

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)

Gisele Graça Leite dos Santos

Salvador – Brasil
2011

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

Gisele Graça Leite dos Santos

Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Flora Villarreal
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Lyra Casais e Silva

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Salvador – Brasil
2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador – Bahia.

S237m Santos, Gisele Graça Leite dos
Caracterização farmacológica de efeito antinociceptivo do veneno de
Micrurus lemniscatus (coral-verdadeira) [manuscrito] / Gisele Graça Leite dos
Santos. - 2011.
68 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2011.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiane Flora Villarreal, Laboratório de Engenharia
Tecidual e Imunofarmacologia.

1. *Micrurus*. 2. Dor. 3. Antinociceptivo. 4. Venenos de serpentes. 5.
Opióides. 6. Coral-verdadeira. I.Título.

CDU 615.276:598.12

Gisele Graça Leite dos Santos

Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)

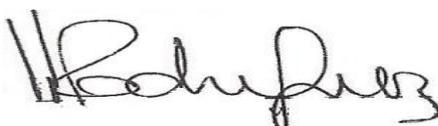
Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 17 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Fernanda Washington de Mendonça Lima
Faculdade de Farmácia – UFBA



Profª Drª Tânia Tavares Rodriguez
Instituto de Ciências da Saúde – UFBA



Prof Dr Marcos André Vannier dos Santos
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz – LPB

FONTE DE FINANCIAMENTO:

Fiocruz

DEDICATÓRIA

Às pessoas que sofrem com as síndromes dolorosas.

“Todo mundo é capaz de dominar uma dor, exceto quem a sente.”
(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Embora seja muito boa a sensação de concluir mais uma etapa na minha vida, sei que essa conclusão não se deve só a mim. Em um trabalho de pesquisa, os resultados só são possíveis pela contribuição de várias pessoas, seja intelectual, técnica ou emocional. Para mim, escrever os agradecimentos é mais difícil do que redigir a dissertação porque sei que não conseguirei ser fiel ao tanto e às variadas formas de “muito obrigada” que gostaria.

De antemão, pelo receio de esquecer ou não corresponder à expectativa de alguém, quero agradecer imensamente a todas as pessoas que tive o prazer de conviver nesses dois anos de mestrado: reconheço a importância de cada palavra, colaboração ou gesto proferido. Mesmo com esse receio, arrisco-me a listar pessoas que contei com a contribuição e apoio, fazendo parte direta ou indiretamente dessa dissertação:

- À Prof^a Dr^a Luciana Lyra Casais e Silva pela oportunidade de trabalhar com esse tema e pelo apoio nesta nova jornada. À Prof^a Dr^a Cristiane Flora Villarreal por aceitar a continuação desse trabalho e pela cooperação para a finalização da dissertação. Agradeço as duas pelos conhecimentos compartilhados, pelas discussões científicas, correções, pela paciência e pelo empenho durante esse trabalho;
- À Dr^a Milena Botelho Pereira Soares pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) e pela atenção em um momento delicado;
- Ao curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa e aos professores das disciplinas pelas ricas aulas e presteza;
- À Dr^a Simone Garcia Macambira pela atenção e auxílio, principalmente com relação ao CEUA;
- À Tâmara Magalhães Oliveira Nogueira por passar seus conhecimentos nos experimentos;
- À Flávia Oliveira de Lima pela discussão de ideias e por compartilhar sua experiência científica. Prometo que você terá a “patente” sobre o apelido ‘Clô’! À Milena da Silva Lima, que entrando na mesma época no mestrado, compartilhou das dúvidas e ansiedade. Obrigada pelo auxílio nos experimentos e por todas as conversas. Nunca vou me

esquecer do primeiro e-mail que te mandei todo formal e você respondeu como se já fosse minha amiga há anos! À Nanashara Coelho de Carvalho que, mesmo não pertencendo ao grupo da dor, não hesitou em me ajudar nos experimentos, pelo auxílio com os problemas com o notebook, pelas caronas (até as mais sem noções que existem) e conversas. Só por isso vou relevar o fato de você não ter me reconhecido quando participou da seleção para o LETI (brincadeira!). Obrigada, meninas, pela solidariedade, pelas risadas, incentivo, conversas, carinho e companheirismo nesta jornada.

- A Márcio Coutinho, que mesmo com pouco tempo de convivência, contribuiu para o meu conhecimento sobre dor e visão científica;
- À Flavielle Martins de Melo pelo tempo de convívio;
- À Iukary Oliveira Takenami, minha amiga desde o maternal e colega de profissão, que desde a graduação me ajudou a entender o programa de estatística e passou seu conhecimento sobre o assunto, sempre com grande carinho e amizade;
- À Clarissa Cunha Santana, Rebeca Cavalcanti Ribeiro Imbroinise, Taís Soares Macedo que chegaram já perto da reta final e mesmo assim estavam dispostas a ajudar quando podiam;
- A Vinícius Pinto Costa Rocha, pelo incentivo, diálogo e carinho;
- Aos colegas do LETI pela convivência diária, auxílio, aprendizado e momentos de descontração;
- À Lucyvera Imbroinise pelo auxílio nas minhas dúvidas administrativas e competência;
- Aos professores da qualificação (Prof^o Dr^o Ricardo David Couto e Prof^o Dr^o Tércio Ramos) pelas sugestões ao trabalho;
- À banca examinadora da dissertação pela disponibilidade e contribuições a essa dissertação;
- Aos meus amigos e familiares que torcem por mim;
- Aos funcionários do biotério;
- À Fiocruz, pelo apoio financeiro.

E como não poderia faltar:

- À minha família, meu porto-seguro, que está sempre ao meu lado me dando amor, apoio, motivação e que se esforça ao máximo para que eu realize meus objetivos;
- A Deus por sempre iluminar meus caminhos e pensamentos, fazendo com que me torne uma pessoa melhor a cada dia e pela força em todos os momentos.

Por fim, reitero a todos, mesmo que não citados, meu carinho e '**muito obrigada**'.

Aos animais que foram utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

“Sem a convicção de uma harmonia íntima do universo, não poderia haver ciência. Esta convicção é, e continuará a ser, a base de toda criação científica. Em toda a extensão de nossos esforços, nas lutas dramáticas entre as velhas e as novas concepções, entrevemos a ânsia eterna de compreensão, a intuição inabalável na harmonia universal, que se robustece na própria multiplicidade de obstáculos que se oferecem ao nosso entendimento.”

Albert Einstein

SANTOS, Gisele Graça Leite dos. Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira). 68 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

Os componentes dos venenos das serpentes constituem ferramentas farmacológicas e biotecnológicas relevantes. Recentemente, seu potencial terapêutico tem sido demonstrado; podendo representar a base para o desenvolvimento de medicamentos para o controle da dor. A ausência de dor local, mesmo na presença de edema e inflamação, sugere a presença de componente analgésico no veneno de serpentes do gênero *Micrurus*. Para investigar essa hipótese, no presente trabalho investigamos a atividade antinociceptiva do veneno de *Micrurus lemniscatus* em modelos experimentais de dor. Em um teste de triagem para antinocicepção, no teste de contorções abdominais, a administração oral do veneno (19,7 - 1600 µg/kg) produziu efeito antinociceptivo significativo. Confirmando essa atividade, o veneno (1600 µg/kg) inibiu as duas fases do teste de formalina, indicando que um mecanismo central pode estar envolvido na antinocicepção. A participação de um componente central foi confirmada no teste de retirada da cauda no qual o veneno (59 - 1600 µg/kg) produziu efeito antinociceptivo dose-dependente. Neste teste, a dose de 1600 µg/kg produziu efeito antinociceptivo mais potente e duradouro que o efeito da morfina, analgésico considerado padrão ouro. Validando essa antinocicepção, a administração do veneno (1600 µg/kg) não provocou comprometimento motor nos testes de rota-rod e campo aberto. Em outra série de experimentos, os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do veneno foram investigados com a utilização de antagonistas farmacológicos de receptores opióides. O efeito antinociceptivo do veneno foi prevenido pela naloxona, antagonista opióide não-seletivo, sugerindo a mediação pelo sistema opióide. Em adição, o pré-tratamento com o antagonista de receptor µ opióide (CTOP; 1 mg/kg) preveniu completamente o efeito antinociceptivo do veneno. O pré-tratamento com antagonista de receptor κ opióide (nor-BNI; 0,5 mg/kg) ou δ opióide (naltrindole; 3 mg/kg) reduziu parcialmente o efeito antinociceptivo desse veneno. Os resultados obtidos demonstram que o veneno de *M. lemniscatus* apresenta potente efeito antinociceptivo mediado pelo sistema opióide, sobretudo por receptores do tipo µ.

Estudos complementares devem ser realizados para melhor elucidar o mecanismo de ação e o(s) constituinte(s) do veneno envolvido(s) em sua ação antinociceptiva.

Palavras-chave: *Micrurus*, dor, antinociceptivo, venenos de serpentes, opióides, coral-verdadeira.

ABSTRACT

The components of snake venom are important pharmacological and biotechnology tools. Recently, their therapeutic potential has been demonstrated; which may represent the basis for the development of drugs for pain control. The absence of local pain, even in the presence of edema and inflammation, suggests the presence of an analgesic component in the snake venom of the genus *Micrurus*. In order to investigate this hypothesis, we studied the antinociceptive activity of *Micrurus lemniscatus* venom in experimental models of pain. In a screening test for antinociception, the writhing test, oral administration of venom (19,7 - 1600 µg/kg) produced significant antinociceptive effect. Confirming this activity, the venom (1600 µg/kg) inhibited both phases of the formalin test, indicating that a central mechanism may be involved in antinociception. The participation of a central component was confirmed in the tail-flick test, in which the venom (59 - 1600 µg/kg) produced dose-dependent antinociceptive effect. In this test, the dose of 1600 µg/kg produced a more potent and long lasting antinociceptive effect than the one related to morphine, an analgesic considered the gold standard. Corroborating these results, administration of venom (1600 µg/kg) did not cause motor impairment in the rota-rod and open field tests. In another series of experiments, the mechanisms involved in the venom antinociceptive activity were investigated through the use of pharmacological antagonists of opioid receptors. The venom antinociceptive effect was prevented by naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, suggesting mediation by the opioid system. In addition, pretreatment with a μ opioid receptor antagonist (CTOP, 1 mg/kg) completely prevented the venom antinociceptive effect. On the other hand, pretreatment with κ opioid receptor antagonist (nor-BNI, 0,5 mg/kg) or δ opioid receptor antagonist (naltrindole; 3 mg/kg) partially reduced the venom antinociception. The present results show that the venom of *M. lemniscatus* has potent antinociceptive effect mediated by the opioid system, especially by the receptor μ . Further studies should be conducted to better elucidate the mechanism of action of this venom and its component(s), which are involved in its antinociception.

Keywords: *Micrurus*, pain, antinociceptive, snake venoms, opioids, coral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Mecanismo da dor	20
Figura 02 – Tipos de fibras nervosas	21
Figura 03 – Transmissão da dor	22
Figura 04 – Características do gênero <i>Micrurus</i>	24
Figura 05 – <i>Micrurus lemniscatus</i>	26
Figura 06 – Mecanismo de ação do veneno da <i>Micrurus sp.</i>	27
Figura 07 – Padrão das contorções abdominais	30
Figura 08 – Teste de formalina	31
Figura 09 – Aparato para a realização do teste de retirada da cauda	32
Figura 10 – Aparelho rota-rod	33
Figura 11 – Campo aberto	34
Gráfico 01 – Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de contorções abdominais	37
Gráfico 02 – Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de formalina	39
Gráfico 03 – Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de retirada da cauda	40
Gráfico 04 – Efeito do veneno da <i>M. lemniscatus</i> no teste de rota-rod	42
Gráfico 05 – Efeito do veneno da <i>M. lemniscatus</i> no teste de campo aberto	43
Gráfico 06 – Efeito da naloxona na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	44
Gráfico 07 – Efeito do CTOP na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	45
Gráfico 08 – Efeito do nor-BNI na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	46
Gráfico 09 – Efeito do naltrindole na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	47
Gráfico 10 – Efeito do aquecimento do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de retirada da cauda	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Antagonistas opióides	35
Tabela 02 – Doses efetivas mediana (DE ₅₀) do veneno de <i>M. lemniscatus</i> e morfina no teste de retirada da cauda em camundongos	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

°C	graus Celsius
±	mais ou menos
µg/kg	micrograma por quilograma
µL	microlitros
µm	micrometro
ACh	acetilcolina
AINEs	antiinflamatórios não-estereoidais
ANOVA	análise de variância
Ca ⁺⁺	cálcio
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
cm	centímetros
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
DE ₅₀	dose efetiva mediana
E.P.M	erro padrão da média
g	gramas
h	hora
IA	índice de analgesia
IASP	-do inglês: International Association for the Study of Pain
i.p.	via intraperitoneal
m/s	metros por segundo
mg/kg	miligrama por quilograma
mL	mililitro
mm	milimetro
NEVA	Núcleo de Estudo em Venenos Animais
NLX	naloxona
nor-BNI	nor-binaltorphimine

ns	não-significativo
NTXs	neurotoxinas
p	probabilidade condicional
rpm	rotações por minuto
s	segundos
s.c.	via subcutânea
SNC	sistema nervoso central
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor: aspectos gerais	18
1.2 Neurofisiologia da dor	19
1.3 Tratamento farmacológico para o alívio da dor	23
1.4 <i>Micrurus lemniscatus</i>	24

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais	29
3.2 Obtenção do veneno de <i>Micrurus lemniscatus</i>	29
3.3 Avaliação do efeito antinociceptivo	
3.3.1 <i>Teste de contorções abdominais</i>	29
3.3.2 <i>Teste de formalina</i>	30
3.3.3 <i>Teste de retirada da cauda</i>	31
3.4 Avaliação da função motora	32
3.5.1 <i>Teste de rota-rod</i>	32
3.5.2 <i>Teste de campo aberto</i>	33
3.5 Aquecimento do veneno	34
3.6 Cálculo de DE50	34
3.7 Compostos e diluições	34
3.8 Protocolo Experimental	35
3.9 Análise Estatística	36

4 RESULTADOS	
4.1 Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de contorções abdominais	37
4.2 Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de formalina	38
4.3 Efeito antinociceptivo do veneno de <i>M. lemniscatus</i> no teste de retirada da cauda	40
4.4 Efeito do veneno na coordenação motora dos animais no teste de rota-rod	42
4.5 Efeito do veneno na atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto	43
4.6 Efeito do bloqueio de receptores opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	44
4.7 Efeito do bloqueio de receptores μ opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	45
4.8 Efeito do bloqueio de receptores κ opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	46
4.9 Efeito do bloqueio de receptores δ opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda	47
4.10 Efeito do aquecimento do veneno de <i>M. lemniscatus</i> sobre sua atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda	49
4.11 Cálculo de DE50	50
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor: aspectos gerais

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão das consultas médicas em um terço dos casos (ROCHA et al., 2007). Mais de 1/3 dos brasileiros afirmam que a dor crônica compromete suas atividades habituais e mais de 3/4 destes consideram que a dor crônica é limitante para as atividades recreacionais e relações sociais e familiares (YENG & TEXEIRA, 2004). Na população de Salvador, em um estudo realizado com 2297 pessoas acima de 20 anos, verificou-se que 41,4% sofrem de dor crônica (SÁ et al., 2008). Esses dados de alta prevalência demonstram a importância da compreensão dos eventos que envolvem o comportamento doloroso e a busca por terapias (farmacológica ou não-farmacológica) para a devida intervenção no modelo de assistência inter e multiprofissional.

A dor é um mecanismo protetor, de alerta, desencadeado por estímulos potencialmente lesivos, fazendo com que o indivíduo reaja para remover o estímulo doloroso (GUYTON & HALL, 2011). Ao contrário da maioria das modalidades sensoriais, a dor é essencial à sobrevivência (CAILLIET, 1999). A sua fisiologia envolve uma interação complexa de diferentes estruturas periféricas e centrais da superfície da pele até o córtex cerebral (FÜRST, 1999). Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada, incluindo respostas neuroendócrinas como a secreção de glicocorticóide e ativação simpática, com elevações de pressão sanguínea e batimentos cardíacos, que auxiliam ações comportamentais que visam o afastamento de situações de risco (MILLAN, 1999).

Além da transdução do estímulo nocivo ambiental, a dor envolve também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS & BASBAUM, 2001). De fato, segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como *“uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tais lesões”*. Baseado nesta definição se concebe a experiência dolorosa como multidimensional, privada e particular (PEREIRA & RABELLO, 2003); isto é, leva em consideração a

subjetividade do fenômeno da dor: os aspectos afetivos, motivacionais e cognitivos (ALMEIDA et al., 2004).

De acordo com essa ideia, a dor, além de uma sensação, é uma experiência. Por isso, é necessário distinguir, conceitualmente, 'dor' de 'nocicepção'. Nocicepção se refere ao mecanismo pelo qual o dano tecidual - mecânico, térmico ou químico - excitando um nervo sensorial, dá início ao processo que conduz a informação nociceptiva ao Sistema Nervoso Central (SNC) (LOESER, 1975 apud PERISSINOTI, 2002). Sendo assim, a nocicepção se refere apenas às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo. Por outro lado, a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais (ALMEIDA et al., 2004). Portanto, o domínio nociceptivo associado ao domínio afetivo determina o comportamento doloroso (PEREIRA & RABELLO, 2003). Considerando que a identificação da dor em animais não é óbvia, termos como dor e analgesia são comumente utilizados para seres humanos enquanto nocicepção e antinocicepção usados para animais (JONES, 1992 apud SOUZA, 2008).

1.2 Neurofisiologia da dor

De maneira geral, podemos considerar que o mecanismo da dor compreende três fases básicas (Figura 01): transdução, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nocivo em potencial de ação; transmissão, que é o conjunto de eventos que permitem que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja conduzido para o SNC; e modulação, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou facilitação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004).

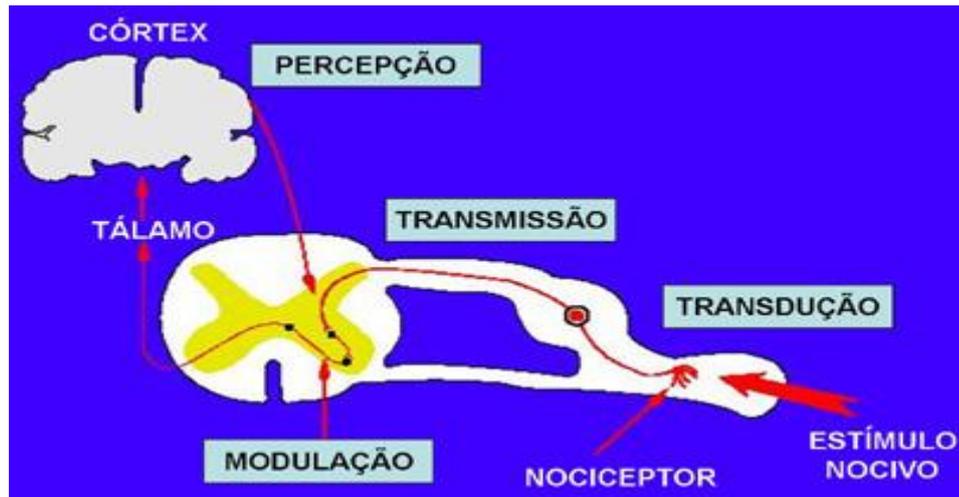


Figura 01: Mecanismo da dor. Nesse sistema há mecanismos que amplificam ou inibem a dor.

Fonte: DOL: DOR ON LINE - Acesso em 12 nov. 2010.

Quando o estímulo nocivo é produzido, as terminações livres dos neurônios aferentes primários, chamados de nociceptores, o detectam e transmitem para o SNC (revisado por CATERINA et al., 2000). Os nociceptores são encontrados em praticamente todos os tipos de tecido do corpo e são classificados em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução em A-delta (A- δ) e C (ALMEIDA et al., 2004).

As fibras nervosas A- δ são levemente mielinizadas, sendo responsáveis pela dor rápida e bem localizada, desencadeada por estímulos mecânicos ou térmicos. Essas fibras têm diâmetro de 2,0 a 6,0 μm e velocidade de condução de 12 – 30 m/s. Já as fibras nervosas C não são mielinizadas, sendo responsáveis pela dor lenta, difusa e mal localizada. Essas fibras são polimodais, sendo desencadeadas por estímulos químicos e também por estímulos mecânicos ou térmicos persistentes, têm diâmetro de 0,4 a 1,2 μm e uma velocidade de condução de 0,5 – 2,0 m/s (revisado por ALMEIDA et al., 2004; ABRAHAMSEN et al., 2008) (Figura 02).

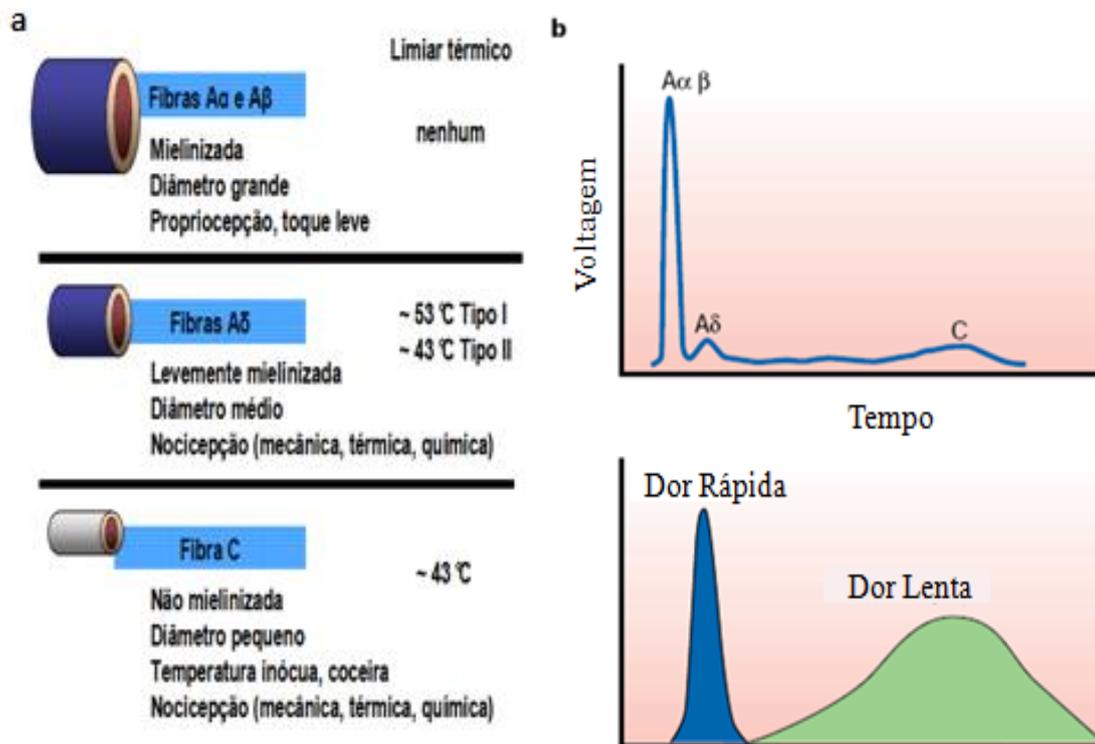


Figura 02: Tipos de fibras nervosas. Diferentes nociceptores detectam diferentes tipos de dor. **a** – tipos das fibras aferentes primárias, além de suas respectivas características e limiar térmico. As fibras A- δ e C são responsáveis pela condução da dor até a medula espinal. **b** - velocidade de condução da fibra relacionada ao diâmetro da mesma (figura em cima): a velocidade de condução é maior de acordo com a maior presença de bainha de mielina na fibra nervosa. As fibras A- δ e C são responsáveis pelos tipos de dor rápida e lenta, respectivamente (figura embaixo). Fonte: Adaptado de Julius & Bausbaum, 2001.

Quando ativadas, as fibras A- δ e C sofrem alterações em suas membranas, permitindo a deflagração de potenciais de ação ao longo de toda a fibra (ROCHA et al., 2007). As fibras nociceptivas possuem elevado limiar de ativação, e se projetam da periferia para o corno dorsal da medula espinal onde ativam grande número de neurônios de segunda ordem que podem ser interneurônios ou neurônios de projeção (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). As fibras nociceptivas adentram o corno dorsal da medula espinal pelas raízes espinais dorsais e estabelecem conexões sinápticas com neurônios espinais de distribuição altamente organizada (revisado por MILLAN, 1999). De acordo com critérios histoarquitetônicos, o corno dorsal da medula espinal se divide em várias camadas, denominadas lâminas de Rexed. As fibras A- δ terminam principalmente nas lâminas I e V e as fibras C nas

lâminas II e III (CAILLIET, 1999). A conexão sináptica entre fibras aferentes primárias e neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (MILLAN, 1999; ROCHA et al., 2007) (Figura 03).

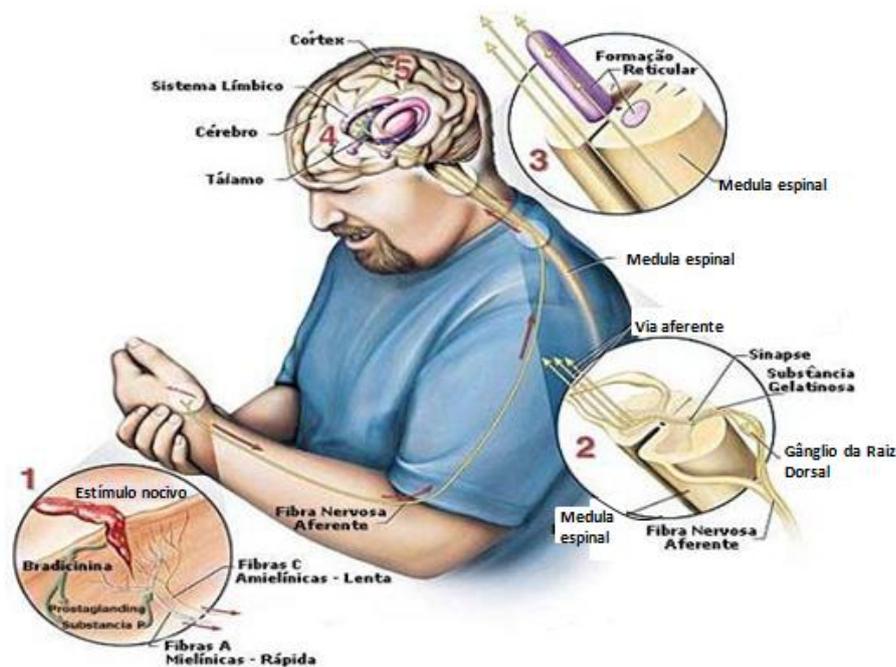


Figura 03: Transmissão da dor. **1** - nociceptores ativados por um estímulo nocivo. Liberação de substâncias algio gênicas e deflagração do potencial de ação da periferia para o corno dorsal da medula através das fibras A- δ e C **2** – no corno dorsal, as fibras terminam em suas respectivas lâminas de Rexed situadas no corno dorsal da medula espinal. Neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem são acionados e ascendem através das vias aferentes de dor; liberação de neurotransmissores. **3** – O corno dorsal é a região da medula espinal cujo propósito principal é receber o estímulo aferente de dor, modificar o sinal de entrada de acordo com a modulação descendente dos centros cerebrais superiores e liberar a informação resultante aos centros cerebrais superiores como tálamo, sistema límbico (**4**) e córtex (**5**) para continuar o processo de compreensão da dor. Fonte: Adaptado de Miguel Jr., 2007.

A partir do corno dorsal, neurônios de projeção ascendem ao tálamo e córtex, passando pelo tronco encefálico, formando os tratos que constituem as vias ascendentes de condução da dor, como os tratos neoespinalâmico, paleoespinalâmico, espinomesencefálico, entre outros. É através dessas vias que os sinais dolorosos seguem seu trajeto até o encéfalo (MILLAN, 1999; ALMEIDA,

2004). O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção, sendo que o tálamo funciona como um ponto de redistribuição e o córtex participa da discriminação e localização do estímulo (GUYTON & HALL, 2011).

Além das vias ascendentes responsáveis pela transmissão da dor, existem vias descendentes envolvidas com a modulação da dor. Essas vias se originam em vários níveis do encéfalo, como tronco encefálico, hipotálamo, córtex e tálamo (MILLAN, 2002). Uma das descobertas mais interessantes a respeito da modulação descendente da dor é que essa pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (JULIUS & BAUSBAUM, 2001).

1.3 Tratamento farmacológico para o alívio da dor

Apesar da função fisiológica protetora da dor aguda, a dor intensa, persistente ou crônica necessita de intervenção medicamentosa. Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os opióides são as duas principais classes atualmente utilizadas como analgésicos. Eles atuam prevenindo a sensibilização dos nociceptores via inibição da ciclooxigenase (CASHMAN, 1996), e abolindo diretamente a transmissão nociceptiva pela ligação em receptores opióides (HOSKIN & HANKS, 1991), respectivamente. No entanto, apesar da eficácia em uma variedade de síndromes dolorosas, esses fármacos causam efeitos colaterais graves, sobretudo mediante uso prolongado (REISINE & PASTERNAK, 1996 apud RAJENDRA et al., 2004). Opióides causam constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia, depressão respiratória e tolerância (HOSKIN & HANKS, 1991). Do mesmo modo, AINES como indometacina e ácido acetil salicílico apresentam alta toxicidade renal e gastrointestinal que podem resultar em grande morbidade, limitando seu uso prolongado (HENRY et al., 1996).

Além desses analgésicos convencionais, antidepressivos, neurolépticos, anticonvulsivantes, anestésicos locais e miorrelaxantes, também podem ser utilizados como analgésicos ao proporcionarem ativação do sistema analgésico endógeno, normalização do sono, redução da hiperexcitabilidade neuronal e relaxamento muscular, respectivamente. Apesar dessa relativamente grande gama de opções para o tratamento da dor, alguns estados de dor como os de origem neuropática, são muito refratários a analgésicos, e apenas 1/3 dos pacientes referem analgesia superior a 50% (SINDRUP & JENSEN, 1999). Por isso, o controle da dor ainda depende do desenvolvimento de fármacos mais eficazes, com menos

efeitos indesejados e com indicação para modalidades de dor ainda de difícil tratamento (JULIUS & BASBAUM, 2001; JUNIOR, 2005).

1.4 *Micrurus lemniscatus*

Até o ano de 2010, existiam 371 espécies de serpentes catalogadas no Brasil, agrupadas em 75 gêneros e 10 famílias (BÉRNILS, 2010), das quais 16% (59 espécies) podem ser consideradas potencialmente capazes de produzir envenenamentos que necessitam de intervenção médica (LIRA-DA-SILVA et al., 2009). Estão agrupadas nessa categoria as serpentes peçonhentas dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (família Viperidae) que possuem dentes inoculadores bem desenvolvidos e fosseta loreal, orifício situado entre o olho e a narina, sendo um órgão termorreceptor que indica que a serpente é peçonhenta (por isso também conhecida popularmente por “serpente de quatro ventas”); as serpentes do gênero *Micrurus* (família Elapidae) que, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos (Figura 04) (PINHO & PEREIRA, 2001); e a partir de 1999, segundo o Ministério da Saúde, as serpentes da família Dipsadidae (antiga Colubridae), embora ofereçam pouco risco de causar óbito (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

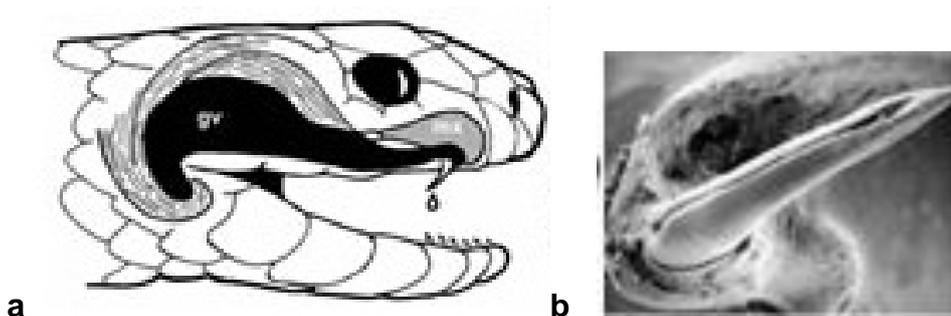


Figura 04: Características do gênero *Micrurus* – (a) ausência de fosseta loreal e dentição proteróglifa (presas inoculadoras pequenas e imóveis) no maxilar e (b) dentição proteróglifa - imagem mostrando o canal do veneno. Fonte: INSTITUTO VITAL BRAZIL, out. 2008.

Os venenos de serpentes são compostos, em sua maioria, por proteínas e peptídeos (JIANG et al., 2008) e decorrem de um contínuo processo evolutivo de

milhões de anos, tendo função, principalmente, na paralisia de presas e defesa contra predadores (MORTARI & FERREIRA, 2007). Desde 1971, quando foi isolado do veneno de *Bothrops jararaca* o peptídeo que culminou no desenvolvimento do anti-hipertensivo captopril, que os venenos de serpentes têm sido considerados fontes ricas em compostos bioativos potencialmente úteis (JIMÉNEZ & MUNÓZ, 2009). Atualmente, seu uso como agente terapêutico é baseado na medicina popular, contudo, estudos recentes têm fornecido a fundamentação científica para tal uso.

Os venenos de serpentes viperídeas e elapídeas têm sido considerados novas bases no desenvolvimento de analgésicos, induzindo antinocicepção pela ação de suas miotoxinas e neurotoxinas (NTXs), respectivamente (AIRD, 2002; CHEN et al., 2006). De fato, entre as atividades farmacológicas demonstradas para os venenos de serpentes, destaca-se a atividade analgésica. Como exemplo, podem ser citados os venenos da serpentes *Vipera russelli*, *Vipera xanthina palestinae*, *Naja naja*, *Naja kaouthia*, *Naja tripudians*, *Ophiophagus hannah* e *Crotalus durissus terrificus* (GIORGI, 1993; SHULOV & PRIMOR, 1999; RAJENDRA et al., 2004; CHEN et al., 2006).

As serpentes brasileiras do gênero *Micrurus*, família Elapidae, apresentam anéis vermelhos, pretos e brancos em diferentes combinações circundando o dorso e o ventre (Figura 05). Consideradas animais de pequeno a médio porte são conhecidos por coral, coral-verdadeira, ibiboca ou boicorá (PINHO & PEREIRA, 2001). Ao contrário da família Viperidae, não possuem fossetas loreais, suas presas inoculadoras são pequenas (do tipo proteróglifa), tem o habitat fossorial ou semi-fossorial (PINHO & PEREIRA, 2001; CARDOSO et al., 2003) e, provavelmente devido a este hábito e ao comportamento pouco agressivo, o envenenamento é relativamente raro, tendo baixa incidência em nosso meio (menos de 0,5%) (BARRAVIERA, 1999).



Figura 05: *Micrurus lemniscatus*. Triádes completas e anéis na coloração vermelhos, pretos e brancos. Fonte: INSTITUTO VITAL BRAZIL, set. 2008.

No entanto, apesar da baixa incidência, acidentes graves têm sido registrados, com rápida evolução do quadro sintomático e risco de morte (CASAIS-E-SILVA, 2001). O veneno elapídico possui neurotoxinas (NTXs), substâncias de baixo peso molecular que são rapidamente absorvidas e difundidas para os tecidos, explicando a precocidade dos sintomas de envenenamento (PINHO & FERREIRA, 2001). No entanto, estudos bioquímicos e farmacológicos dos venenos de *Micrurus* são muito escassos devido às dificuldades na correta identificação das espécies, de extração do veneno, de manutenção dos animais em cativeiro e poucas amostras da natureza (TANAKA et al., 2010; CISCOTTO et al., 2011). Outros estudos também já demonstraram que estes venenos apresentam variações na sua composição relacionadas à sua distribuição geográfica, idade, sexo e dieta (CHIPPAUX et al., 1991; CASAIS-E-SILVA, 1995; TANAKA et al., 2010).

Classicamente, os venenos das serpentes corais possuem dois mecanismos de ação neurotóxica elucidados do ponto de vista bioquímico e farmacológico apenas para poucas espécies (CECCHINI et al., 2005): (1) ação das NTXs pré-sinápticas e (2) ação das NTXs pós-sinápticas (Figura 06). Até o momento, sabe-se que NTXs pré-sinápticas de venenos de serpentes interferem com os canais de Ca^{++} , impedindo a liberação de ACh (acetilcolina) na fenda sináptica. Entretanto, NTXs pós-sinápticas foram isoladas do veneno de *Micrurus surinamensis* e *Micrurus frontalis* e atuam competindo com a ACh nos receptores colinérgicos nicotínicos das membranas pós-sináptica da junção neuromuscular dos nervos motores (ação semelhante ao curare) (SILVA JR. & BUCARETCHI, 2003).

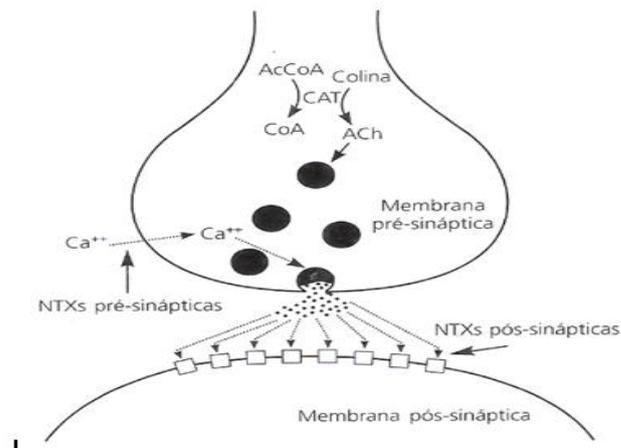


Figura 06: Mecanismo de ação do veneno da *Micrurus sp.* Junção neuromuscular e sítio de ação do veneno neurotóxico. Fonte: SILVA JR. & BUCARETCHI, 2003.

Devido à grande seletividade das neurotoxinas presente nos venenos de algumas serpentes, diversos estudos têm avaliado o perfil farmacológico desses compostos em modelos experimentais de dor (MORTARI & FERREIRA, 2007). Estudos de eletroforese, imun química e cromatografia de venenos de *Micrurus* têm mostrado a presença de componentes com perfil semelhante ao de outras toxinas elapídicas (CECCHINI et al., 2005) que já tiveram sua atividade antinociceptiva comprovada (CHEN et al., 2006). Com base nessa constatação, na ausência de dor na sintomatologia e na observação de que a administração intraplantar de venenos isolados de serpentes do gênero *Micrurus* induz alterações inflamatórias e significativo edema sem a indução de hiperalgesia em ratos (CASAI-SILVA, 2001), sugere-se a presença de um constituinte antinociceptivo no mesmo. Para investigar a hipótese de uma atividade antinociceptiva no veneno de *Micrurus lemniscatus*, avaliamos seus efeitos em modelos experimentais de dor, promovendo sua caracterização farmacológica e avaliando seu mecanismo de ação. Os resultados desse estudo sugerem o potencial desse veneno para o desenvolvimento de um zoterápico de ação analgésica como nova alternativa para o controle da dor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antinociceptiva do veneno de *Micrurus lemniscatus* em modelos experimentais de dor.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* no teste de contorções abdominais e formalina em camundongos;
- Caracterizar o efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* no teste de retirada da cauda em camundongos;
- Avaliar o efeito do veneno na função motora dos camundongos;
- Investigar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do veneno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss pesando entre 18 e 22g, fornecidos pelo CPqGM/Fiocruz. Os animais foram mantidos no biotério experimental em sala aclimatizada, ciclo claro/escuro de 12h, com água e alimentação *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética do CPqGM sob o nº L-IGM-012/09. O número de animais e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Todos os experimentos com os animais foram realizados entre 8h e 17h e respeitaram o protocolo estabelecido pela IASP para uso de animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983).

3.2 Obtenção do veneno de *Micrurus lemniscatus*

O veneno extraído da serpente *Micrurus lemniscatus*, proveniente da cidade de Salvador, foi cedido pelo NEVA (EBMSP, Salvador – BA), onde as serpentes eram mantidas em serpentário, após passarem pela quarentena. O veneno foi coletado pela pressão manual das glândulas e, em seguida, seco à vácuo, pesado em balança analítica e estocado a -20°C até o momento de diluição e uso.

3.3 Avaliação do efeito antinociceptivo

3.3.1 Teste de contorções abdominais

Utilizamos o teste de contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0,8% (0,1mL/10g de peso) em camundongo (COLLIER et al., 1968). Esse teste é amplamente utilizado como “screening” para a identificação de novos compostos analgésicos. A reação avaliada foi à contração do músculo abdominal juntamente com a extensão das patas traseiras, caracterizando a contorção abdominal (Figura 07). A intensidade de nocicepção foi quantificada pelo número de contorções abdominais durante os 30 minutos seguintes ao estímulo. Durante o tempo de observação os animais foram mantidos em um microisolador invertido. A

indometacina (10 mg/kg, i.p. – NONATO et al., 2009), administrada 30 minutos antes do estímulo, foi utilizada como fármaco de referência. A atividade antinociceptiva foi determinada pela capacidade de inibir as contorções abdominais em relação aos camundongos tratados com o veículo (grupo controle).



Figura 07: Padrão das contorções abdominais - a rotação do corpo com extensão das patas traseiras. Fonte: Roman (2004).

3.3.2 Teste de formalina

Os camundongos foram colocados em funis de vidro (23,5cm de diâmetro) durante 5 minutos antes do teste para a ambientação. Em seguida, foram removidos para a administração intraplantar (20 μ L) de formalina a 2,5% no dorso da pata traseira direita. Após a administração, os animais foram colocados novamente nos funis de observação por um período de 30 minutos. Esses 30 minutos foram divididos segundo as duas fases distintas do teste da formalina: 0-10 minutos, a fase inicial (denominada neurogênica, é o resultado da estimulação direta de nociceptores) e 10-30 minutos, a fase tardia (denominada inflamatória, é causada pela inflamação local, com liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR et al, 1986 apud COSTA-E-SOUSA et al., 2010; SOUSA et al., 2008 apud CARVALHO, 2011). O parâmetro nociceptivo considerado foi o tempo em que o animal passou lambendo ou mordendo a pata direita traseira, registrado com cronômetro em segundos (Figura 08) (DUBUISSON & DENNIS, 1977 – modificado). A morfina (5 mg/kg, s.c. – NONATO et al., 2009), administrada 40 minutos antes do estímulo, foi utilizada como fármaco de referência.



Figura 08: Teste de formalina. Avaliação da nocicepção através da lambida ou mordida da pata estimulada. Fonte: Acervo pessoal.

3.3.3 Teste da retirada da cauda

O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste de retirada da cauda descrito por D'amour & Smith (1941), modificado para camundongos, método amplamente utilizado para avaliar analgésicos de ação central (ROMAN, 2004). Antes do início dos experimentos, os camundongos foram habituados aos cilindros de contenção durante 5 dias consecutivos (20 minutos por dia). Para medir a latência de retirada da cauda, os camundongos foram colocados nos cilindros de contenção e a ponta da cauda (2 cm da extremidade) foi imersa em um banho de água à $48^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (estímulo térmico nociceptivo) (Figura 09). Foi considerada resposta positiva o movimento brusco de retirada da cauda, isto é, movimento reflexo de origem espinal rápido e vigoroso. Um tempo de corte de 10 segundos foi estabelecido para minimizar a probabilidade de dano na pele. Antes do dia do experimento, latências de retirada da cauda foram medidas para a estabilização e determinação do basal. No dia do experimento, o limiar nociceptivo foi avaliado em diferentes tempos após a administração das drogas. A morfina (5 mg/kg, s.c.), administrada 40 minutos antes do estímulo, foi utilizada como fármaco de referência. A atividade antinociceptiva foi quantificada pelo aumento do Índice de Antinocicepção, calculado pela aplicação da fórmula abaixo:

$$IA = \frac{(\text{latência do teste} - \text{latência basal})}{10 - \text{latência basal}} \times 100$$

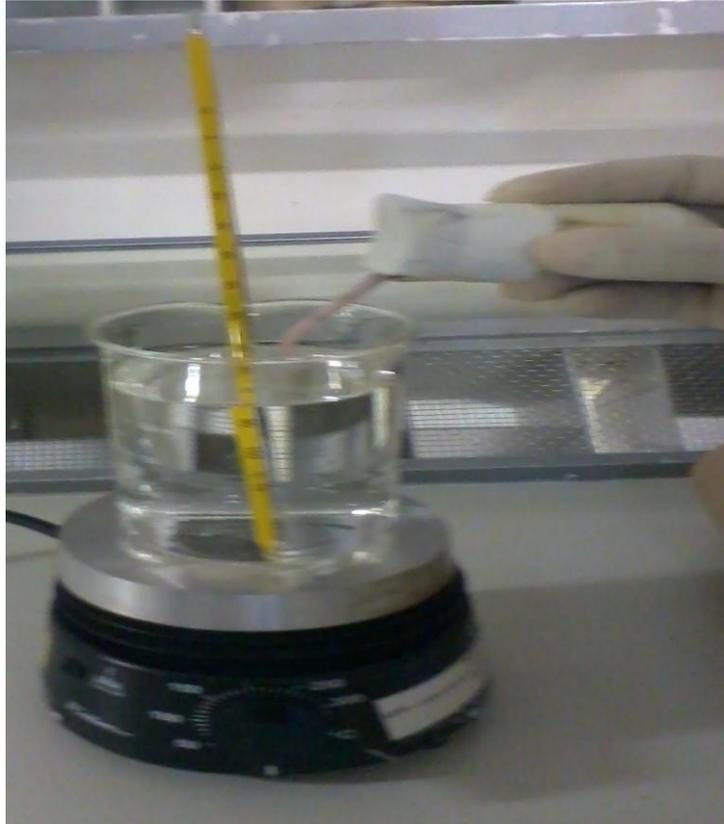


Figura 09: Aparato para a realização do teste de retirada da cauda. Fonte: Acervo pessoal.

3.4 Avaliação da função motora

Considerando que os testes nociceptivos utilizados avaliam respostas motoras, o efeito do veneno sobre a função motora foi avaliado com o objetivo de validar o efeito antinociceptivo sugerido pelos testes comportamentais.

3.4.1 Teste de rota-rod

O aparelho de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) consiste de uma barra horizontal rugosa de 3 cm de diâmetro, localizada a 25 cm da superfície, subdividida em cinco compartimentos e que gira à velocidade constante (Figura 10). Para manter-se no cilindro o animal necessita se locomover, sendo a capacidade alterada de permanência no aparelho indicativo de prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. No dia anterior ao teste, os animais foram selecionados com base no tempo de permanência – no mínimo, 3 minutos - na barra em três tentativas com o rota-rod a 6 rpm. No dia do experimento, foi anotado o

tempo de permanência na barra em três tentativas (KURIBARA et al., 1977 - modificado). O diazepam (10 mg/kg, i.p., pré-tratamento de 30 minutos – NONATO et al., 2009), um depressor do SNC que reduz o tempo de permanência dos animais no aparelho de rota-rod foi usado como parâmetro de comparação.

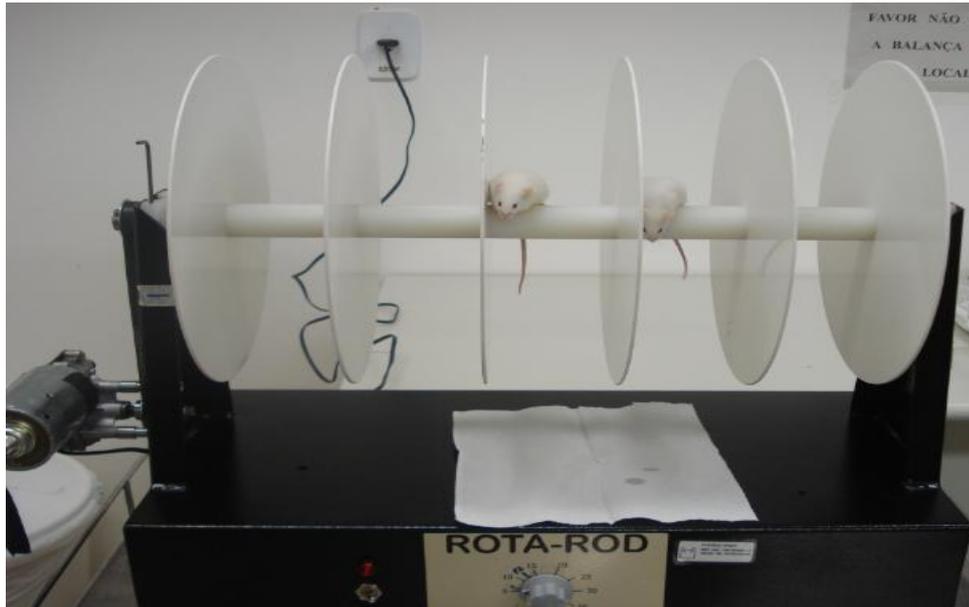


Figura 10: Aparelho rota-rod. Fonte: Acervo pessoal.

3.4.2 Teste de campo aberto

O teste do campo aberto avalia respostas comportamentais como atividade locomotora, hiperatividade e comportamento exploratório. O aparato de acrílico opaco mede 50 cm x 60 cm x 45 cm, com piso demarcado em 12 quadrados iguais (Figura 11). No momento do teste, o animal foi colocado em um dos cantos do aparato (todos os camundongos começaram o teste no mesmo quadrado) e o número de vezes, durante 3 minutos, em que ele cruzou os quadrados com as quatro patas foi registrado. Após cada teste com um camundongo, a caixa era devidamente limpa com álcool a 70%. Assim como no rota-rod, o diazepam foi utilizado como fármaco de referência (MACHADO et al., 2007).



Figura 11: Campo aberto. Fonte: Acervo pessoal.

3.5 Aquecimento do veneno

O veneno na dose de 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi submetido a uma temperatura de 100°C durante 5 minutos e em seguida administrado aos camundongos para avaliar o efeito do aquecimento sobre sua atividade antinociceptiva (ALVES, 2007).

3.6 Cálculo de DE_{50}

O cálculo de DE_{50} (dose da droga necessária para produzir metade do efeito máximo) foi feito no programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) a partir de quatro doses do veneno (59, 177, 533 e 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) utilizadas no teste de retirada da cauda.

3.7 Compostos e diluições

Foram utilizadas as seguintes drogas: Indometacina - Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), Diazepam - Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil), Morfina – Cristália (Itapira, São Paulo, Brasil), Naloxona – Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), CTOP – Tocris Bioscience (Bristol, UK), Nor-BNI – Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), Naltrindole – Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). O veneno de *Micrurus lemniscatus* foi extraído pelo Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP) e cedido pelo NEVA. A indometacina foi dissolvida em salina/Tris HCl 0,1M. O formol, o ácido

acético, o diazepam, a morfina, os antagonistas opióides e o veneno foram diluídos em salina. A concentração foi ajustada para que todas as doses pudessem ser administradas em um volume fixo de 200 μ L por animal. A administração por via oral foi realizada através da agulha de gavagem de aço inox reta 22GA, cânula de diâmetro 0,64mm com esfera de 1,25 mm e comprimento de 25 mm (Ciencor Scientific Ltda, Pompéia, São Paulo, Brasil).

3.8 Protocolo Experimental

Nos experimentos comportamentais foram realizadas curvas de dose-resposta empregando até quatro doses do veneno por via oral, diluídas em salina e com pré-tratamento de 1 hora. A escolha da via de administração e tempo de pré-tratamento se baseou nos melhores resultados encontrados em um projeto piloto com o veneno de *Micrurus lemniscatus*, no qual foi administrado em dois tempos de pré-tratamento (30 minutos e 1 hora) e em duas vias de administração (via intraperitoneal e via oral). Esse projeto piloto também permitiu um maior conhecimento a cerca da dose a ser utilizada no presente trabalho. Após a identificação da dose do veneno com efeito máximo no teste de retirada da cauda, avaliamos a possível reversão do efeito antinociceptivo pelo pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores opióides (naloxona) e antagonistas seletivos para receptores opióides tipo μ (CTOP), tipo k (nor-BNI), e tipo δ (naltrindole). As doses, vias utilizadas, tempo de pré-tratamento e diluição estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 01: Antagonistas opióides.

DROGA	Naloxona	CTOP	Nor-BNI	Naltrindole
AÇÃO	Antagonista de receptor opióide não-seletivo	Antagonista de receptor μ opióide	Antagonista de receptor k opióide	Antagonista de receptor δ opióide
DOSE	5 mg/kg	1 mg/kg	0,5 mg/kg	3 mg/kg
VIA DE ADMINISTRAÇÃO	i.p.	i.p.	s.c.	s.c.

TEMPO DE PRÉ-TRATAMENTO	15 minutos antes da morfina ou do veneno	30 minutos após a morfina ou do veneno	15 minutos antes da morfina ou do veneno	5 minutos antes da morfina ou do veneno
DILUIÇÃO	Salina	Salina	Salina	Salina
REFERÊNCIA	BISPO et al., 2000	LESSCHER et al., 2005	BACKHOUSE et al., 2008	NOZAKI et al., 2006

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo e analisados por one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os resultados do teste de retirada da cauda, com exceção do aquecimento do veneno, foram representados como média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo e analisados pelo teste de two-way Anova seguido pelo teste de Bonferroni. Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de contorções abdominais

O veneno administrado por via oral nas doses 19,7 µg/kg, 177 µg/kg e 1600 µg/kg diminui significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em comparação ao grupo controle tratado com salina ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente). Assim como esperado, a indometacina (10 mg/kg, i.p.), utilizada como padrão ouro, também diminui significativamente o número de contorções abdominais ($p \leq 0,01$) (Gráfico 01).

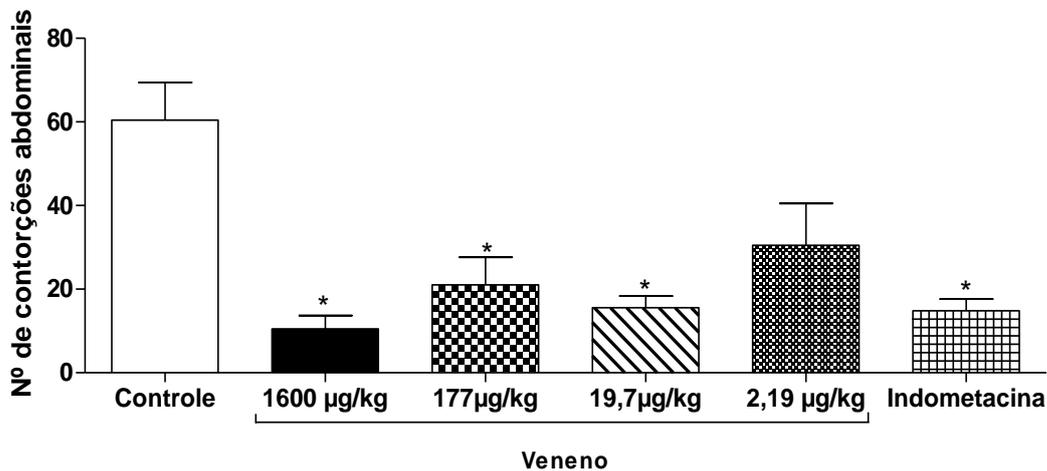


Gráfico 01: Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de contorções abdominais. Camundongos foram tratados com veneno (2,19 – 1600 µg/kg) ou salina (grupo controle) por via oral 1h antes da injeção do ácido acético. Indometacina (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes do estímulo nociceptivo. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.2 Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de formalina

O veneno administrado via oral (1600 µg/kg) diminuiu significativamente o tempo de lambida ou mordida da pata estimulada na fase neurogênica ($p \leq 0,001$) e na fase inflamatória ($p \leq 0,001$) do teste de formalina em comparação ao grupo controle, tratado com salina. Assim como esperado, a morfina (5 mg/kg, s.c.), utilizada com fármaco de referência, também inibiu significativamente as duas fases do teste de formalina ($p \leq 0,001$) (Gráfico 02). A dose de 177 µg/kg apresentou uma discreta inibição na fase tardia do teste ($p \leq 0,01$).

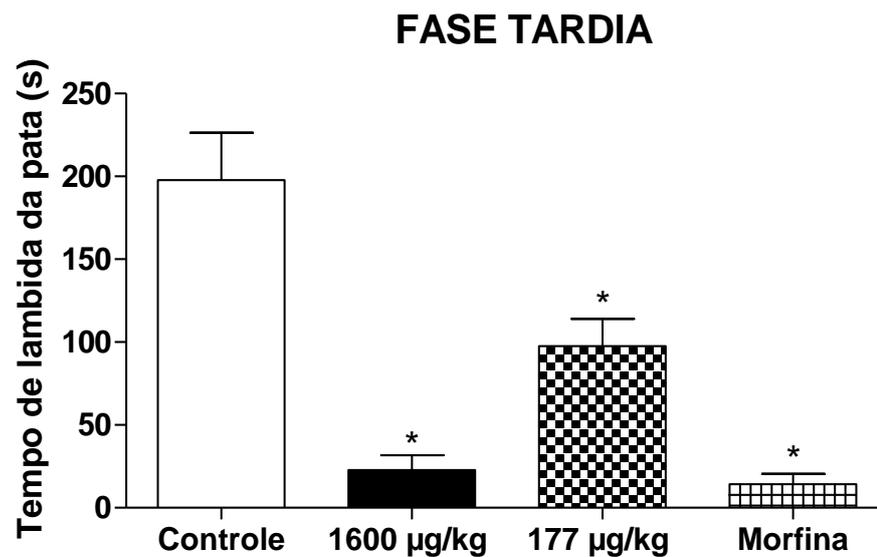
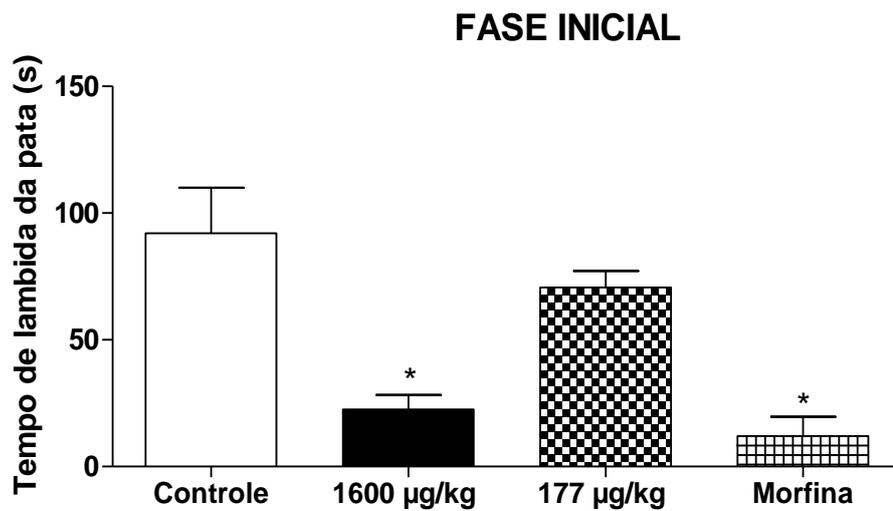


Gráfico 02: Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de formalina. Camundongos foram tratados com veneno (1600 e 177 µg/kg) ou salina (grupo controle) por via oral 1h antes da injeção da formalina. Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo nociceptivo. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.3 Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de retirada da cauda

O gráfico 03 representa o efeito induzido pela administração oral de salina ou veneno (59 – 1600 µg/kg) no teste de retirada da cauda. O veneno (177, 533 e 1600 µg/kg) aumentou significativamente e de modo dose dependente o limiar nociceptivo dos camundongos. O efeito antinociceptivo do veneno na dose de 1600 µg/kg foi significativo por até 5h e meia após sua administração. A morfina (5 mg/kg, s.c.), utilizada como droga de referência, produziu efeito antinociceptivo significativo por até 2 horas após sua administração. A antinocicepção induzida pelo veneno na dose de 1600 µg/kg foi significativamente maior que a da morfina em todos os tempos avaliados.

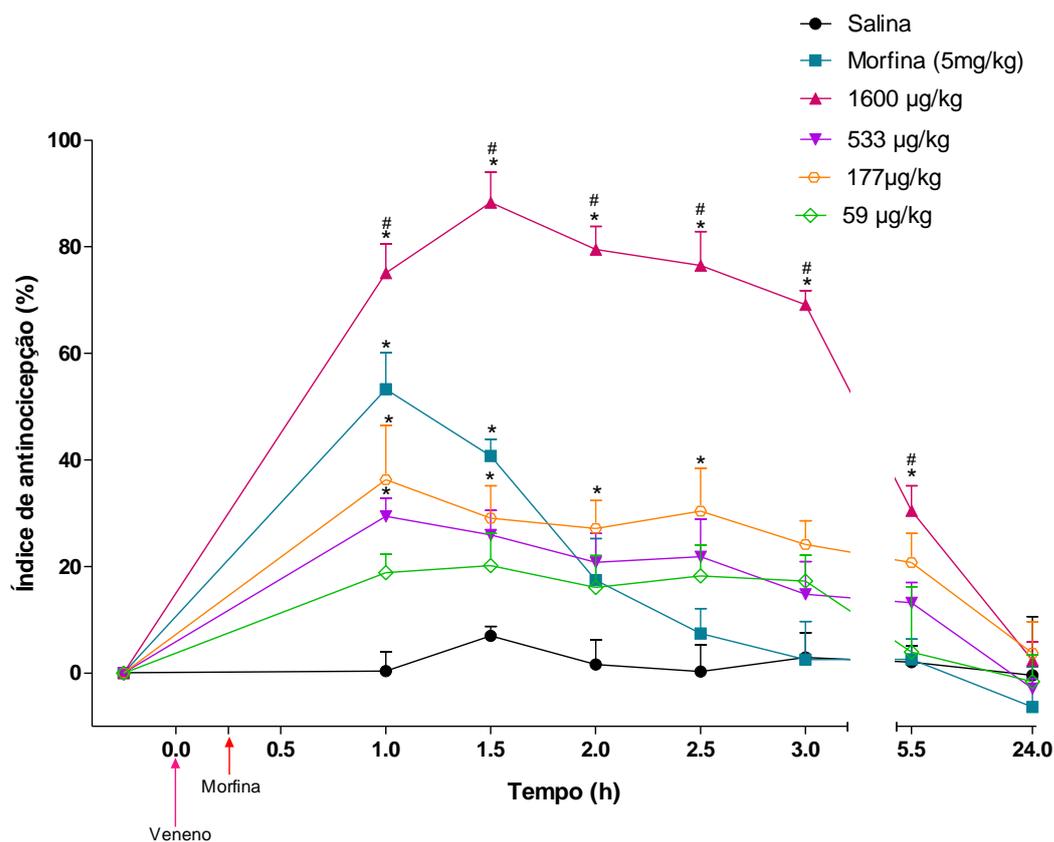


Gráfico 03: Efeito antinociceptivo do veneno de *M. lemniscatus* no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno (59 – 1600 µg/kg, tempo zero) ou salina (grupo controle, tempo zero) por via oral 1h antes do início do teste (seta rosa). Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo térmico nociceptivo (seta vermelha). Dados foram expressos como média \pm E.P.M; n = 6 camundongos por

grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$), # significância estatística em relação o grupo tratado com morfina ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.4 Efeito do veneno na coordenação motora dos animais no teste de rota-rod

A administração oral do veneno (1600 µg/kg) não alterou o tempo de permanência dos camundongos no aparelho de rota-rod, enquanto o grupo tratado com diazepam (10 mg/kg), utilizado como fármaco de referência, apresentou redução significativa do mesmo ($p \leq 0,001$). Esse resultado indica que o veneno não causa comprometimento motor e prejuízos neurológicos detectáveis nesse teste (Gráfico 04).

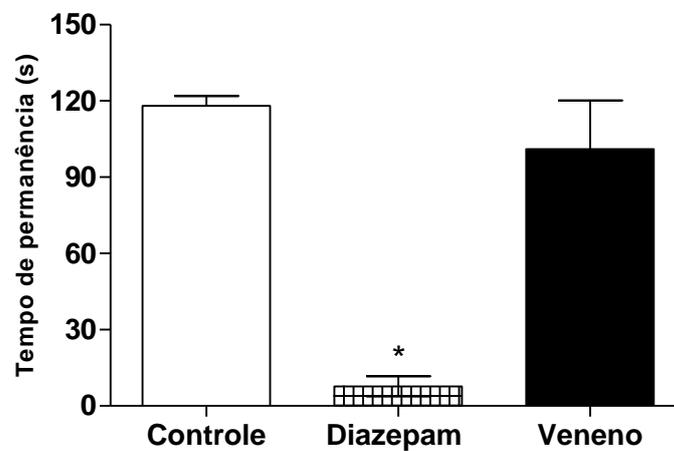


Gráfico 04: Efeito do veneno da *M. lemniscatus* no teste de rota-rod. Camundongos foram tratados com veneno (1600 µg/kg) ou salina (grupo controle) por via oral 1h antes do início do teste de rota-rod. Diazepam (10 mg/kg) foi utilizado como fármaco padrão, sendo administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do teste. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$), como determinado pelo teste de One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.5 Efeito do veneno na atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto

A administração oral do veneno (1600 µg/kg) não alterou de forma significativa o número de quadrados atravessados pelos camundongos em relação ao grupo controle, tratado com salina. Animais tratados com diazepam (10 mg/kg) apresentaram redução significativa desse número ($p \leq 0,001$). Esse resultado indica que o veneno não altera a capacidade exploratória e a locomoção espontânea dos camundongos (Gráfico 05).

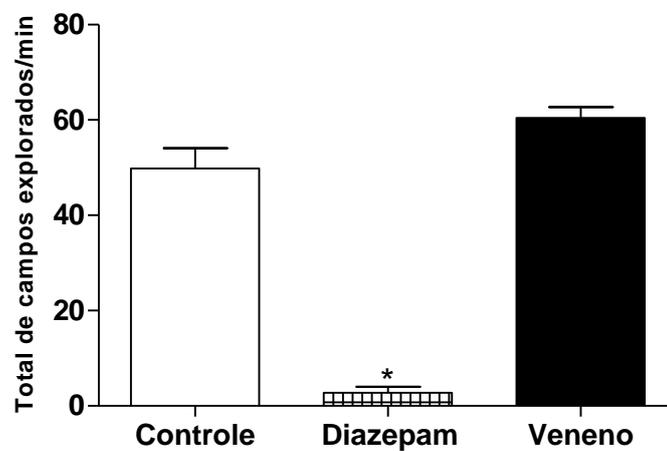


Gráfico 05: Efeito do veneno da *M. lemniscatus* no teste de campo aberto. Camundongos foram tratados com veneno (1600 µg/kg) ou salina (grupo controle) por via oral 1h do início do teste de campo aberto. Diazepam (10 mg/kg) foi utilizado como fármaco padrão, sendo administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do teste. Dados foram expressos como média ± E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$), como determinado pelo teste de One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.6 Efeito do bloqueio de receptores opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda

Com o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do veneno, foram verificados os efeitos dos antagonistas de receptores opióides nessa antinocicepção no teste de retirada da cauda. O pré-tratamento com naloxona, antagonista não seletivo de receptores opióides, preveniu completamente o efeito antinociceptivo do veneno por até 2h após sua administração. No entanto, após esse tempo a reversão da naloxona desapareceu e a antinocicepção do veneno foi significativa ($p \leq 0,01$). Como esperado, o efeito antinociceptivo da morfina foi prevenido pelo pré-tratamento com naloxona (Gráfico 06).

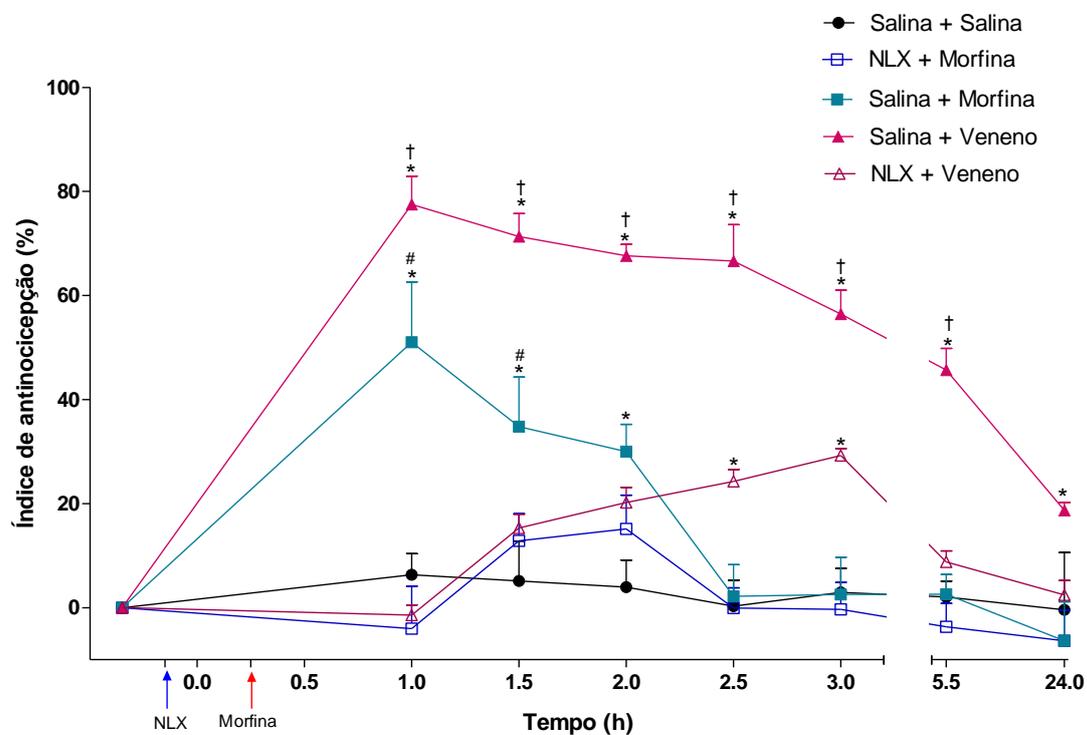


Gráfico 06: Efeito da naloxona na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno (1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tempo zero) ou salina (grupo controle, tempo zero) por via oral 1h antes do início do teste. Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo térmico nociceptivo (seta vermelha). Naloxona (NLX, 5 mg/kg), antagonista não seletivo de receptor opióide, foi administrada pela via intraperitoneal 15 minutos antes da administração do veneno ou da morfina ou da salina (seta azul). O limiar nociceptivo foi avaliado em intervalos de tempo pré-determinados após as administrações. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle; † significância estatística em relação ao grupo NLX + Veneno; # significância estatística em relação ao grupo NLX + Morfina ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.7 Efeito do bloqueio de receptores μ opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda

O pré-tratamento com CTOP, antagonista seletivo de receptores μ opióides, preveniu completamente o efeito antinociceptivo do veneno por até 2h após sua administração no teste de retirada da cauda. No entanto, após esse tempo o efeito do CTOP desapareceu e a antinocicepção do veneno foi significativa ($p \leq 0,01$). Como esperado, o efeito antinociceptivo da morfina foi prevenido pelo pré-tratamento com CTOP (Gráfico 07).

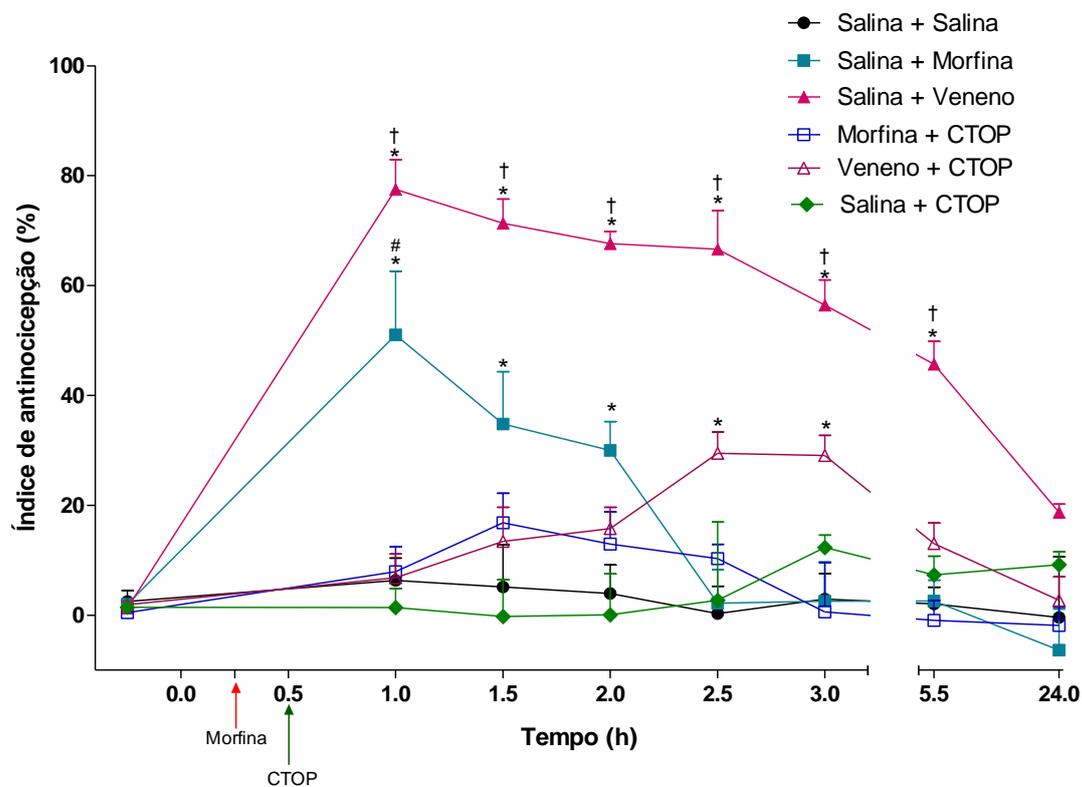


Gráfico 07: Efeito do CTOP na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno (1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tempo zero) ou salina (grupo controle, tempo zero) por via oral 1h antes do início do teste. Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo térmico nociceptivo (seta vermelha). CTOP (1 mg/kg), antagonista de receptor μ opióide, foi administrado pela via intraperitoneal 30 minutos após a administração do veneno ou da morfina ou da salina (seta verde). O limiar nociceptivo foi avaliado em intervalos de tempo pré-determinados após as administrações. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle; † significância estatística em relação ao grupo Veneno + CTOP; # significância estatística em relação ao grupo Morfina + CTOP ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.8 Efeito do bloqueio de receptores k opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda

O pré-tratamento com nor-BNI, antagonista seletivo para receptores k opióides, reduziu o efeito antinociceptivo do veneno e da morfina em todas as leituras realizadas após sua administração no teste de retirada da cauda ($p < 0,05$). Para que fosse possível avaliar o pico de ação do antagonista (que, segundo CAMPBELL et al. (2007) vai de 45 a 60 minutos) a primeira leitura do resultado foi antecipada para 30 minutos após a administração do veneno ou morfina (Gráfico 08).

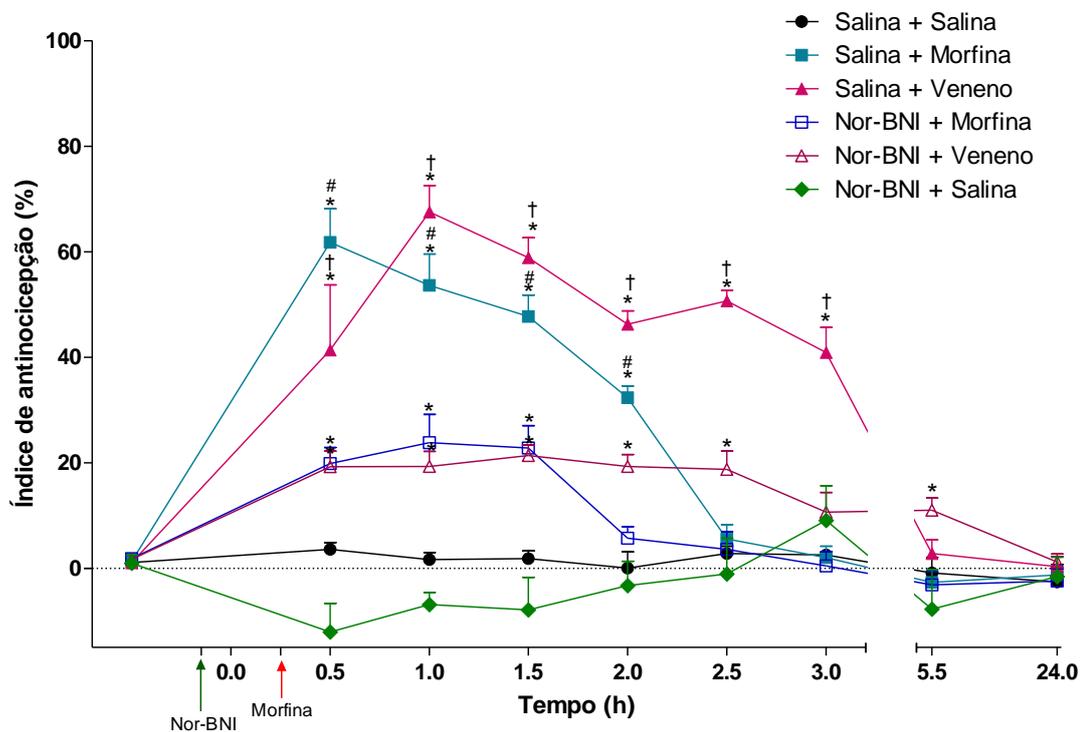


Gráfico 08: Efeito do nor-BNI na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno (1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tempo zero) ou salina (grupo controle, tempo zero) por via oral 1h antes do início do teste. Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo térmico nociceptivo (seta vermelha). Nor-BNI (0,5 mg/kg), antagonista de receptor k opióide, foi administrado pela via subcutânea 15 minutos antes da administração do veneno ou da morfina ou da salina (seta verde). O limiar nociceptivo foi avaliado em intervalos de tempo pré-determinados após as administrações. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle; † significância estatística em relação ao grupo Nor-BNI + Veneno; # significância estatística em relação ao grupo Nor-BNI + Morfina ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.9 Efeito do bloqueio de receptores δ opióides na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda

O pré-tratamento com naltrindole, antagonista seletivo para receptores δ opióides, reduziu o efeito antinociceptivo do veneno por até 1 hora e meia após sua administração no teste de retirada da cauda ($p < 0,05$). Entretanto, o bloqueio de receptores δ opióides não alterou a atividade antinociceptiva da morfina. Para que fosse possível avaliar o pico de ação do antagonista (que, segundo CAMPBELL et al. (2007), é em torno de meia hora após sua administração), a primeira leitura do resultado foi antecipada para 30 minutos após a administração do veneno ou morfina (Gráfico 09).

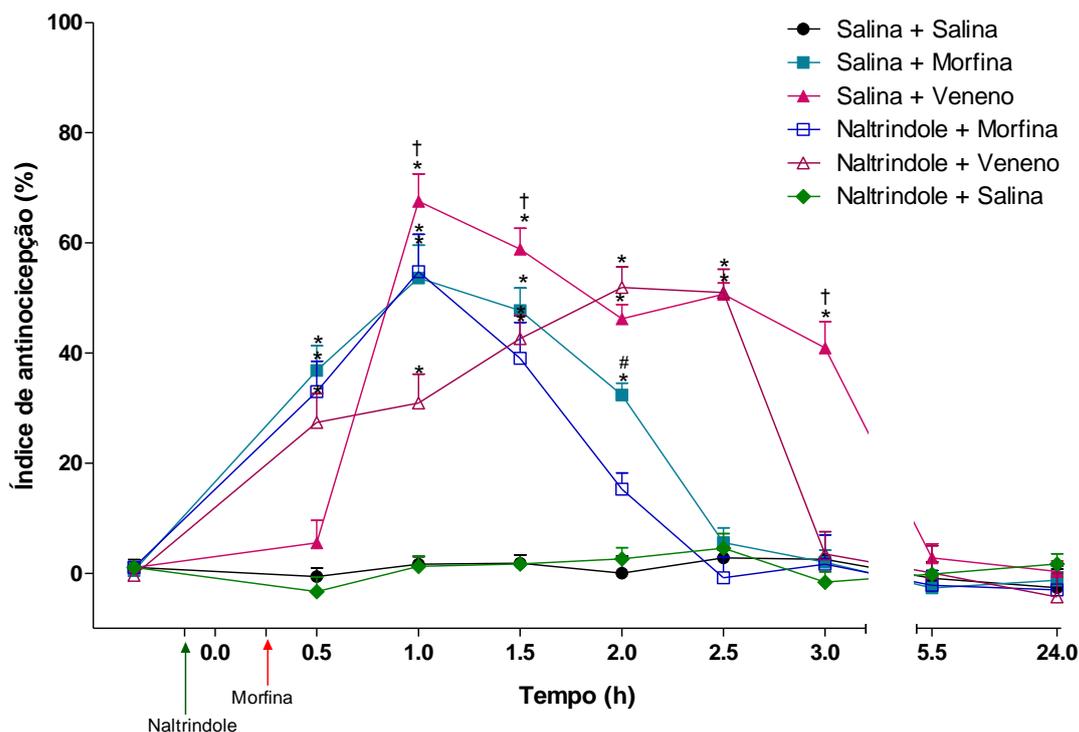


Gráfico 09: Efeito do naltrindole na atividade antinociceptiva do veneno no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno (1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tempo zero) ou salina (grupo controle, tempo zero) por via oral 1h antes do início do teste. Morfina (5 mg/kg) foi utilizada como fármaco padrão, sendo administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do estímulo térmico nociceptivo (seta vermelha). Naltrindole (3 mg/kg), antagonista de receptor δ opióide, foi administrado pela via subcutânea 5 minutos antes da administração do veneno ou da morfina ou da salina (seta verde). O limiar nociceptivo foi avaliado em intervalos de tempo pré-determinados após as administrações. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * significância

estatística em relação ao grupo controle; † significância estatística em relação ao grupo Naltrindole + Veneno; # significância estatística em relação ao grupo Naltrindole + Morfina ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.10 Efeito do aquecimento do veneno de *M. lemniscatus* no teste de retirada da cauda

Para obter indicações da natureza química do constituinte antinociceptivo do veneno, sua atividade antinociceptiva foi avaliada após um protocolo de aquecimento. O veneno aquecido não demonstrou atividade antinociceptiva quando comparado com o veneno não-aquecido no teste de retirada da cauda (Gráfico 10).

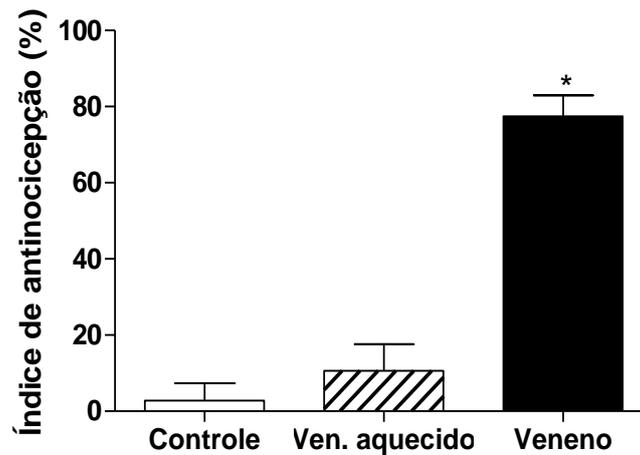


Gráfico 10: Efeito do aquecimento do veneno de *M. lemniscatus* sobre sua atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda. Camundongos foram tratados com veneno aquecido (1600 µg/kg) ou salina ou veneno (1600 µg/kg), 1h antes do início do teste de retirada da cauda. Dados foram expressos como média ± E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$), como determinado pelo teste de One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.11 Cálculo de DE₅₀

Tabela 02: Doses efetivas mediana (DE₅₀) do veneno de *M. lemniscatus* e morfina no teste de retirada da cauda:

Veneno	Morfina
0,6 (0,3 - 0,7) em mg/kg v.o.	3,9 (3,3 – 4,6) em mg/kg s.c. (GOMAA et al., 1990).

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm sido grande fonte de busca para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Devido a sua complexidade e riqueza em moléculas bioativas, os venenos têm um grande potencial como fonte de agentes terapêuticos, propriedade a ser explorada ao máximo (JIMÉNEZ & MUÑOZ, 2009). Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos (COSTA-LOTUFO et al., 2009). A utilização de toxinas e venenos ofídicos como analgésicos tem sido investigada em humanos e animais de laboratório em função das limitações das medicações disponíveis e da potência de suas propriedades farmacológicas (GIORGI, 1993; RAJENDRA et al., 2004). No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez, que o veneno bruto de *Micrurus lemniscatus*, coral-verdadeira, apresenta potente propriedade antinociceptiva. Esse efeito foi mais duradouro e mais potente que o efeito da morfina, analgésico considerado padrão ouro no desenvolvimento de novos fármacos. Em adição, demonstramos que esse efeito é mediado pelo sistema opióide, principalmente pelo receptor μ opióide.

No teste de contorções abdominais induzido pelo ácido acético em camundongos, a administração do veneno de *M. lemniscatus* demonstrou atividade antinociceptiva similar à da indometacina, fármaco utilizado como referência. Esse teste é amplamente utilizado como “screening” para novos analgésicos, pois avalia a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. O ácido acético produz uma resposta que depende da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, o que faz esse modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados mecanismos de ação (PERAZA et al., 2007). Porém, apesar da boa sensibilidade, é um teste pouco específico (PERAZA et al., 2007), pois é sensível também à substâncias não analgésicas, como sedativos e miorrelaxantes. Por isso, no presente trabalho, para confirmar a atividade antinociceptiva do veneno, seu efeito foi avaliado no teste da formalina. O veneno de *Micrurus lemniscatus* reduziu significativamente o comportamento nociceptivo nas duas fases da formalina, e esse efeito foi equivalente ao efeito da morfina, utilizada como analgésico padrão. O ensaio da formalina é considerado um modelo experimental de dor com duas fases distintas. As fases inicial e tardia do teste da formalina têm propriedades

diferentes e conseqüentemente este teste é útil não somente para avaliar substâncias antinociceptivas, mas também para indicar possíveis mecanismos envolvidos (SHIBATA et al., 1989 apud PEREIRA, 2005). A inibição da primeira e da segunda fase é obtida pelos analgésicos de ação central, como os opióides, e por alguns agonistas das vias descendentes; a inibição apenas da segunda fase é obtida com analgésicos- antiinflamatórios como os AINEs (HENRY et al., 1999). Manning & Frankling (1998) sugeriram que a substância cinzenta periaquedutal e a área posterior do hipotálamo são os prováveis sítios de ação da morfina no controle da nocicepção no teste de formalina (LIMA JÚNIOR, 2005), além do bloqueio ao nível periférico. Dessa forma, é possível que o veneno de *Micrurus lemniscatus* possua atividade antinociceptiva por ação no SNC já que o mesmo teve ação nas duas fases do teste de formalina.

Para confirmar essa hipótese, o efeito do veneno foi avaliado no teste de retirada da cauda. Esse teste é considerado um reflexo espinal, mas também pode envolver estruturas neurais superiores e, portanto, identifica principalmente analgésicos de ação central (JENSEN & YAKSH, 1986; LE BARS et al., 2001). A administração oral do veneno produziu efeito antinociceptivo dose dependente, que persistiu por mais de cinco horas após sua administração quando avaliado neste teste. O tempo de ação da morfina está de acordo com o encontrado na literatura, para esse teste, que é de cerca de 2 horas (GOZZANI, 1994). O valor de DE50 se correlaciona com a potência da droga para uma dada resposta, sendo que quanto menor o DE50, maior é a potência. Nossos resultados mostram que o DE50 do veneno foi menor que o descrito para a morfina; indicando que o veneno é mais potente que a morfina no teste de retirada da cauda. Além disso, o efeito máximo produzido pelo veneno foi superior ao da morfina, indicando que ele apresenta maior eficácia que esse analgésico padrão. Eficácia, potência e duração são importantes parâmetros farmacológicos considerados no desenvolvimento de novos fármacos. O presente estudo mostrou que o veneno de *Micrurus lemniscatus* é mais potente, mais eficaz e tem atividade mais duradoura que a morfina, indicando que apresenta grande potencial para o desenvolvimento farmacêutico de analgésicos.

Para descartar a hipótese de que algum prejuízo na resposta motora ou comprometimento neurológico seria responsável pela ausência de resposta nos testes nociceptivos após a administração do veneno, seus efeitos sobre a função motora foram avaliados. Nossos resultados mostraram que o veneno não induz

comprometimento na coordenação motora no teste de rota-rod, nem na capacidade exploratória e locomoção espontânea no teste de campo aberto. Esses resultados validam a especificidade da antinocicepção sugerida pelos testes nociceptivos. Do mesmo modo, ainda validando a seletividade da atividade antinociceptiva do veneno, a utilização da via oral descarta a possibilidade de comprometimento neurológico, uma vez que esta via não permite o envenenamento, pois as mucosas intactas do trato gastrointestinal constituem uma barreira poderosa à absorção das toxinas dos venenos sem interferir com a absorção do fator analgésico (PICOLO, 2003). Por esse fato, também podemos descartar a possibilidade de uma toxicidade aguda causada pelo veneno de *Micrurus lemniscatus* já que pela via oral este veneno torna-se inativo sobre esse parâmetro.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o veneno bruto de *Micrurus lemniscatus* apresenta potente propriedade antinociceptiva, possivelmente mediada por ação central. De fato, constituintes analgésicos de ação central já foram descritos em outros venenos de serpentes, como relatados a seguir:

- *Naja naja atra*: induz resposta antinociceptiva, através da cobrotoxina, em camundongos mediada por neurônios colinérgicos de ação central no teste de retirada da cauda (CHEN & ROBINSON, 1990 apud RAJENDRA et al., 2004; CHEN et al., 2006).
- *Ophiophagus hannah*: foi isolado um composto antinociceptivo, a hannalgesina, com efeito dose-dependente quando administrado pelas vias intraperitoneal, oral ou intracerebroventricular, e testadas pelo teste da placa quente. Seu mecanismo de ação está relacionado com a ativação de receptor opióide e liberação de óxido nítrico (PU et al., 1995; JIMÉNEZ & MUÑOZ, 2009).
- *Naja kaouthia*: foi isolada a cobratoxina (CTX), uma alfa-neurotoxina de cadeia longa. Sua atividade é independente das vias opióides, mas o sistema colinérgico parece estar envolvido (CHEN et al., 2006).
- *Vipera russeli*: demonstrou ter no seu veneno um efeito antinociceptivo pelo método das contorções abdominais, porém também causou alterações comportamentais associadas, o que provocou críticas no seu uso. Seu mecanismo de ação não está definido (DUTTA & CHAUDHURI, 1991).

- *Vipera xanthina palestinae*: já foi isolado um componente, que hoje se encontra disponível como peptídeo sintético (ZeP – 3) e será utilizado como analgésico de uso tópico, patentiado pela SIS Pharmaceuticals Ltd (SHULOV, 1999).
- *Crotalus durissus terrificus*: serpente cascavel sul-americana cujo veneno apresenta atividade antinociceptiva, em modelos experimentais de dor aguda e crônica, mediada por receptores opióides do tipo δ e/ou k e, pela liberação periférica de óxido nítrico e abertura de canais de K^+ dependentes de ATP. Foi isolado um peptídeo ativo do veneno crotálico responsável pelo efeito antinociceptivo, a crotalfina, e seu estudo está na fase clínica (KONNO et al., 2008).

O fator analgésico pode atuar em diferentes alvos neuronais, como: receptores, transportadores e canais iônicos em ambas as neurotransmissões excitatórias ou inibitórias (BELEBONI et al., 2004 apud MORTARI & FERREIRA, 2007; USHERWOOD, 2004 apud MORTARI & FERREIRA, 2007). O fato do veneno de *Micrurus lemniscatus* induzir efeito antinociceptivo no teste de retirada da cauda sugere um mecanismo de ação central, possivelmente pelo bloqueio da transmissão neural da dor, como fazem os analgésicos opióides. Considerando que o veneno de *Micrurus lemniscatus* atua sobre o SNC, investigamos a seguir a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do veneno. A naloxona, um antagonista não-seletivo de receptores opióides, preveniu completamente o efeito antinociceptivo do veneno. A naloxona tem início de ação rápido, possui meia-vida de até 90 minutos e duração de ação de aproximadamente uma hora e meia (NGAI et al., 1976 apud SERRA & ASHMAWI, 2010; KAUFMAN et al., 1981 apud SERRA & ASHMAWI, 2010). Esses dados estão de acordo com os resultados apresentados no presente estudo, pois a naloxona bloqueou a ação antinociceptiva do veneno por cerca de duas horas apenas.

Considerando que a atividade antinociceptiva foi revertida pelo bloqueio não-seletivo de receptores opióides, o(s) subtipo(s) de receptor(es) envolvido(s) foram então investigados. Antagonistas seletivos de receptores opióides do tipo μ , k ou δ reduziram o efeito antinociceptivo do veneno bruto de *M. lemniscatus*, entretanto, apenas o bloqueio do receptor μ aboliu completamente esse efeito. Diante desses resultados, podemos sugerir que o mecanismo de ação do veneno de *M.*

lemniscatus envolva um componente central mediado pelo sistema opióide, principalmente pelo receptor opióide tipo μ . No entanto, não podemos afirmar se a atividade antinociceptiva do veneno decorre da liberação de peptídeos opióides endógenos, de uma ação agonista em receptores opióides, ou se existe outro componente envolvido além desses.

Venenos de serpentes são compostos em sua maioria por uma grande variedade de proteínas, peptídeos e outras moléculas orgânicas e inorgânicas, com diversas atividades biológicas (CISCOTTO et al., 2011). No presente estudo, demonstramos que o componente do veneno responsável pela atividade antinociceptiva é sensível ao aquecimento, pois a administração oral do veneno aquecido, em idênticas condições experimentais, não induziu antinocicepção. Esse resultado indica que o constituinte analgésico do veneno provavelmente tem natureza peptídica. Esta hipótese está de acordo com os dados encontrados na literatura sobre a composição peptídica de neurotoxinas que tem sua atividade antinociceptiva já demonstrada em modelos animais (JIANG et al., 2008) e pelos exemplos dos venenos das serpentes citadas anteriormente.

Tem sido sugerido que os venenos das serpentes *Micrurus* são compostos, em sua maioria, pela família de proteínas: fosfolipase A_2 (PLA₂) e alfa-neurotoxinas (3FTx) (CISCOTTO et al., 2011). Essas proteínas poderiam ser responsáveis pela atividade antinociceptiva do veneno de *M. lemniscatus*, a exemplo do veneno da *Naja naja atra* que já tem sua atividade antinociceptiva comprovada e o peptídeo responsável por essa ação é denominado cobrotoxina, uma alfa-neurotoxina pós-sináptica de cadeia curta (CHEN et al., 2006). No entanto, também foram descritas a sequência N-terminal de quatro novas proteínas purificadas no veneno de *Micrurus lemniscatus* (CISCOTTO et al., 2011) e há provavelmente outras ainda não descritas. Vale ainda ressaltar que há diferenças na composição dos venenos de serpentes da espécie *Micrurus lemniscatus*, e essas diferenças podem ser responsáveis pela variedade de manifestações sistêmicas e locais do envenenamento por coral (TANAKA et al., 2010). Isso é corroborado por um relatório clínico recente, no qual se observou que um paciente do sexo masculino picado pela serpente *Micrurus lemniscatus helleri* apresentou sintomatologia incomum ao envenenamento por coral: uma severa dor local, ação neurotóxica lenta, trombocitopenia persistente e coagulopatia leve (MANOCK et al., 2008). Essa variação também é demonstrada pelo fato do antiveneno elapídico, comercialmente

disponível e preparado a partir de apenas duas espécies, não neutralizar totalmente ou de maneira eficaz venenos da *Micrurus lemniscatus*, indicando que o antiveneno não é capaz de reconhecer todas as toxinas encontradas em venenos de serpentes do gênero (TANAKA et al., 2010). Assim, a atividade antinociceptiva do veneno de *Micrurus lemniscatus* descrita nesse trabalho, pode decorrer da ação de constituintes já conhecidos ou ainda não descritos no veneno dessa serpente, mas os dados disponíveis até o presente momento não nos permitem aprofundar nessa hipótese. Estudos para investigar essa questão serão realizados em nosso laboratório.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que o veneno de *Micrurus lemniscatus*, em doses que não induzem alterações motoras nos teste de rota-rod e campo aberto, apresenta atividade antinociceptiva com componente central, mediado pelo sistema opióide, principalmente pelo receptor opióide tipo μ . Em função de sua grande potência e eficácia antinociceptiva, o veneno de *Micrurus lemniscatus* pode representar uma opção para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos. Entretanto, estudos adicionais sobre suas propriedades farmacológicas, mecanismo de ação e, sobretudo, o isolamento e caracterização de sua(s) molécula(s) biotativa(s) necessitam ainda ser realizados.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados analisados e apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- ✓ O veneno de *Micrurus lemniscatus* apresenta potente e duradoura atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor;
- ✓ A atividade antinociceptiva do veneno de *Micrurus lemniscatus* é mediada pelo sistema opióide e principalmente pelo receptor μ opióide;
- ✓ O veneno, na maior dose estudada (1600 μ g/kg) não causa comprometimento motor nos ensaios realizados.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, B., ZHAO, J., ASANTE, C. O., CENDAN, C. M., MARSH, S., MARTINEZ-BARBERA, J. P., NASSAR, M. A., DICKENSON, A. H., WOOD, J. N. The cell and molecular basis of mechanical, cold and inflammatory pain. **Science**, v. 321, p. 702 – 705, ago. 2008.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335 – 393, 2002.

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

ALVES, R. de M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BACKHOUSE, N., DELPORTE, C., APABLAZA, C., FARÍAS, M., GOÏTY, L., ARRAU, S., NEGRETE, R., CASTRO, C., MIRANDA, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 160-165, 2008.

BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999.

BELEBONI, R. O. et al. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal of Pharmacology*, [S.L], v. 493, p. 1-17, 2004. In: MORTARI, M. R., FERREIRA, L. B. Neurotoxinas: perspectivas para a descoberta de novos analgésicos. **Univ. Ci. Saúde, Brasília**, v.5, n.1/2, p. 155-167, 2007.

BÉRNILS, R. S. **Brazilian reptiles – List of species, 2010**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>>. Acesso em: 09 set. 2011.

BISPO, M. D., VILAR, J. C., MOURÃO, R. H. V., ANTONIOLLI, A. R., SOUZA, R. E. D. Avaliação da atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso de *Bumellia sartorium* Mart. **Biologia Geral e Experimental**, v. 1, n. 1, p. 36 – 41, 2000.

CAILLIET, R. **Dor: mecanismos e tratamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

CAMPBELL, V. C.; TAYLOR, R. E.; TIZABI, Y. Effects of selective opioid receptor antagonists on alcohol-induced and nicotine-induced antinociception. **Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 8, aug. 2007.

CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 27. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

CARVALHO, C., ALVES, N. C., MONTEIRO, A. C., PELÓGIA, N. C. C. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Agaricus blazei* Murill em ratos submetidos ao teste de formalina modificado. **Rev. Dor**, v. 12, n. 1, p. 50 – 53, 2011.

CARVALHO, W. A., LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 3, p. 221 – 239, mai-jun. 1998.

CASAI-SILVA, L. L. **Caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do veneno de duas espécies de *Micrurus* (Serpentes; Elapidae) do Estado da Bahia**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Fisiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CASAI-SILVA, L. L. **Estudo dos efeitos pró-inflamatórios induzidos pelo veneno bruto de *Micrurus lemniscatus* (Serpentes; Elapidae). Isolamento e caracterização biológica de uma fosfolipase A₂ (FLA₂)**. 2001. 208f. Tese (Doutorado em Ciências, área de Fisiologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52, p. 13 – 23, 1996.

CATERINA, M. J., LEFFLER, A., MALMBERG, A. B., MARTIN, W. J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K. R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A. I., JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p. 306 – 313, abr. 2000.

CECCHINI, A. L., MARCUSSI, S., SILVEIRA, L. B. et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 140 (parte A), p. 125 – 134, 2005.

CHEN, R., ROBINSON, S. E. The effect of cholinergic manipulations on the analgesic response to cobrotoxin in mice. **Life Science**, v. 47, n. 21, p. 1949 – 1954, 1990. In: RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1 – 17, 2004.

CHEN, Z. X., ZHANG, H. L., GU, Z. L., CHEN, B. W., HAN, R., REID, P. F., RAYMOND, L. N., QIN, Z. H. A long-form alfa-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. **Acta Pharmacologia Sinica**, v. 27, n. 4, p. 402-408, abr. 2006.

CHIPPAUX, J. P., WILLIAMS, V., WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279 – 1303, 1991.

CISCOTTO, P. H. C. et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **Journal of proteomics**, v. 74, p. 1810 – 1825, 2011.

COLLIER, H. O. J., DINNER, L. C., JOHNSON, C. A., SCHIENEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA-E-SOUSA, R. H., SILVEIRA, J. W. S., et al. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* Croizat (Euphorbiaceae). **Rev. Univ. Rural.**, v. 30, n.1, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V., WILKE, D. V., JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 703 – 716, 2009.

D'AMOUR, F. E., SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **The Biologic Research Laboratory**, University of Denver, jan. 1941.

DOL – DOR ON LINE. Compreendendo e Controlando a Dor Inflamatória. **Sobre a Dor – Compreendendo a Dor**. Disponível em <<http://www.dol.inf.br/Html/CompreendendoDor.html>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

DUBUISSON, D., DENIIS, S. G. Pain, v. 4, n. 2, p. 161 – 174, out. 1977.

DUTTA, A. S., CHAUDHURI, A. K. Neuropharmacological studies on the venom of *Vipera russeli*. **Indian J. Exp. Biol**, v. 29, n. 10, p. 937 – 942, 1991.

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

GIORGI, R. **Propriedade antinociceptiva do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* em camundongos**. 1993. 40f. Dissertação (Mestrado, área de Patologia Experimental e Comparada). Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

GOMMA, A. A., MOUSTAFA, S. A., MOHAMED, L. H., AHMED, H. N. Modification of morphine-induced analgesia, tolerance and dependence by bromocriptine. **Journal of Islamic Academy of Science**, v. 3, n. 1, p. 22 – 26, 1990.

GOZZANI, J. L. Opióides e antagonistas. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 44, n. 1, p.65 – 73, 1994.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Medicinas Nacionais, 2011.

HENRY, D., LIM, L. L. Y., GARCÍA-RODRIGUES, L. A. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **Britis. Med. J.**, v. 312, p. 1563 – 1566, 1996.

HENRY, J. L., YASHPAL, K., PITCHER, G. M., CODERRE, T. J. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**, v. 82, p. 57 – 63, 1999.

HOSKIN, P. J., HANKS, G. W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, v. 41, p. 326 – 344, 1991.

HUNSKAAR, S., BERGER, O. G., HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986. In: COSTA-E-SOUSA, R. H., SILVEIRA, J. W. S., et al. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcolico das folhas e galhos de *Croton sakaquinha* Croizat (Euphorbiaceae). **Rev. Univ. Rural.**, v. 30, n.1, 2010.

Instituto Vital Brazil. Disponível em: <<http://www.ivb.rj.gov.br/>>. Acesso em: 10 out. 2008.

Instituto Vital Brazil. Disponível em: <http://www.ivb.rj.gov.br/.../micrurus_4.html>. Acesso em: 10 set. 2008.

JENSEN, T. S., YAKSH, T. L. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial in rat. **Brain Research**, v. 363, p. 99-113, 1986.

JIANG, W. J., LIANG, Y. X., HAN, L. P., QIU, P. X., YUAN, J., ZHAO, S. J. Purification and characterization of a novel antinociceptive toxin from Cobra venom (*Naja naja atra*). **Toxicon**, v. 52, p. 638 – 646, 2008.

JIMÉNEZ, J. A. P., MUÑOZ, L. J. V. Toxinas de serpientes con alto potencial terapêutico y su uso en la biomedicina. **latreia**, v. 22, n. 4, dez. 2009.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. Acute pain: Mechanisms & Management. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992. In: SOUZA, A. H. **Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal da toxina Phalfa1beta isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* em roedores.** 2008. 146f. Tese (Doutorado em Ciências). Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

JULIUS, D., BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203 – 210, set. 2001.

JUNIOR, O. S. **Efeito antinociceptivo da dotarizina e flunarizina em camundongos.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Curso de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

KAUFMAN, R.D., GABATHULER, M. L., BELLVILLE, J. W. Potency, duration of action and pA2 in man of intravenous naloxone measured by reversal of morphine-depressed respiration. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 219, p. 156-162, 1981. In: SERRA, A. P.; ASHMAWI, H. A. Influência da naloxona e metisergida sobre o efeito analgésico do laser em baixa intensidade em modelo experimental de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n.3, p. 302 – 310, 2010.

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

KURIBARA, H., HIGUCHI, Y., TAKADORO, S. Effects of central depressants on rotarod and traction performances in mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 27, p. 117 - 126, 1977.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 628-651, 2001.

LESSCHER, H. M. B., HORDIJK, M., BONDAR, N. P., ALEKSEYENKO, O. V., BURBACH, J. P., REE, J. M. van, GERRITS, M. A. F. M. μ -opioid receptors are not involved in acute cocaine-induced locomotor activity nor in development of cocaine-induced behavioral sensitization in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 278 – 285, 2005.

LIMA JUNIOR, R. C. P. **Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos alfa e beta-amirina em modelos de nocicepção visceral em camundongos**. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2005.

LIRA-DA-SILVA, R. M., MISE, Y. F., CASAIS-E-SILVA, L. L., ULLOA, J., HAMDAN., B., BRAZIL., T. K. Serpentes de importância médica no nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOESER, J. D., BLACK, R. A taxonomy of pain. **Pain**, v. 1, p. 81 – 90, 1975. In: PERISSINOTTI, D. M. N. Compreendendo o processo doloroso. A dor como traição. **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, mai. 2002. Disponível em: <<http://www.cuidadospaliativos.com.br/artigo.php?cdTexto=26>>. Acesso em: 12 out. 2008.

MACHADO, D. G; KASTER, M. P.; BINFARÉ, R. W.; DIAS, M.; SANTOS, A. R. S; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molles* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 412 – 428, 2007.

MANOCK, S. R., SUAREZ, G., GRAHAM, D., AVILA-AQUERO, M. L., WARRELL, D. A. Neurotoxic envenoming by South America coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review, **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 11, p. 1127 – 1132, 2008.

MIGUEL Jr., A. **Fisiologia da Dor. Medicina prática – tudo sobre medicina**. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/neurotransmissores/>>. Acesso em: 5 out. 2011.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v. 66, p. 3474 – 3555, 2002.

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

MORTARI, M. R., FERREIRA, L. B. Neurotoxinas: perspectivas para a descoberta de novos analgésicos. **Univ. Ci. Saúde, Brasília**, v.5, n.1/2, p. 155-167, 2007.

NGAI, S.H., BERKOWITZ, B. A., YANG, J.C. et al. – Pharmacokinetics of naloxone in rat and man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology*, v. 44 p. 398-401, 1976. In: SERRA, A. P.; ASHMAWI, H. A. Influência da naloxona e metisergida sobre o efeito analgésico do laser em baixa intensidade em modelo experimental de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n. 3, p. 302 – 310, 2010.

NONATO, F. B., BARROS, T. A. A., LUCCHESI, A. M., OLIVEIRA, C. E. C., SANTOS, R. R., SOARES, M. B. P., VILLARREAL, C. F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 102 – 107, 2009.

NOZAKI, C., AKIYOSHI, S., KAMEI, J. Characterization of antinociceptive effects of oxycodone in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, p. 145 – 151, 2006.

PERAZA, G. G., RODRIGUES, S. T., MEDEIROS, S. H. L., MUCCILLO-BAISCH, A. N. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos de origem natural. **VITTALLE, Rio Grande**, v. 1, n. 19, p. 35 – 44, 2007.

PERISSINOTTI, D. M. N. Compreendendo o processo doloroso. A dor como traição. **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, maio. 2002. Disponível em: <<http://www.cuidadospaliativos.com.br/artigo.php?cdTexto=26>>. Acesso em: 12 out. 2008.

PEREIRA, F. S., RABELLO, G. D. Aspectos psicológicos envolvidos no processo de cronificação algica. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 32, n. 1, 2003.

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

PINHO, F. M. O., PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass Med Brasil**, v. 41, n. 1, p. 24-29, 2001.

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

PU, X. C., WONG, P. T., GOPALAKRISHNAKONE P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, p. 1425 – 1431, 1995.

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

REISINE, T., PASTERNAK, G. Opioid analgesics and antagonists. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GILMAN, A. G. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeuties, 9. ed., McGraw-Hill, New York, p. 521 – 555, 1996. In: RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1 – 17, 2004.

ROCHA, A. P. C., KRAYCHETE, D. C., LEMONICA, L., CARVALHO, L. R., BARROS, G. A. M., GARCIA, J. B. S., SAKATA, R. K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94 – 105, jan-fev, 2007.

ROMAN, A. A. R. S. **Participação do óxido nítrico no efeito sedativo e antinociceptivo dos agonistas alfa2-adrenérgicos**. 2004. 94f. Dissertação (Doutorado em Patologia Experimental). Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental do Departamento de Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

SÁ, K.; BAPTISTA, A. F., MATOS, M. A., LESSA, I. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, p. 498 - 506, 2008.

SERRA, A. P.; ASHMAWI, H. A. Influência da naloxona e metisergida sobre o efeito analgésico do laser em baixa intensidade em modelo experimental de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n.3, p. 302 – 310, 2010.

SHIBATA, M., OHKUDO, T., TAKAHASHI, H., INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic response. *Pain*, v. 38, p. 347 – 352, 1989. Loc cit: PEREIRA, M. A. S. **Estudo da atividade antinociceptiva da adenosina em camundongos - Análise do mecanismo de ação**. 2005. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SHULOV, A., PRIMOR, N. Analgesic from snake venom. **Free Patents OnLine**, 1999. Disponível em <<http://www.freepatentsonline.com/7208150.html>>. Acesso em 20 out. 2008.

SILVA JR., N. J., BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes, p. 99 – 107, 2003. In: CARDOSO, J. L. C et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 27. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

SINDRUP, S. H., JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neurophatic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**, v. 83, p. 389 – 400, 1999.

SOUSA, A. M., FRANCO, P. A., ASHMAWI, H. A. et al. Local effect of tramadol on formalin evoked flinching behavior in rats. **Rev. Bras. Anestesiol.**, v. 58, n. 4, p. 371 – 379, 2008. Loc cit: CARVALHO, C., ALVES, N. C., MONTEIRO, A. C., PELÓGIA, N. C. C. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Agaricus blazei Murill* em ratos submetidos ao teste de formalina modificado. **Rev. Dor**, v. 12, n. 1, p. 50 – 53, 2011.

SOUZA, A. H. **Avaliação da atividade antinociceptiva espinhal da toxina Phalfa1beta isolada do veneno da *Phoneutria nigriventer* em roedores**. 2008. 146f. Tese (Doutorado em Ciências). Curso de Pós-graduação em Farmacologia

Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

TANAKA, G. D, FURTADO, M. de F. D., PORTARO, F. C. V., SANT'ANNA, O. A., TAMBOURGI, D. V. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **Neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, mar. 2010.

USHERWOOD, P. N. R., BLAGBROUGH, I. S. Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L], v. 52, p. 245 - 268, 1991.

YENG, L. T., TEIXEIRA, M. J. Tratamento multidisciplinar dos doentes com dor crônica. **Prática Hospitalar**, ano VI, n. 35, set-out. 2004.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109 – 110, 1983.