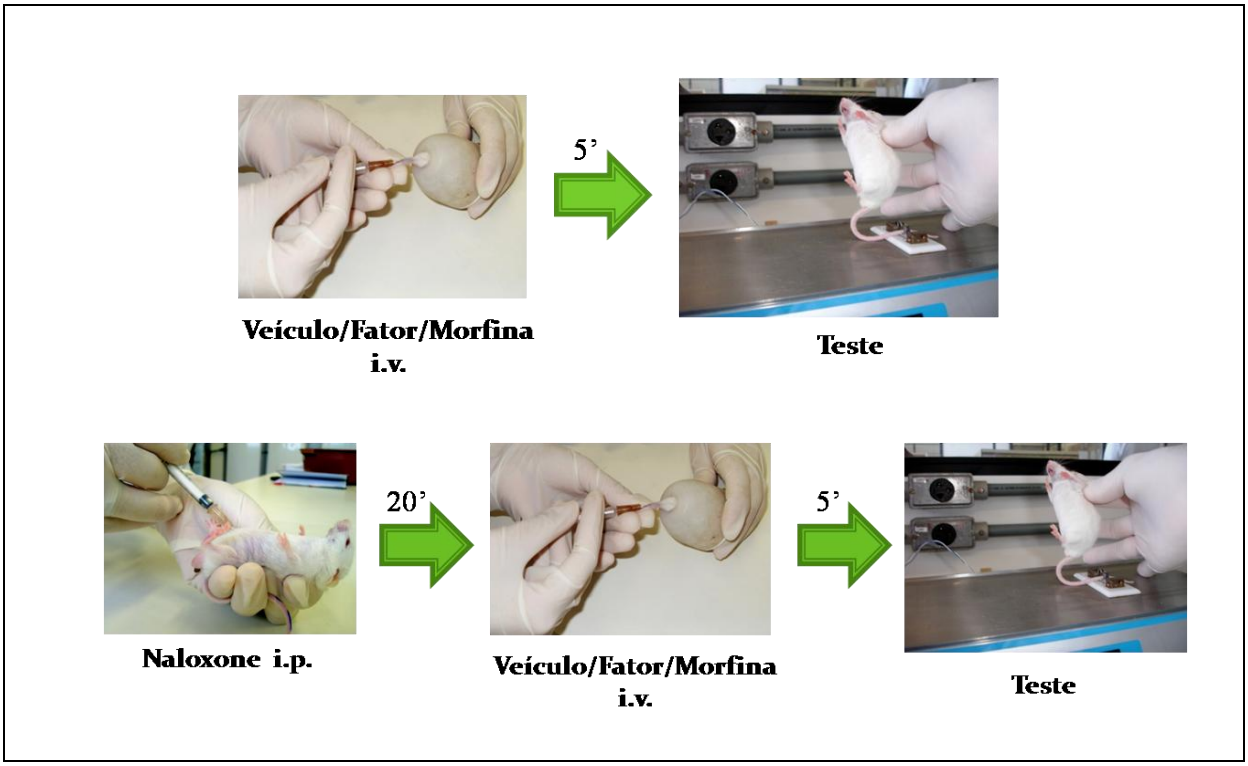


Figura 16 – Desenho experimental do teste *tail-flick*

4.5. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS (TOXICIDADE DO FATOR Cdc)

A análise comportamental dos animais ocorreu durante a realização de todos os testes experimentais, tendo como base a tabela de Loomis:

TABELA 01 – Exame físico e observação de animais em estudo de toxicidade – adaptada e traduzida de LOOMIS; HAYES, 1996

REAÇÕES ANALISADAS	
Atividade	**Resposta somática**
Redução ou aumento da atividade	Aumento ou redução do comportamento de alisar-se
Locomotora	
Saltos	Aumento ou redução do comportamento de coçar-se
Reações bizarras	Esfregando o nariz
Movimentos de circo	**Prostração**
Vaguear	Prostração

Movimentos para trás	Perda da consciência
Rodopiando	**Tremores**
Lambendo as paredes do compartimento	**Exoftalmia**
Movimentos de pá com o nariz	**Irritação nos olhos**
Olhos vidrados	Opacidade dos olhos
Movimentos circulares	Piscando excessivamente
Fonação	**Reflexo da córnea**
Aumento ou redução	Ausente ou diminuído
Fonação anormal	**Fotofobia**
Sensibilidade ao som	**Defecação**
Aumento ou redução	Aumento ou redução
Sensibilidade ao toque	Diarréia
Aumento ou redução	Com sangue
Interação social	**Micção**
Aumento ou redução do comportamento exploratório	Aumento ou redução
Aumento ou redução da frequência do *rearing*	Hematúria franca
Aumento da rapidez do *rearing*	**Apnéia**
Diminuição da altura do *rearing*	**Dispnéia**
Cauda anormal	**Respiração**
Cauda rígida ou flexível	Aumento ou redução da velocidade da respiração
Cauda de Straub	Aumento ou redução da profundidade da respiração
Comportamento agressivo	Respiração irregular
Aumento ou redução da agressividade a indivíduos da mesma espécie	**Corrimento nasal**
Aumento ou redução da agressividade ao experimentador	**Cianose**
Ataxia	**Piloereção**
Convulsões	**Morte**
Paralisia	

4.6. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE RESPOSTA DO FATOR EM RELAÇÃO À MORFINA (MOL A MOL) (Adaptado de ADED DA SILVA, 2009).

Para calcular a porcentagem de inibição do fator em relação à morfina, quando comparados mol a mol, foram realizados os cálculos a seguir.

Primeiramente é calculada a média dos resultados do fator e da morfina nos testes descritos anteriormente ($\bar{x}$ → média).

Em seguida é calculada a porcentagem de resposta do fator e da morfina em relação ao controle negativo:

Nos testes de contorções abdominais e da formalina:

$$\frac{\bar{x}\ \text{fator}}{\bar{x}\ \text{controle}} \times 100 = X\%$$ (porcentagem (p.) da resposta do fator em relação ao grupo controle)

$$\frac{\bar{x}\ \text{morfina}}{\bar{x}\ \text{controle}} \times 100 = Y\%$$ (p. da resposta do morfina em relação ao grupo controle)

Nos testes do *tail-flick* e da placa quente:

$$\frac{\bar{x}\ \text{fator}}{\bar{x}\ \text{controle}} \times 100 - 100 = X\%$$ (p. da resposta do fator em relação ao grupo controle)

$$\frac{\bar{x}\ \text{morfina}}{\bar{x}\ \text{controle}} \times 100 - 100 = Y\%$$ (p. da resposta da morfina em relação ao grupo controle)

Lembrar que o valor obtido não será o grau de porcentagem, mas sim o seu complemento.

Em seguida é calculada a diferença do peso molecular (P.M.) do fator em relação ao peso molecular da morfina:

$$\text{P.M. Fator} = \frac{550}{\text{P.M. Morfina}\ 285{,}3} = 1{,}9$$

Após a obtenção dos valores, inserimos os mesmos na seguinte fórmula:

$$\frac{X\%}{Y\%} \times 1{,}9$$

A porcentagem de resposta do fator em relação à morfina, quando comparados mol a mol, foi calculada em todos os testes realizados.

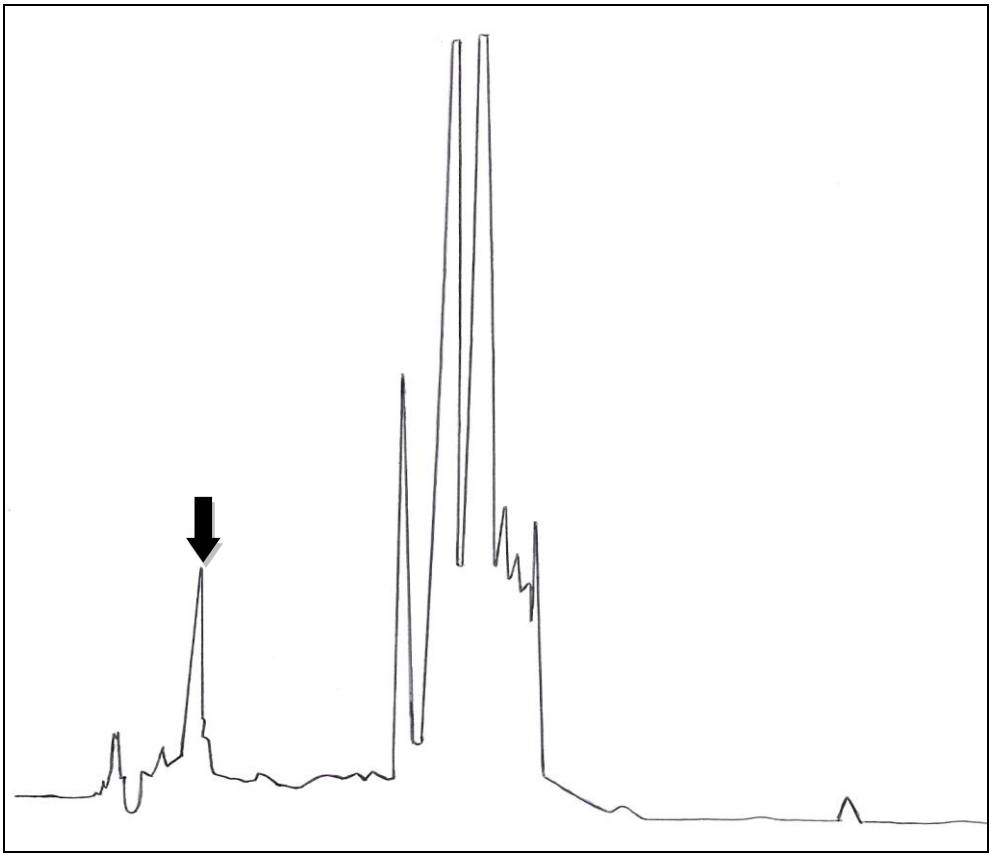
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos experimentalmente foram expressos como Médias e Erro Padrão da Média (E.P.M). As diferenças estatísticas foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (para comparações múltiplas). Foi utilizado o software Graph Pad Prism®, versão 5.0, Copyright©. O critério de significância para todos os casos foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. CROMATOGRAFIA DO VENENO BRUTO DA Cdc

No perfil cromatográfico do veneno bruto Cdc foram coletadas frações referentes aos picos cromatogáficos entre 16 e 93 minutos após o início da eluição (Figura 17). Estas frações, após a liofilização, foram utilizadas para realização do teste antinociceptivo de contorções abdominais induzidas por ácido acético para *screening* da atividade analgésica, onde foi selecionada a fração que apresentou melhor atividade antinociceptiva (fator Cdc). A seta indica o pico que apresenta o fator (Figura 17).



0 TEMPO (min) 110

Figura 17 - Cromatograma do veneno Cdc obtido por HPLC de fase reversa.

5.2. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

O fator Cdc, quando administrado nas doses de 1 mg/Kg (19,75 ± 0,32); 5 mg/Kg (9,9 ± 2,1) e 10mg/Kg (4,2 ± 0,85) por via i.v., inibiu significativamente o número de contorções abdominais em relação ao controle negativo (43,1 ± 2,51). A morfina foi administrada na dose de 5mg/Kg (0,84 ± 0,36) por via i.v. como controle positivo e inibiu também de forma significativa o número de contorções em relação ao controle negativo (Figura 18). O fator Cdc foi, aproximadamente, 174 % mais potente que a morfina, quando comparados mol a mol.

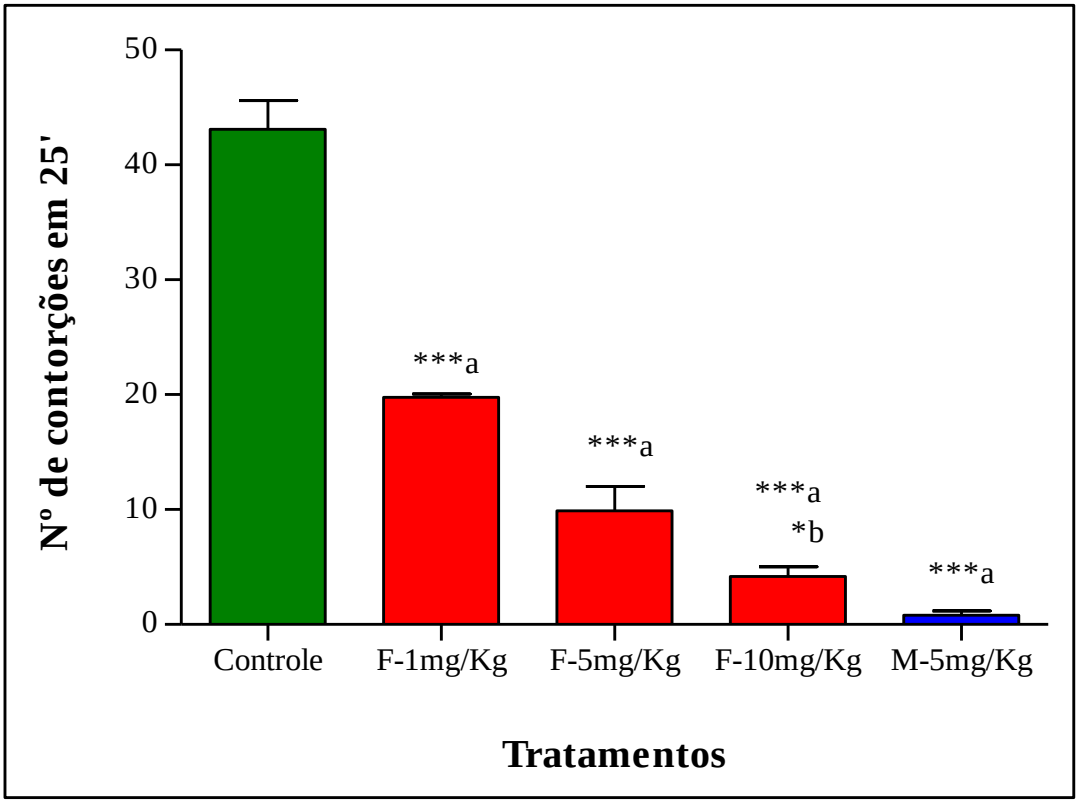


Figura 18 – Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O controle (veículo), o fator Cdc (F) (1; 5 e 10 mg/kg) e a morfina (M) (5mg/kg) foram administrados intravenosamente (i.v.) 5 min antes do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% intraperitoneal. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pela redução do número de contorções abdominais do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle e $^{*b}p<0,05$ em relação ao fator- 1mg/kg.

O naloxone, na dose de 5mg/Kg, foi administrado por via i.p. 20 minutos antes do fator 10mg/Kg (4,2 ± 0,85) e da morfina 5mg/Kg (0,84 ± 0,36), bloqueando significativamente os efeitos antinociceptivos de ambos (fator Cdc (23,9 ± 1,1); morfina (25,6 ± 1,3)) (Figura 19).

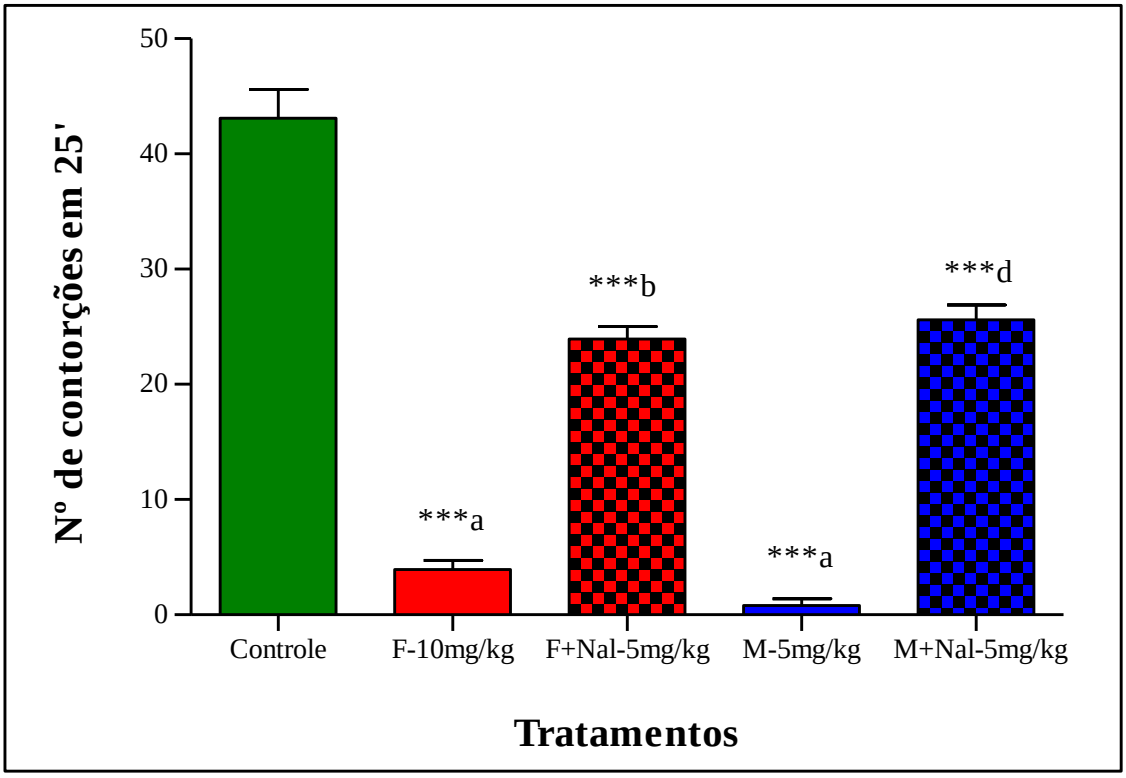


Figura 19 – Efeito do Naloxone na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O Naloxone foi administrado i.p. 20 min antes do controle (veículo), do fator Cdc (F) (10 mg/kg) e da morfina (M) (5mg/kg) que foram administrados i.v. 5 min antes do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% intraperitoneal. A atividade antinociceptiva do Fator Cdc foi avaliada pela redução do número de contorções abdominais do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle, $^{***b}p<0,001$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{***d}p<0,001$ em relação a morfina 5 mg/kg.

5.3. TESTE DA FORMALINA

5.3.1. FASE 1

O fator Cdc, quando administrado nas doses de 2,5 mg/Kg (95,75 ± 8,20); 5 mg/Kg (68,33 ± 3,45) e 10 mg/Kg (35,5 ± 7,1), por via i.v., inibiu de forma significativa, na fase 1, o tempo de lambidas e/ou leves mordidas na pata injetada em relação ao controle negativo (152,9 ± 11,22). A morfina foi administrada na dose de 5mg/Kg (11,67 ± 5,54) por via i.v. como controle positivo, diminuindo também de forma significativa o tempo de reação em relação ao controle negativo (Figura 20). O fator Cdc, quando comparado mol a mol com a morfina, foi 157% mais potente.

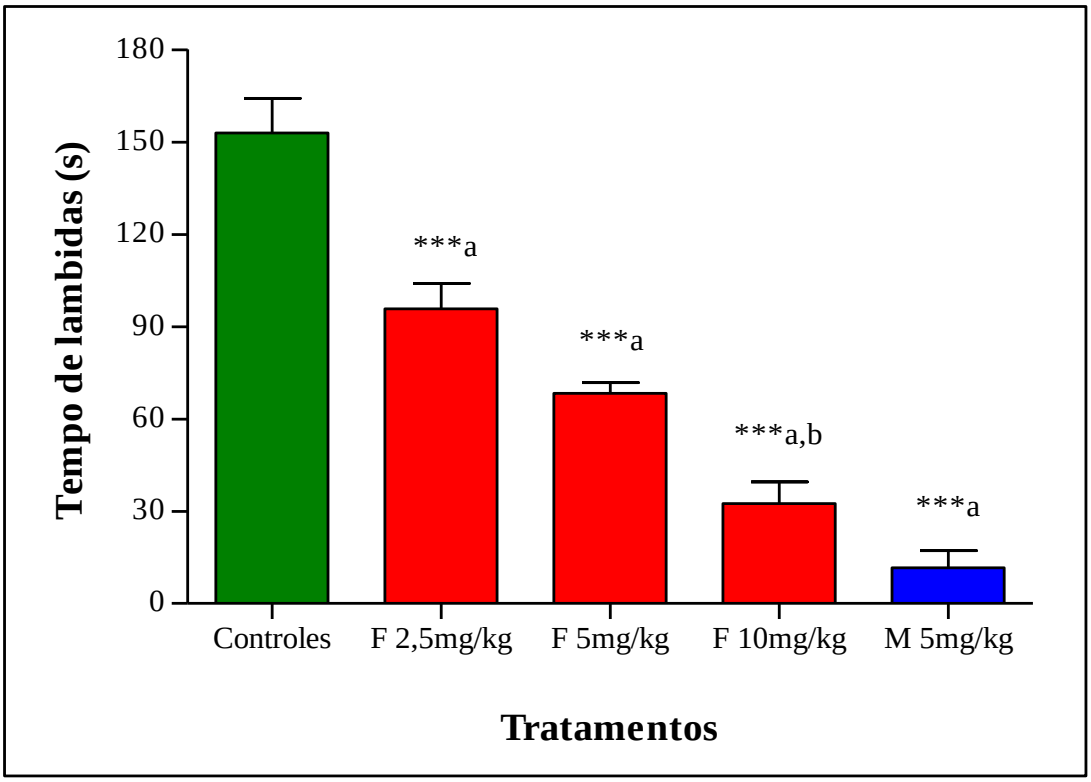


Figura 20 – Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 1. O controle (veículo), o fator Cdc (F) (2,5; 5 e 10 mg/kg) e a morfina (M) (5mg/kg) foram administrados i.v. 5 min antes do teste da formalina subplantar 4%. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pela redução do tempo de lambidas, sacudidas e leves mordidas na pata traseira esquerda do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle e $^{***b}p<0,001$ em relação ao fator 2,5 mg/kg.

O naloxone, na dose de 5mg/Kg, foi administrado por via i.p. 20 minutos antes do fator Cdc 10mg/Kg (35,5 ± 7,1) e da morfina 5mg/Kg (11,67 ± 5,54), bloqueando significativamente os efeitos antinociceptivos de ambos (fator Cdc (132,6 ± 6,6); morfina (102,0 ± 10,39)) (Figura 21).

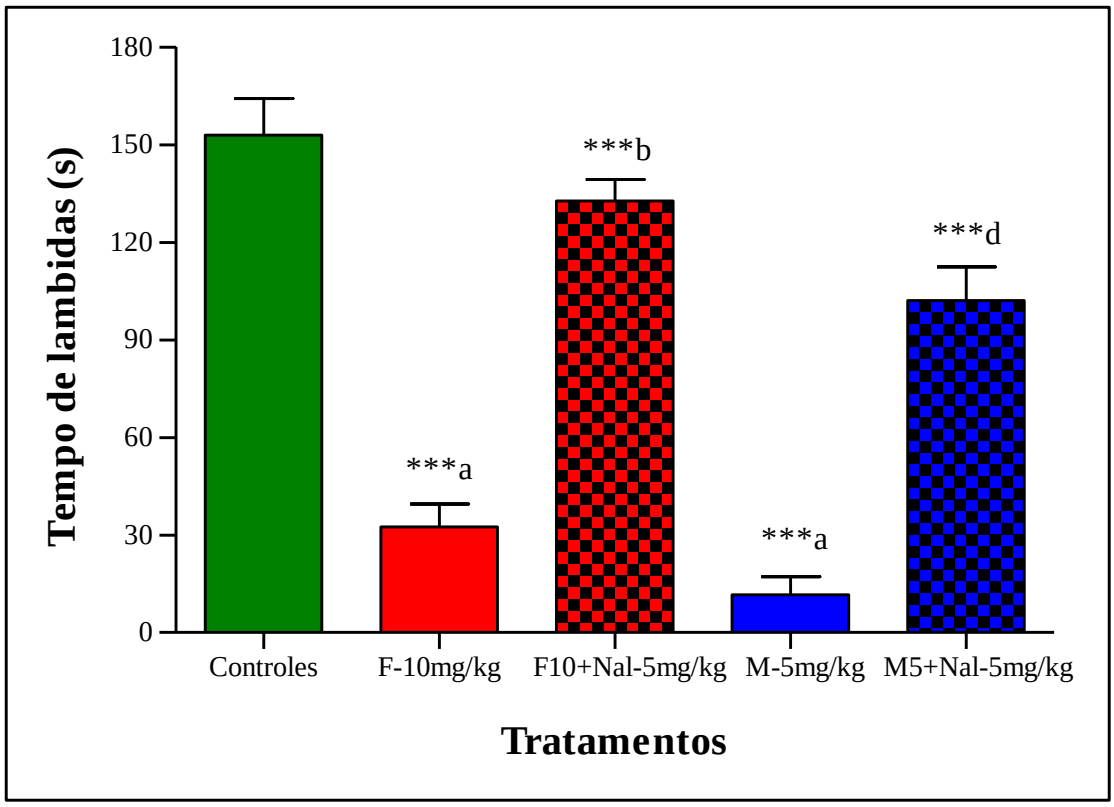


Figura 21 – Efeito do Naloxone na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 1. O Naloxone foi administrado i.p. 20 min antes do controle (veículo), do fator Cdc (F) (10 mg/kg) e da morfina (M) (5mg/kg), que foram administrados i.v. 5 min antes do teste da formalina subplantar 4%. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pela redução do tempo de lambidas, sacudidas e leves mordidas na pata traseira esquerda do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle , $^{***b}p<0,001$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{***d}p<0,001$ em relação a morfina 5 mg/kg.

5.3.2. FASE 2

O fator Cdc, quando administrado nas doses de 1 mg/Kg (116,0 ± 6,14); 5 mg/Kg (47,25 ± 2,9) e 10 mg/Kg (20,67 ± 6,2), por via i.v., inibiu de forma significativa, na fase 2, o tempo de lambidas e/ou leves mordidas na pata injetada em relação ao controle negativo (175,7 ± 12,51). A morfina foi administrada na dose de 5mg/Kg (2,17 ± 1,37), por via i.v., como controle positivo, diminuindo também de forma significativa o tempo de reação em relação ao controle negativo (Figura 22). O fator Cdc foi, aproximadamente, 170% mais potente que a morfina, quando comparados mol a mol.

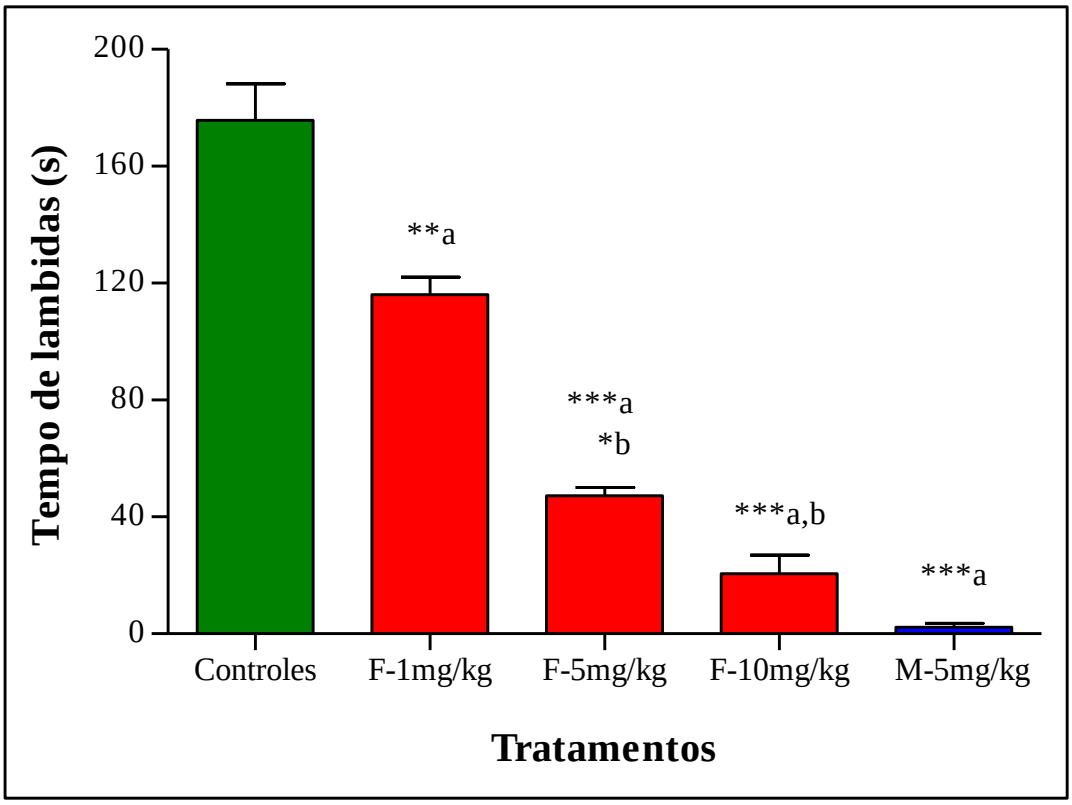


Figura 22 – Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 2. O controle (veículo), o fator Cdc (F) (1; 5 e 10 mg/kg) e a morfina (M) (5mg/kg) foram administrados i.v. 5 min antes do teste da formalina subplantar 4%. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pela redução do tempo de lambidas, sacudidas e leves mordidas na pata traseira esquerda do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle, $^{**a}p<0,01$ em relação ao controle, $^{***b}p<0,001$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{*b}p<0,05$ em relação ao fator 1 mg/kg.

O naloxone, na dose de 5mg/Kg, foi administrado por via i.p. 20 minutos antes do fator Cdc 10mg/Kg (20,67 ± 6,2) e da morfina 5mg/Kg (2,17 ± 1,37), bloqueando significativamente os efeitos antinociceptivos de ambos (fator Cdc (91,33 ± 5,16); morfina (83,5 ± 6,34)) (Figura 23).

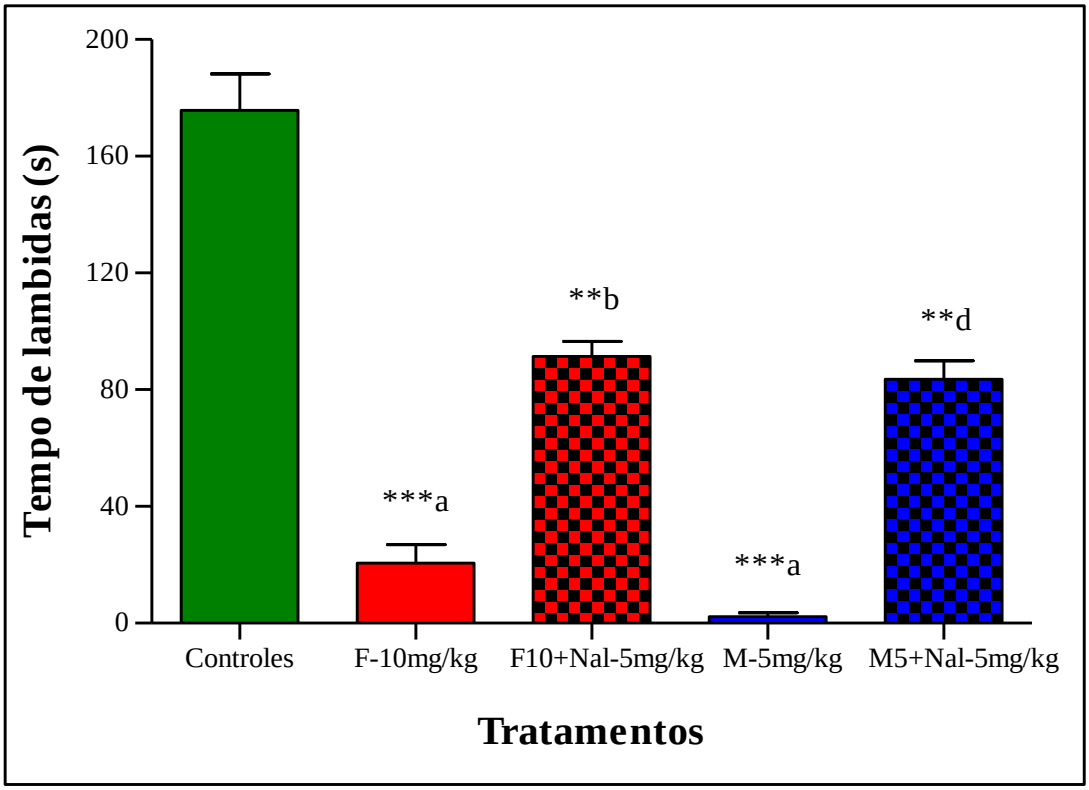


Figura 23 – Efeito do Naloxone na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da formalina – fase 2. O Naloxone foi administrado i.p. 20 min antes do controle (veículo), do fator Cdc (F) (10 mg/kg) e da morfina (M) (5mg/kg), que foram administrados i.v. 5 min antes do teste da formalina subplantar 4%. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pela redução do tempo de lambidas, sacudidas e leves mordidas na pata traseira esquerda do animal quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle , $^{**b}p<0,01$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{**d}p<0,01$ em relação a morfina 5 mg/kg.

5.4. TESTE DA PLACA QUENTE

O fator Cdc, quando administrado nas doses de 2,5 mg/Kg (7,55 ± 0,64); 5 mg/Kg (8,08 ± 0,9) e 10 mg/Kg (9,6 ± 0,78), por via i.v., aumentou significantemente o tempo de reação à dor em relação ao controle negativo (4,76 ± 0,26). A morfina foi administrada na dose de 5mg/Kg (13,23 ± 1,13), por via i.v., como controle positivo, aumentando também de forma significativa o tempo de reação à dor em relação ao controle negativo (Figura 24). Quando comparado, mol a mol, com a morfina, o fator foi aproximadamente 108% mais potente.

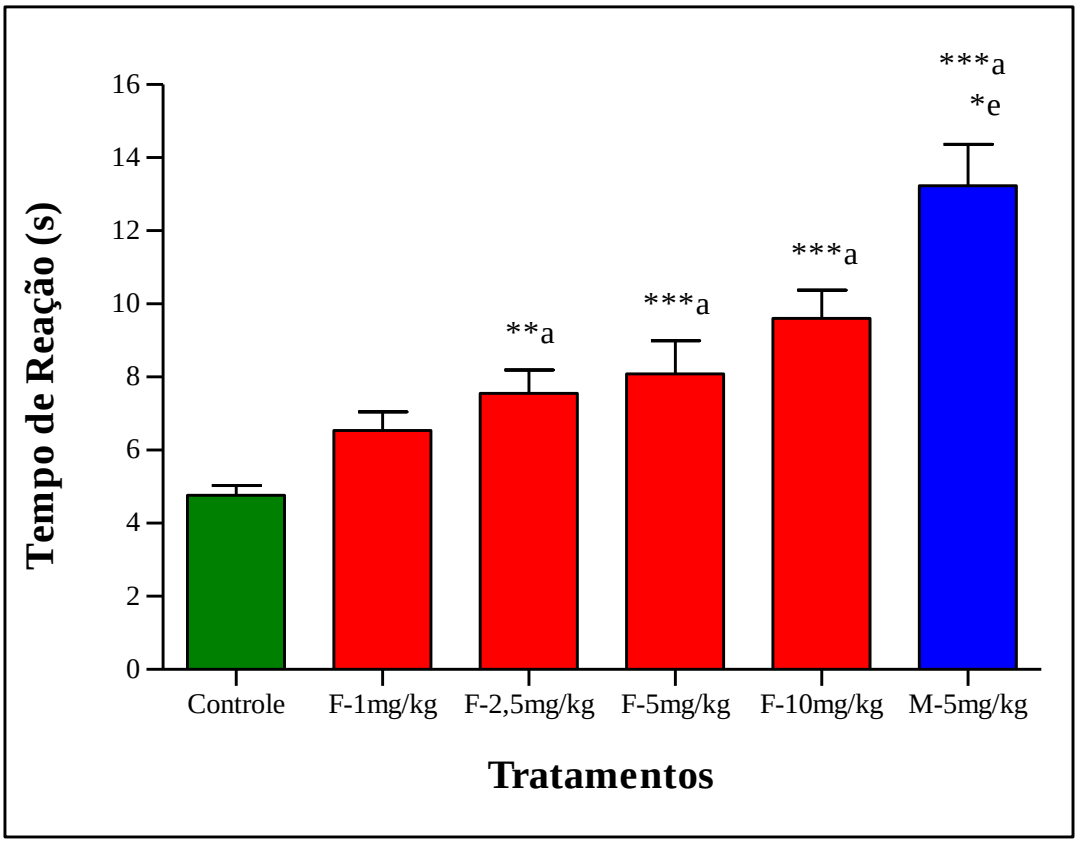


Figura 24 – Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da placa quente. O controle (veículo), o fator Cdc (F) (1; 2,5; 5 e 10 mg/kg) e a morfina (M) (5mg/kg) foram administrados intravenosamente (i.v.) 5 min antes do teste da placa quente. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pelo aumento do tempo de reação do animal (sacudida, lambida e/ou pulo) na placa quente quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle, $^{**a}p<0,01$ em relação ao controle e $^{*e}p<0,05$ em relação ao fator 10mg/kg.

O naloxone, na dose de 5mg/Kg, foi administrado por via i.p. 20 minutos antes do fator Cdc 10mg/Kg (9,6 ± 0,78) e da morfina 5mg/Kg (13,23 ± 1,13), bloqueando significativamente os efeitos antinociceptivos de ambos (fator Cdc (5,33 ± 0,43); morfina (6,18 ± 0,57)) (Figura 25).

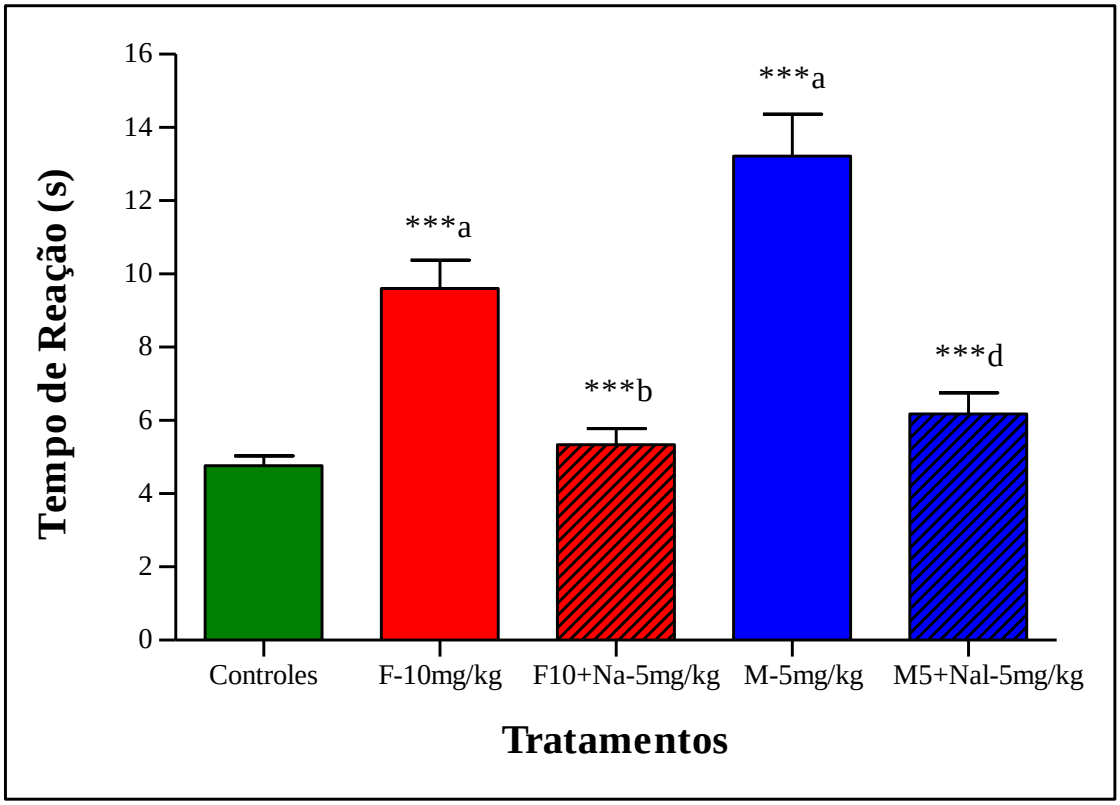


Figura 25 – Efeito do Naloxone na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da placa quente. O Naloxone foi administrado i.p. 20 min antes do controle (veículo), do fator Cdc (F) (10 mg/kg) e da morfina (M) (5mg/kg) que foram administrados i.v. 5 min antes do teste da placa quente. A atividade antinociceptiva do Fator (F) foi avaliada pelo aumento do tempo de reação do animal (sacudida, lambida e/ou pulo) na placa quente quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle, $^{***b}p<0,001$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{***d}p<0,001$ em relação a morfina 5 mg/kg.

5.5. TESTE DA RETIRADA DA CAUDA (*Tail Flick*): DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA MEDULAR

O fator Cdc, nas doses de 1 mg/Kg (67,28 ± 1,72); 2,5 mg/Kg (66,5 ± 2,26); 5 mg/Kg (66,26 ± 1,49) e 10 mg/Kg (66,05 ± 1,81), por via i.v., aumentou significantemente o tempo de reação reflexa de retirada da cauda em relação ao controle negativo (51,15 ± 0,77). A morfina foi administrada na dose de 5mg/Kg (70,0), por via i.v., como controle positivo, aumentando também de forma significativa o tempo de reação reflexa de retirada da cauda em relação ao controle negativo (Figura 26). Quando comparado, mol a mol, com a morfina, o fator foi, aproximadamente, 153% mais potente.

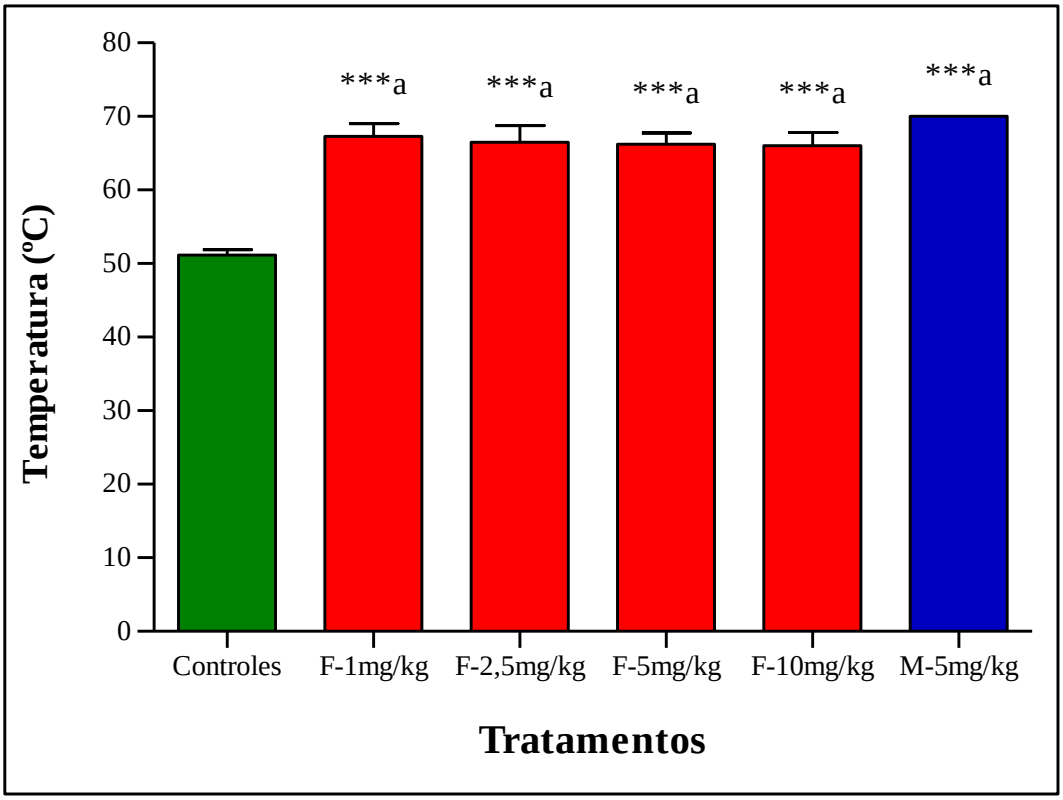


Figura 26 – Atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da retirada da cauda (*tail-flick*). O controle (veículo), o fator Cdc (F) (1; 2,5; 5 e 10 mg/kg) e a morfina (M) (5mg/kg) foram administrados intravenosamente (i.v.) 5 min antes do teste *tail-flick*. A atividade antinociceptiva do fator Cdc foi avaliada pelo aumento do tempo de reação do animal (reflexo de retirada da cauda) no filamento aquecido do aparelho quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle.

O naloxone, na dose de 5mg/Kg, foi administrado por via i.p. 20 minutos antes do fator Cdc 10mg/Kg (66,05 ± 1,81) e da morfina 5mg/Kg (70,0), bloqueando significativamente os efeitos antinociceptivos de ambos (fator Cdc (55,9 ± 2,5); morfina (56,49 ± 2,84)) (Figura 27).

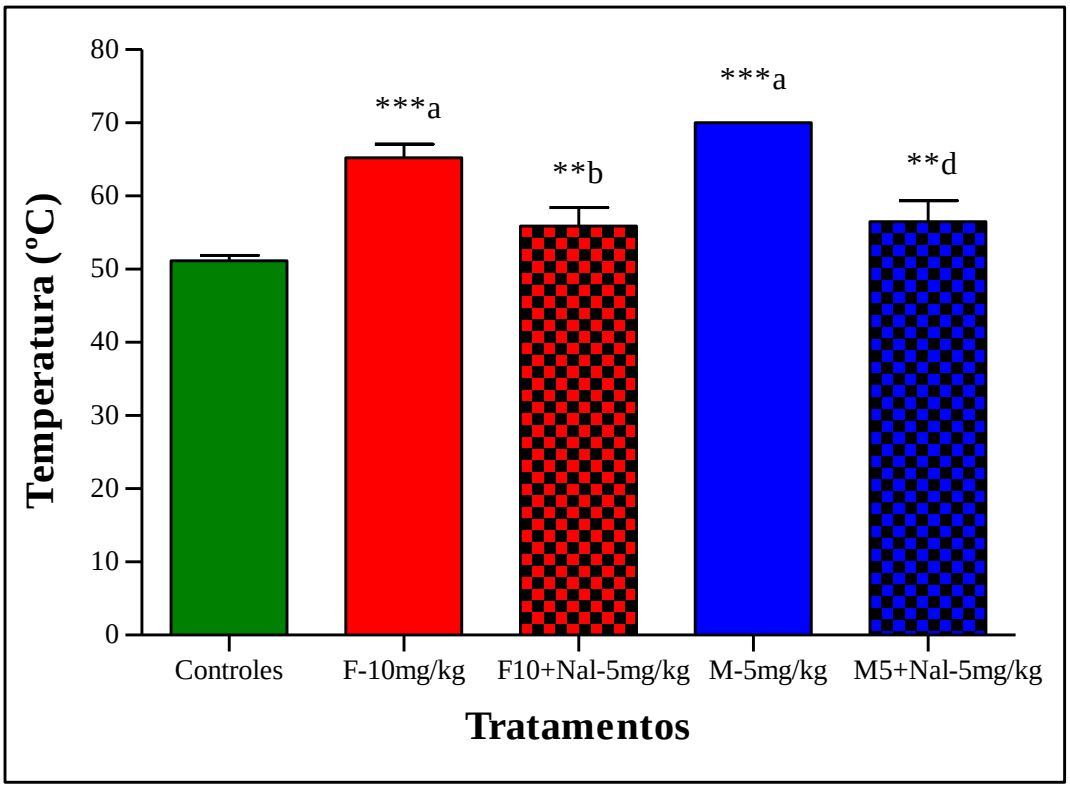


Figura 27 – Efeito do Naloxone na atividade antinociceptiva do Fator Cdc no teste da retirada da cauda (*tail-flick*). O Naloxone foi administrado i.p. 20 min antes do controle (veículo), do fator Cdc (F) (10 mg/kg) e da morfina (M) (5mg/kg) que foram administrados i.v. 5 min antes do teste *tail-flick*. A atividade antinociceptiva do Fator (F) foi avaliada pelo aumento do tempo de reação do animal (reflexo de retirada da cauda) no filamento aquecido do aparelho quando comparado com o controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA e Tukey como *post test*. Média ± E.P.M. (n= 6 para cada grupo). $^{***a}p<0,001$ em relação ao controle, $^{**b}p<0,01$ em relação ao fator 10 mg/kg e $^{**d}p<0,01$ em relação a morfina 5 mg/kg.

5.6. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS (TOXICIDADE DO FATOR Cdc)

Os resultados da análise comportamental dos animais, após a administração do fator Cdc na maior dose (10mg/Kg), estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 02). As atividades apresentadas foram alteradas apenas nos oito primeiros minutos após a administração do fator Cdc, desaparecendo após esse tempo.

(-) : Corresponde as reações que não foram alteradas pelo fator Cdc.

TABELA 02 – Exame físico e observação de animais em estudo de toxicidade – Resultados do Fator Cdc

REAÇÕES ANALISADAS	FATOR Cdc	REAÇÕES ANALISADAS	FATOR Cdc
Atividade Locomotora		**Resposta somática**	
Redução ou aumento	Leve redução	Aumento ou redução do comportamento de alisar-se	Redução
Saltos	-	Aumento ou redução do comportamento de coçar-se	Redução
Reações bizarras		Esfregando o nariz	-
Movimentos de circo	-	**Prostração**	
Vaguear	-	Prostração	-
Movimentos para trás	-	Perda da consciência	-
Rodopiando	-	**Tremores**	-
Lambendo as paredes do compartimento	-	**Exoftalmia**	-
Movimentos de pá com o nariz	-	**Irritação nos olhos**	
Olhos vidrados	-	Opacidade dos olhos	-
Movimentos circulares	-	Piscando excessivamente	-
Fonação		**Reflexo da córnea**	
Aumento ou redução	-	Ausente ou diminuído	-
Fonação anormal	-	**Fotofobia**	-
Sensibilidade ao som			
Aumento ou redução	-	**Defecação**	
Sensibilidade ao toque		Aumento ou redução	-
Aumento ou diminuição	-	Diarréia	-
Interação social		Com sangue	-
Aumento ou redução do	Redução	**Micção**	

comportamento exploratório			
Aumento ou redução do *rearing*	Redução	Aumento ou redução	-
Aumento da rapidez do *rearing*	-	Hematúria franca	-
Redução da altura do *rearing*	Redução	**Apnéia**	-
Cauda anormal		**Dispnéia**	-
Cauda rígida ou flexível	Rígida	**Respiração**	
Sinal de Straub	-	Aumento ou diminuição da velocidade da respiração	Pequeno Aumento
Comportamento agressivo		Aumento ou diminuição da profundidade da respiração	-
Aumento ou redução da agressividade a indivíduos da mesma espécie	-	Respiração irregular	-
Aumento ou redução da agressividade ao experimentador	-	**Corrimento nasal**	-
Ataxia	-	**Cianose**	-
Convulsões	-	**Piloereção**	-
Paralisia	-	**Morte**	-

6. DISCUSSÃO

Há muitas décadas o veneno das subespécies das serpentes *C.d.* tem sido estudado quanto a sua atividade analgésica nas dores agudas e crônicas. Esses estudos foram iniciados por Vital-Brazil, em 1934, que mostrou que o veneno da serpente *C.d. terrrificus* possui ação analgésica. Essa ação foi, anos mais tarde, confirmada por diversos autores e os estudos estão sendo até hoje aprofundados (GIORGI *et al*., 1993; MANCIN *et al*., 1998; PICOLO *et al*., 1998, 2000, 2003; BRIGATTE, 2001; MOREIRA, 2003; PICOLO; CURY, 2004; LOPES, 2005; ZHANG *et al*, 2006; GOMES 2007; NOGUEIRA-NETO *et al*., 2008; KONNO *et al*., 2008; GUTIERREZ *et al*., 2008).

Em continuidade aos estudos acima, mostramos pela primeira vez na literatura a purificação total de um fator presente no veneno da subespécie *C.d. colillineatus* em um único passo cromatográfico e em escala preparativa, permitindo obter quantidades suficientes deste composto para a realização dos diversos ensaios para estudo de dores agudas *in vivo*. Sua estrutura química foi parcialmente determinada através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), apresentando peso molecular de 550 daltons, porém ainda estão sendo realizados estudos complementares para a elucidação da estrutura total deste fator Cdc.

O fator Cdc apresentou ação analgésica periférica no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, sendo, aproximadamente, 174% mais potente que a morfina quando comparados mol a mol. Além disto, demonstramos a participação da via opióide na sua atividade, visto que seu efeito foi antagonizado pela naloxona. De maneira semelhante, Moreira (2003) demonstrou através do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que, tanto o veneno da *C.d. collilineatus* crotamina positivo quanto o crotamina negativo, possuem atividade antinociceptiva, indicando a existência de outras substâncias, além da crotamina, envolvidas na analgesia periférica, mas não excluindo o papel da crotamina. Confirmando este estudo, em 2005, Lopes isolou uma fração do veneno da *C.d. collilineatus* com ação analgésica periférica, observando também que esta ação era mediada pelo sistema opióide, visto que foi bloqueada pelo uso de naloxona. Complementando, Gomes (2007) aprofundou o estudo sobre o mecanismo de ação da fração isolada do veneno da *C.d. collilineatus* crotamina negativa e demonstrou que ela atua predominantemente em receptores opióides periféricos do tipo *k*.

Estudos realizados com o veneno de outra subespécie, a *C.d. terrrificus*, confirmaram o proposto por Vital-Brazil (1934), mostrando que peptídios de baixo peso molecular, isolados do seu veneno, apresentaram atividade analgésica periférica, imitando as endorfinas endógenas, que foi evidenciada pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Giorgi *et al*, 1993), sendo esta atividade antagonizada pela naloxona, envolvendo, portanto, o sistema opióide (GIORGI *et al*., 1993; PICOLO *et al*., 2000; BRIGATTE *et al*., 2001; PICOLO; CURY, 2004).

Curiosamente, Mancin *et al* (1998) sugeriram que a crotamina seria uma fração de alto peso molecular do veneno da *C.d. terrificus* responsável pela maior ação antinociceptiva, antagonizada pela naloxona, já que a mesma constitui cerca de 22% do veneno total. Entretanto esses estudos não foram confirmados até a presente data por nenhum grupo de pesquisa.

Já em 2006, Zhang *et al*., mostraram que a neurotoxina isolada do veneno da *C.d. terrificus*, a crotoxina, também apresentou atividade analgésica periférica, evidenciada pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, mas esse efeito parece não envolver a via opióide, pois não foi antagonizado pela naloxona.

Para avaliar a atividade analgésica de origem neurogênica e inflamatória do fator foi realizado o teste da formalina. Em ambas as fases do teste o fator diminuiu significativamente o tempo de lambidas da pata injuriada em todas as doses testadas, corroborando com os resultados obtidos no teste de contorções. O fator foi 157% e 170% mais potente que a morfina nas fases 1e 2, respectivamente. Ambos os efeitos foram antagonizados pela naloxona, confirmando a participação da via opióide na atividade do fator. Resultados semelhantes foram obtidos por Nunes *et al* (2007, 2010), que demonstrou que o veneno da subespécie *C.d. terrificus* possui potente e duradoura atividade antiinflamatória no modelo de inflamação induzido por carragenina em camundongo, e que a crotoxina é a responsável por esta atividade.

A atividade analgésica central do fator Cdc também foi evidenciada através do teste da placa quente, que mostra uma ação central-cerebral, e do teste *tail-flick*, que mostra uma ação central-medular. No teste da placa quente o fator Cdc apresentou um efeito analgésico central-cerebral, que foi evidenciado pelo aumento do tempo de permanência do animal sobre a placa quente, ou seja, aumento do tempo de reação do animal a um estímulo

térmico. Também podemos mostrar que o fator Cdc, quando comparado mol a mol com a morfina, foi aproximadamente 108% mais potente que esta no teste da placa quente. A naloxona bloqueou o efeito do fator Cdc, evidenciando a participação da via opióide no seu mecanismo de ação central.

Em trabalhos anteriores podemos observar que o veneno crotamina positivo também possui ação analgésica central-cerebral, que foi evidenciada através do teste da placa quente (MOREIRA, 2003). Diferentemente, o veneno crotamina negativo, não possui ação central-cerebral (LOPES, 2005; GOMES, 2007), levando-nos a atribuir a ação central deste veneno a crotamina. A crotamina extraída do veneno de outra subespécie, a *C. d. terrificus*, também apresentou ação analgésica central-cerebral, sendo esta tempo-dose-dependente (MANCIN *et al*., 1998). Giorgi *et al.* (1993), mostraram que o veneno bruto da *C. d. terrificus* também apresentou atividade analgésica central-cerebral, que foi evidenciada através do teste da placa quente e esta ação foi confirmada, anos mais tarde, por Picolo *et al.* (1998).

A participação da via opióide na atividade antinociceptiva central do veneno da outra subespécie, *C. d. terrificus*, foi evidenciada também pelo uso da naloxona (GIORGI *et* al., 1993). A naloxona, de maneira semelhante, antagonizou o efeito da crotamina extraída do veneno da *C. d. terrificus*, indicando a participação da via opióide no mecanismo de ação desta (MANCIN *et al.*, 1998). Por outro lado, Zhang *et al*. (2006), mostraram que a crotoxina isolada do veneno da *C.d. terrificus*, apesar de apresentar atividade analgésica central, esse efeito parece não envolver a via opióide, pois não foi antagonizado pela naloxona.

Em 2008, Konno *et al* descobriram um novo peptídio, isolado do veneno da subespécie *C.d. terrificus*, que possui uma potente e duradoura atividade analgésica na hiperalgesia induzida pela administração de carragenina ou prostaglandina, bem como na dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático em ratos (GUTIERREZ *et al.* 2008). Também foi mostrado que a crotalfina possui atividade central cerebral (avaliada pelo teste da placa quente), mas não possui atividade central medular, pois não alterou o reflexo de retirada da cauda do animal, ou seja, não aumentou o tempo de reação do animal no teste do *tail-flick* (KONNO *et al*., 2008). Foi evidenciado, que a atividade antinociceptiva da crotalfina é mediada pela ativação de receptores opióides (GUTIERREZ *et al.*, 2008; KONNO *et al*., 2008) e que estes são dos tipos κ e δ no modelo de hiperalgesia induzida por prostaglandina e carragenina (KONNO *et al.*, 2008).

No teste do *tail-flick*, o fator Cdc alterou significativamente a resposta reflexa do animal, ou seja, aumentou a temperatura em que o animal reagiu ao estímulo térmico em todas as doses testadas, apresentando um efeito tudo ou nada, com alguns poucos animais respondendo rapidamente ao estímulo (iguais ao controle) e a maioria sem resposta (*cut off*). Este mesmo efeito foi observado por D'Amour; Smith (1941) na atividade analgésica da morfina no teste *tail-flick* e, da mesma maneira que o fator, ocorreu uma resposta tudo ou nada, independente da dose. A razão deste fenômeno ainda não foi elucidada.

Diferente dos dados encontrados no nosso estudo, Moreira (2003) mostrou que tanto o veneno de *C.d. colillineatus* crotamina positivo quanto o crotamina negativo não possuem atividade antinociceptiva medular, pois não alteraram o reflexo de retirada da cauda dos animais. Como o fator Cdc possivelmente é apenas um dos componentes antinociceptivos do veneno, ele poderia estar em menor concentração que os demais, podendo explicar a ausência de efeito medular de frações não purificadas.

Nos estudos com o veneno de outra subespécie, *C. d. terrificus*, foi demonstrado que este também não possui ação medular, pois não alterou a resposta reflexa dos animais (PICOLO *et al*., 1998), assim como a crotalfina, um peptídio com atividade analgésica isolado do veneno da *C. d. terrificus* (KONNO *et al*., 2008).

Podemos observar também que o fator Cdc, quando comparado mol a mol com a morfina, é aproximadamente 153% mais potente que esta no teste do *tail-flick*. A naloxona bloqueou o efeito do fator Cdc, confirmando a participação da via opióide no seu mecanismo de ação central.

O fator Cdc apresentou poucas alterações comportamentais, sendo estas rápidas e leves, avaliadas pela tabela de Loomis. Esses resultados nos levam a crer na baixa toxicidade aguda *in vivo* do fator Cdc, apesar de agir no SNC.

As drogas que atuam no SNC estão entre as primeiras que foram descobertas e ainda estão entre o grupo de compostos farmacológicos mais amplamente utilizados (KATZUNG, 2003). Há mais de cem anos a morfina é conhecida por sua eficácia no alívio da dor intensa, e ainda hoje é muito utilizada na clínica para o tratamento da maioria das dores agudas e crônicas, sendo menos eficaz na dor neuropática. Além de ser antinociceptiva, a morfina também diminui o componente emocional da dor, refletindo sua ação supra-espinhal provavelmente ao nível do sistema límbico. Os efeitos mais importantes da morfina ocorrem

no SNC e no trato gastrintestinal, porém já foram descritos vários efeitos menos significantes em outros sistemas (RANG *et al*, 2008)

Entretanto, a morfina possui muitos efeitos colaterais sendo os principais a depressão respiratória e a constipação. Outros efeitos farmacológicos da morfina são: euforia, sedação, náuseas e vômitos, miose, constrição brônquica, hipotensão, espasmos dos ureteres, da bexiga e do útero. A morfina também leva a tolerância e dependência física. A tolerância se estende à maioria dos seus efeitos farmacológicos, incluindo analgesia, euforia e depressão respiratória. A dependência física é caracterizada pela síndrome de abstinência, que pode durar dias ou semanas, com sintomas de agitação, coriza, diarréia, tremores e piloereção (RANG *et al*, 2008).

Esse conjunto de efeitos colaterais adversos da morfina torna complicado o seu uso clínico, evidenciando a necessidade da descoberta de novos analgésicos que atuem nos diversos tipos de dores mais especificamente e com menos efeitos colaterais.

A partir da elucidação total da estrutura química do fator, poderemos dispor de um novo modelo de substância opióide que poderá se constituir em importante ferramenta para a descoberta de novos fármacos que possam atuar em diversos tipos de dores e que possuam menos efeitos colaterais.

7. CONCLUSÕES

1. Um novo fator antinociceptivo foi totalmente purificado do veneno da *Crotalus durissus colillineatus*;

2. O fator apresentou atividades antinociceptivas periférica e central (medular e cerebral), demonstradas pelos resultados obtidos nos testes de contorções abdominais, *tail-flick* e placa quente;

3. O fator apresentou atividades antinociceptivas neurogênica e inflamatória, demonstradas pelos resultados obtidos nas fases 1 e 2 do teste da formalina, respectivamente;

4. O bloqueio dos efeitos antinociceptivos do fator pela naloxona, em todos os testes utilizados, sugere um envolvimento do sistema opióide em seu mecanismo de ação;

5. Quando comparado com a morfina, o fator foi, mol a mol, mais potente em todos os testes realizados.

6. A elucidação total da estrutura química do fator abrirá perspectivas para o desenvolvimento de um novo modelo de substância opióide que, no futuro, poderá se constituir em importante ferramenta para a descoberta de novos fármacos que possam atuar em diversos tipos de dores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADED DA SILVA, P.T. **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator extraído da secreção cutânea de *Rhinella Jimi* (Amphibia – Anura)**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2009.

AGUGGIA, M. **Neurophysiology of pain**. Neurological Sciences, 2003. v. 24, n. 2, p. S57 S60.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS, V.R.; KRUGGEL, W.G. **A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin**. Arch. Biochem. Biophys, 1986. v. 249, p. 296–300.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review**. Brain Research, 2004. v.1000, n.1-2, p.40-56.

AMARAL, C.F.C; RESENDE, N. A.; PEDORSA, T. M. G.; DA SILVA, O. A.; PEDROSO, E. R. P. **Afibrinogenemia secundária e acidente ofídico crotálico (*Cotalus durissis terrificus)*.** Ver. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**,** 1998. v. 30, p. 288-292.

AMORA, D.N.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; MAGALHÃES, M.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MENEZES, D.B.; MONTEIRO, H.S.A. **Effects of Crotalus durissus collilineatus venom in the isolated rat kidney.** Toxicon, 2006. v. 47, p. 260-264.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Editora de Publicações Científicas, Rio de Janeiro, 1995. p. 411.

BARRAVIEIRA, B. Systemic **inflammatory response syndrome in envenoming.** Toxicon, 1997. v. 35, n. 1, p. 13-14.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** Química nova, 2009. v.32, no.3, p. 679-688.

BASBAUM, A.I., JESSELL, T. The **perception of pain. In Principles of Neuroscience**. E.R. Kandel, J. Schwartz, and T. Jessell, eds. (New York: Appleton and Lange), 2000. p. 472–491.

BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. **Cellular and Molecular Mechanisms of Pain.** Cell, 2009. v. 139, p. 267-284.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BENNETT, D. **Central mechanisms** In: HOLDCROFT, A.; JAGGAR, S. Core topics in pain. Cambridge University Press, New York, 2005. p. 17-21.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. **Peripheral and spinal mechanisms of nociception**. Physiol. Rev., 1987. v. 67, p. 67-186.

BESSON, J. M. **The neurobiology of pain.** The Lancet, 1999. v.353, n.9164, p.1610–15.

BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. **Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum**. Br J Pharmacol., 1981. v.73(2), p.325-32.

BEYZAROV, E.P.; RAWLS, S.M.; RAFFA, R.B. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.

BODNAR, R.J. **Endogenous opiates and behavior: 2007**. Peptides, 2008. v. 29, p. 2292–2375.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R.S.; FONSECA, F.P.P.; MENALDO, D.L.; FERREIRA, F.B.; HENRIQUE-SILVA, R.; SOARES, A.M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V.M.; OTAVIANO, A.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. **Crotalus durissus collilineatus venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile.** Biochimie, 2009. v. 91, p. 586-595.

BRIGATTE, P. **Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms.** Toxicon, 2001. v. 39, p. 1399-1410.

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

CARDOSO, J.L.C.; BRANDO, R.B. **Acidentes por animais peçonhentos.** 1a. Ed. Santos, São Paulo, 1982.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. **Acute pain.** The Lancet, 1999. v. 353, p. 2051-2058.

CARVALHO, W.A.; VIANNA, W. **Analgésicos Opióides**. In: SILVA, P. Farmacologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 441-459.

CARVALHO, K. M.; NOGUEIRA, R. M. D.; AZEVEDO, M. C. P.; UCHOA, D. E.; SILVEIRA, E. R. **Unambiguous 1 H and 13C NMR assignmente for marinobufagin, a potent epiteptogenic bufodienolide of the skin venom of *Bufo paracnemis* native from Ceará, Brazil.** Anais do ANAUREMN, VII Encontro de usuários, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1999.

CESARE, P.; McNAUGHTON, P. **Peripheral pain mechanisms**. Curr. Opin. Neurobiol., 1997. v.7, p.493-499.

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

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

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. **Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain.** Journal of Pain and Symptom Management, 2003. v. 25, n. 5S, p. S4 - S11.

CLAYTON, B.D., STOCK, Y.N. **Farmacologia na prática de enfermagem**. Ed. 13°, 2006. p. 311-334.

COLLIER, H. O. J., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C., SCHNEIDER, C. **The abdominal constriction responde and its suppression by analgesic drugs in the mouse.** Br. J. Pharmac. Chemother., 1968. v. 32, p. 295-3 10.

CORRÊA, C. R., CALIXTO, J.B. **Evidence for participation of Bl and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse**. Br. J. Pharmacolog., 1993. v. 110, p. 193-198.

CORTELLI, P., PIERANGELI, G. **Chronic pain-autonomic interactions**. Neurological Sciences, 2003. v. 24, n. 2, p. S68 - S70.

CURY, Y.; PICOLO, G. **Animals toxins as analgesics – an overview.** Drugs News Perspect, 2006. Sep;19(7):381-92.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. **A method for determining loss of pain sensation.** *J Pharmacol Exp Ther*., 1941. v.72, p.74-79.

DHAWAN, B.N. *et al.* **Classification of opioid receptors**. Pharmacol Rev., 1996. v.48, p. 567-592.

DIAS, S. **A versão biológica da dor**. Com Ciência, 2007. n.87. Reportagem. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=24&id=274&tipo=0>, Acesso em: 15 de dezembro de 2009.

DRAY, A..; URBAN, L.; DICKENSON, A. **Pharmacology of chronic pain**. Trends Pharmacol., Sci., 1994. v. 15, p. 190-197.

DUGGAN, A.W.; NORTH, R.A. **Electrophysiology of opioids**. Pharmacol Rev., 1984. v.35, p.219-281.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. **Central nervous system mechanisms of pain modulation**. In Text book of pain**.** Patrick Wall e Ronald Melzack., 4ª ed., Churchill Livinstone, Nova York, 1999.

FICHNA, J., JANECKA, A., COSTENTIN, J., DO REGO, J.C. **The endomorphin system and its evolving neurophysiological role**. Pharmacol. Rev., 2007. v. 59(1), p. 88–123.

FÜRST, S. **Transmitters involvednin antinociception in the spinal cord**. Brain Research Bulletin, 1999. v.48, n.2, p.129-141.

GALLUZZI, K.E. **Managing neuropathic pain**. JAOA, 2007. v.107, n.10, s.6, p.39-48.

GIORGI, R., BERNARDI, M.M., CURY, Y. **Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted form *Crotalus durissus terrificus* venom**. Toxicon, 1993. v. 31, p. 11257-1265.

GOMES, N. F. **Estudo de toxinas isoladas do veneno da *Crotalus durissus cascavella* com ação analgésica.** Dissertação (Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará. 2007.

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, 2008. v. 594, p. 84–92.

GUTSTEIN, H. B.; GUTSTEIN, H.B.; MANSOUR, A.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; FIELDS, H.L. **Mu and Kappa opiod receptors in periaqueductal gray and rostral vetromedial medulla.** Neuroreport, 1998. v.9, n.8, p.1777-81.

GUTSTEIN, H.B; AKIL, H. **Analgésicos Opióides**. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD,L.E.; GILMAN, A.G. Goodman & Gilman - As bases Farmacológicas da Terapêutica**.** 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 427-482.

HABERMEHIL, G. **Venomous animals and their toxins.** Berlin: Springer, 1981.

HARDY, J.D. **Threshold of pain and reflex contraction as related to noxious stimuli**. *J. Appl Physiol*, 1953. v.5, p.725-739.

HARDY, J.D.; STOLL, A.M.; CUNNINGHAM, D.; BENSON, W.M.; GREENE, L. **Responses of the rat to thermal radiation**. *Am J Physiol.*, 1957. v.189**,** p.1-5.

HARVEY, A.L.; BRADLEY, K.N.; COCHRAN, S.A.; ROWAN, E.G.; PRATT, J.A.; QUILLFELDT, J.A.; JERUSALINSKY, D.A. **What can toxins tell as for drog discovery?** Toxicon, 1998. v.36 (11):1635-40.

HERZ, A. **Opioids - Handbook of experimental pharmacolgy**. Berlin: Spriger-Verlag, 1993.

HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W. **Identification of two related pentepeptides from the brain with potent opiate agonist activity**. Nature, 1975. v.258, p.577-579.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. **Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics**. J. Neurosci. Meth., 1985. v. 14, p. 69-76.

IADAROLA, M.J.; CLAUDE, R.M. **Good pain, bad pain**. Science, 1997.v. 278, p. 239-240.

IASP (International Association for the Study of Pain). ***IASP Pain Terminology***. 2ª ed. Seattle, 1994.

JABBUR, S.J.; SAADÉ, N.E. **From electrical wiring to plastic neurons: envolving approaches to the study of pain.** Pain, 1999. v. 6, p. 587-592.

JEFFE, JH; MARTIN, WR. Opioid **Analgesics and antagonists.** In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman`s - The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9ª ed. New York: The Mcgraw Hill, 1996. p.485-521.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica. P.** Guanabara Koogan, 2ª Ed., 2000. p. 575-579.

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

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica.** 8ª Ed. Guanabara Koogan, 2003.

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

KRAYCHETE, D. **Opióides.** In: SILVA, P. Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 456-469.

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, 2008. v. 29. p. 1 293–1304.

LEVY, D.; HOKE, A.; ZOCHODNE, D.W. **Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain**. Neurosci. Lett., 1999. v.206, p.207-209.

LEWIS, J.R.; GARCIA, M.L. **Therapeutic potential of venom peptides**. Nature Reviews, 2003. v.2, p. 790-802.

LOOMIS, T.A.M.D.; HAYES, A.W. **Loomis's essential of toxicology.** 4ª ed. Academic press, 1996.

LOPES R. A. **Descoberta De Uma Substância Com Atividade Analgésica Periférica, Isolada Do Veneno Da Serpente *Crotalus durissus collilineatus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2005.

MANCIN, A.C., SOARES, A.M., ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., FAÇA, V.M., GREENE, L.J., ZUCCOLOTT, S., PELÁ, I.R.; GIGLIO, J.R. **The analgesic activity of crotamine, a**

neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon, 1998. v. 36, p. 1927-1937.

MANSOUR, A. *et al*. **Um, delta and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an *in situ* hybridization study**. J. Comp. Neurol., 1994. v.350, p.412-438.

MAO, J. **Opioid –induced abnormalpain sensitivity: implications in clinical opioid therapy.** Pain, 2002. v.100, p.213-217.

MEBS, D. **Toxicity in animals. Trends in evolution ?** Toxicon, 2001. v. 39, p.87-96.

MELZACK, R., WALL, P.D. **Pain mechanisms: a new theory**. Science, 1965. v.150, p.971-979.

MÉNEZ, A. **Functional Architectures of animal toxins: a clue to drug design?** Toxicon, 1998. v.36, p.1557-1572.

MERRER, J., BECKER, J.A.J., BEFORT, K., KIEFFER, B.L. **Reward Processing by the Opioid System in the Brain.** Physiol Rev, 2009. v. 89, p. 1379–1412.

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

MEYER, R.A., RINGKAMP, M., CAMPBELL, J.N., RAJA, S.N. **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception**. In Wall and Melzack's Textbook of Pain, S.B. McMahon e M. Koltzenburg, eds. (Philadelphia: Elsevier), 2008. p. 3–34.

MEUNIER, J. C., **Nociceptin/orphanin FQ and the opoid receptor-like ORL 1 receptor.** EUR. J. Pharmacot., 1997. v. 34, p. 1-15.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília, 1998.

MORAN, T.D.; ABDULLA, F.A.; SMITH, P.A. **Cellular neurofiological actions of nociceptin/orphain FQ**. Peptides, 2000. v.21, p.969-976.

MOREIRA, K.G. **Estudo das atividades antinociceptiva e antiinflamatória do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* crotamina positivo e crotamina negativo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, 2003.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C. **Pain.** In: Molecular Neuropharmacology - A foundation for clinical neurocience. New York: MacGraw-Hill, 2001. p. 433-452.

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, 2008. v. 91, p. 252–260.

NORTH, R.A. Opioid **actions on membrane ion chanels**. In: Herz, A**.** Opioids Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer – Verlag, 1993.

NUNES, F.P.B.; SAMPAIO, S.C.; SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA. M.C.C. **Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice.** Toxicon, 2007. v.49, p.1090-1098.

NUNES, F.P.B.; ZYCHAR, B.C.; DELLA-CASA, M.S.; SAMPAIO, S.C.; GONÇALVES, L.R.C.; CIRILLO, M.C. **Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom: Involvement of formyl-peptide receptors.** Toxicon, 2010. p.1-7.

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

OSSIPOV, M.H. *et al*. **Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance**. Life Sciences, 2003. v.73, p.783-800.

PASTERNAK, G.W. **Pharmacological mecanisms of opioid analgesis**. Clin. Neuropharmacol, 1993. v.16, p.1-18.

PERL, E.R. **Ideas about pain, a historical view.** Nat. Rev. Neuroscienci, 2007. v. 8, p. 71–80.

PICOLO, G., GIORGI, R., BERNARDI, M.M., CURY, Y. **The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response**. Toxin, 1998. v.36, p.223-227.

PICOLO, G, GIORGI, R, CURI, Y. **δ-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* venom.** Eur. J. Pharmacol., 2000. v. 391, p. 55-62.

PICOLO, G.; CASSOLA, A.C.; CURY, Y. **Activation of peripheral ATP-sensitive K+ channels mediates the ntinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom.** Eur. J. of Pharmacol, 2003. v.469, p.57-64.

PICOLO,G.; CURY,Y. **Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a δ- and *K*- opioid receptor agonist**. Life Sciences, 2004. v.75, p.559-573.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. **Ofidismo**. Rev Ass Med Brasil, 2001. v. 47(1): 24-9.

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.

RAFFA, R.B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R.P.; CODD, E.E.; VAUGHT, J.L. **Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of**

action of tramadol, an "atypical" opioid analgesic. J Pharmacol Exp Ther, 1992. v.260, p.275-285.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. **Toxins in anti-nociception and anti-inflammation.** Toxicon, 2004. V.44, p. 1-17.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. **A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals.** Pharmac. Res., 1996. v. 3 p. 263-269.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., **Fármacos analgésicos**. In: RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., Farmacologia. Editora Guanabara Koogan, rio de janeiro, 4a Ed, 2001. p. 485-505.

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

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E.C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D.F.; MOTA, I.A. **Comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus,Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus***. Toxicon, 2004. v. 43, p. 801-810.

RIVIÈRE, P.J.M. **Peripheral kappa-opioide agonists for visceral pain**. Br. J. of Pharmacol., 2004. v.141, p.1331-1334.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl, W., Buckley, E. (Eds). **Venomous Animals and their Venoms.** Academic Press, New York, 1971. v. 2, p. 345-384.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. **Chronic pain**. Ann. Rev. Med., 1998. v. 49, p. 123-133.

SAWYNOK, J. **Topical and Peripherally Acting Analgesics**. Pharmacol Rev, 2003. v.55, p. 1-20.

SCHENBERG, S. **Geographic pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies**. Science, 1959. v. 129. p. 1301-1363.

SERRA, J. **Overview of neuropathic pain syndromes [new advances in the treatment of neuropathic pain]**. Acta Neurologica Scandinavica, 1999. v. 100 (Supplementum), n. 173, p. 7-11.

SMITH, D.L.; D'AMOUR, M.C.; D'AMOUR, F.E. **The analgesic properties of certain drugs and drug combinations**. *J Pharmacol Exp Ther*, 1943. v.77, p.184-193.

SMITH, G. R.; MONSON, R. A.; RAY, D. C. **Patients with multiple unexplained symptoms.Their characteristics, functional health, and health care utilization**. Archives of Internal Medicine, 1986. v.146, n.1, p.69-72.

SMITH, C.M.; REYNARD, A.M**. Essentials of Pharmacology.** Sounders,1995.

STEIN, C. *et al.* **Local analgesic effect of endogenous opioid peptides**. Lancet, 1993. v.342, p.321-324.

STEIN, C., CLARK, J.D., OH, U., VASKO, M.R., WILCOX, G.L., OVERLAND, A.C., VANDERAH, T.W., SPENCER, R.H. **Peripheral mechanisms of pain and analgesia.** Brain research reviews, 2009. v. 60, p. 90 – 113.

STOCKER, K. F. **Composition of snake venom** IN: Stocker, K. F. (ed). Medical Use Snake Venom Proteins. CRC Press, 1990. p. 37-57.

TJÆLSEN, A, BERGE, O. G., HUSKAAR, S., et al. **The formalin test: na evaluation ofthe method**. Pain, 1992. v. 51, p.5-17.

TRIGO, J.M.; MARTIN-GARCIA, E.; BERRENDERO, F.; ROBLEDO, P.; MALDONADO, R. **The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction**. Drug and alcohol dependence, 2009. p. 1-12.

VANDER WEND, C.; MARGOLIN, S. **Analgesic tests based upon exerimentally induced acute abdominal pain in rats.** Federation Proceedings, 1956. v.15, p.494.

VANDERAH, T.W. *et al.* **FE200041 (D-Phe-D-Phe-D-Nle-DArg-NH2): A peripheral efficacious κ-opioid agonist with unprecedented selectivity**. J. Pharmacol and Exp. Therap. Fast Forward, 2004. v.1.incompleta

VAN REE, J.M. *et al.* **Endogenous opioids and reward**. European J. of Pharmacol. 2000. v. 405, p. 89-101.

VARGA, E.V. *et al.* **Agonist-specific regulation of δ-opioid receptor**. Life Sciences, 2004. v. 76, p. 599-612.

VANZOLINI, P.E.; CALLEFFO, M.E.V. **A taxonomic bibliography of the South American snakes of the *Crotalus durissus* complex (Serpentes, Viperidae).** An. Acad. Cienc., 2002. v.74, p.37-83.

VITAL-BRAZIL, O. Do **emprego da peçonha em terapêutica**. Biol. Med., 1934. v.1, p.7-21.

VITAL-BRAZIL, O. **Do emprego da peçonha em terapêutica**. An. Paul. Med.Cir., 1950. v.60, p. 398-408.

VITAL-BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. **Toxins as tools in the study of sodium channel distribuition in the muscle fibre membrane**. Toxicon, 1993. v.31, p.1085-1098.

VITOR, A.O.; PONTE, E.L.; SOARES, P.M.; LIMA, R.C.S.; VASCONCELOS, S.M.M. **Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica**. RECIIS, 2008. v.2, n.1, p.87-96.

WAY, W.L.; FIELDS, H.L.;SCHUMACHER, M.A. **Analgésicos e Antagonistas Opióides.** In: KATZUNG, B.G. Farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 446-462.

WOOLFE, G.; MAC DONALD, A. D. **The evalution ofthe analgesic action ofpethidine hydrochloride (Demerol).** J. Pharmacol. Exper. Ther., 1944. v.80. p.300-307.

WOOLF, C.J. **A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization**. Drugs, 1994. v. 47, p. 1-9.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** The Lancet, 1999. v.353, n.9168, p.1959-1964.

YAMASAKI, S.C.; VILLARROEL, J.S.; BARONE, J.M.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P.F. **Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in Crotalus durissus terrificus envenomation in mice.** Toxicon, 2008. v. 52, p. 445-454.

YAKSH, T.L. **Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity**. Acta Anaesthesiol Scand, 1997. v.41, p.9-111.

ZHANG, H., HAN, R., CHEN, Z., CHEN, B., GU, Z., REID, P.F., RAYMOND, L.N., QIN, Z. **Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom.** Toxicon, 2006. v. 48, p. 175-182.

ZÖLLNER, C., STEIN, C. **Opioids.Handb.Exp.** Pharmacol. 2007. v.177, p.31–63.

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