UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE SERPENTE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE A TRANSECÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA FORMAÇÃO DO NEUROMA E CAPACIDADE DE INTERFERIR COM A CONDUTIVIDADE NERVOSA (DOR)

FRANCISCO DE SOUSA NOGUEIRA NETO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Botucatu – SP
Janeiro 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE SERPENTE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE A TRANSECÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA FORMAÇÃO DO NEUROMA E CAPACIDADE DE INTERFERIR COM A CONDUTIVIDADE NERVOSA (DOR)

FRANCISCO DE SOUSA NOGUEIRA NETO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Mello Nicoletti
Co-Orientador: Dr. Yara Cury

Botucatu – SP
Janeiro 2008

Nome do Autor: Francisco de Sousa Nogueira Neto

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE SERPENTE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE A TRANSECÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA FORMAÇÃO DO NEUROMA E CAPACIDADE DE INTERFERIR COM A CONDUTIVIDADE NERVOSA (DOR)

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Yara Cury

Presidente e Co-orientador

Laboratório de Fisiopatologia da dor

Instituto Butantan – São Paulo

Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Membro

Departamento de Bioquímica e Imunologia

UFMG – Belo Horizonte

Prof. Dr. Renée Laufer Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – Unesp - Botucatu

Data da Defesa: 11 de janeiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Me coloquei à pensar ,

em meus primeiros minutos de vida deveria ter sorrido ao invés de chorar.

Deus me foi muito amigo,

Uma família como esta, que preciosidade ter como pai e mãe estes dois exemplos de vida, que alegria poder compartilhar irmão e irmã de tamanho valor.

Ao nascer meus filhos, recebi uma das maiores confirmações de que a vida me queria bem, dois tesouros !

Ao caminhar pelo mundo, encontrei o que todos procuramos, amizade verdadeira com verdadeiros amigos.

Portanto, concluo que este trabalho não é meu.

Estas linhas são obra

de Deus,

de meus pais,

de meus filhos

de meus irmãos

de meus amigos

Parabéns e um imenso obrigado a todos vocês.

Reflexão

Esta noite tive um sonho.

Sonhei que caminhava pela praia acompanhado do senhor,

e na tela da noite estavam sendo retratados todos os meus dias.

Olhei para trás e percebi que, cada dia de minha vida era representado por uma pegada na areia, uma minha e outra de Deus.

Assim continuamos andando até que todos os meus dias se acabaram.

Reparei que em certos momentos, havia apenas uma marca na areia.

Sendo que esses dias coincidiam com os dias mais difíceis de minha vida, os dias de maior medo, de maior angústia, de maior dor.

Perguntei então a Deus, porque havia me abandonado nos meus piores dias.

E então, ele me respondeu,

Meu filho, não lhe abandonei.

Nos dias em que havia apenas uma pegada na areia...

...foram os dias em que lhe carreguei nos meus braços.

(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Elcio e Yvone, meus pais, falar de suas qualidades e exemplos é assumir o compromisso com a vida em escrever uma obra infinita.

Pedro e Henrique, meus filhos, meu coração e minha vida são de vocês. Que o vosso trilhar de vida seja alicerçado em muita força, garra, e honestidade. Que nós possamos juntos construir o mais belo dos caminhos, sempre nos lembrando que, muitos estão à espera de nossa ajuda. Contem comigo. Um beijo do papai.

Elcio e Adriane, meus irmãos, ter o mesmo sangue que vocês é uma honra. Tê-los ao meu lado uma alegria. Obrigado por tudo

Thiago, Ana Luisa e Letícia, meus sobrinhos, desejo à vocês muito sucesso nesta vida.

Aos meus avós, Lazinha, Nelina, Benedito e Francisco, agradeço por haverem me proporcionado meus queridos e amados pais.

Patrícia, Van Zan e Van Gutcha, obrigado por toda a dedicação, amizade, força, carinho e momentos de muita alegria. À vocês uma inestimável seqüência de obrigado. Vencer juntos é o grande segredo da vida.

Marú, desde minha chegada ofereceu infindável apoio e inesquecível colaboração.

Yara Cury, uma enciclopédia do saber, uma mente privilegiada capaz de transpor os limites, uma pesquisadora nata, capaz de construir história dentro da ciência. Parabéns e obrigado por tudo.

José Luiz de Mello Nicoletti, carinhosamente Nico. Gostaria de dizer-lhe que nossa relação se tornou um elo verdadeiro da mais profunda amizade. Você, é um exemplo de capacidade intelectual alinhada a um comportamento inigualável. Receba junto com a Neca, sua esposa, os agradecimentos deste seu amigo. Um grande abraço e o meu muito obrigado.

Renée, um dos grandes presentes que recebi durante esta caminhada. Exaltar suas qualidades seria relatar o que todos já sabem. Porém preciso reafirmar que, você é uma pérola que deu brilho à este estudo. Obrigado.

Laguna, um amigo de todas as horas, por toda a história que nos circunda deveríamos escrever um livro. Ressalto o que sempre digo, você é um marco na Medicina Veterinária de eqüinos. Um grande abraço.

Mário e Ingrid Ribeiro. Será inesquecível a acolhida que me propiciaram em Botucatu. A cada vez que acenderem a lareira, lembrem daquele que muito os estima. Muita saúde e paz.

Marinho, não tenho como agradecê-lo por todo o apoio recebido. Sucesso. Um grande abraço.

Rosana Landi, uma grande amiga, digitou os primeiros rascunhos deste trabalho numa época em que as idéias afloravam. Um super obrigado de um amigo que lhe quer muito bem.

Armem Thomassian, um amigo que muito estimo. Uma amizade que muito me orgulha. O meu muito obrigado pela oportunidade em desfrutar suas qualidades.

Gisele e Sandra, já receberam da vida o primeiro presente. Muita saúde e paz às pequenas.

Carina, uma maga na arte de conversar com o word, excel,e power point. Um super obrigado.

Renatinha, conheço seu valor e não tenho dúvidas de sua vitória.

Leandro e Wilson, um grande abraço à duas pessoas de imensas qualidades. Obrigado pela amizade.

Dr.Isaltino, saúdo o amigo, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. Receba um caloroso obrigado.

Juliana, Talma e Bianca, um super obrigado pelo carinho, hospitalidade e pela deliciosa convivência.

Marcela, fiel escudeira da professora Renée. Um mar de agradecimentos por toda a sua colaboração.

Dra. Ida Sano-Martins, agradeço pela acolhida e carinho com que fui recebido. Meus sinceros agradecimentos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia, Renata, Cristina, Luiz, Marcelo, Diva, e Sandrinha Tomi, o meu muito obrigado pelo estímulo recebido em todas as horas desta caminhada.

Flávio, Camila, Rosana, Bianca, Ingrid, Dulinho, Júnior, Jorge cito, Luciana e Barbara um grande abraço e obrigado pelos momentos de alegria.

Celso Thomaz Gasparini, um grande amigo e incentivador.

Stélio, meus agradecimentos sinceros por toda a engenharia montada para o envolvimento do Nico neste trabalho.

Aos professores Carlos Husnni e Ana Liz, os meus agradecimentos pelo apoio recebido e pela amizade demonstrada.

Aos professores Carlos Teixeira, Joaquim e Quaresma por nossas rodas de bate papo e encontros animados.

Aos professores Júlio, Noeme, Rogério e Mitiko, agradeço o carinho e atenção com que sou recebido.

Às professoras Scheila e Valéria, agradeço a atenção.

À Dra Regina Takahira, pela colaboração e ajuda. Pela atitude prestativa e amiga, o meu muito obrigado.

Dr. José Mario Paro, obrigado por tudo.

Dr. Josef Manasterski, uma amizade sincera e verdadeira.Um caloroso abraço.

Fábio e Paulo Rossi, grandes amigos e torcedores, o meu muito obrigado.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia, meus agradecimentos.

Aos funcionários das bibliotecas da Unesp-Botucatu, FMVZ-USP, ICB-USP, UNIFESP e Butantan pela colaboração

Francis, agradeço pela ajuda valorosa no início deste trabalho em conseguir as amostras solicitadas.

Homenagem à estes animais que proporcionam vida. Que destinam ao mundo a saúde proporcionada pela pesquisa. Heróis insubstituíveis. Escudeiros da vida. Minha saudação será sempre ínfima quando comparada às benéces que nos oferecem. Abençoado sejam os vossos trabalhos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade.

Ao Instituto Butantan, uma instituição cujo valor deve ser ressaltado em altos brados pela qualidade das pesquisas que produz.

À Vital Brazil, um gênio, um mago, um brasileiro que mostrou ao mundo a qualidade de nossas pesquisas. Um desbravador. Um arquiteto do intelecto. Minhas mais sinceras adjetivações a este nobre pesquisador. Receba um abraço onde estiver.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Serpente *Crotalus Durissus Terrificus*.....	3
2	Soluto crotálico.....	7
3	Bula sobre anavenenos.....	7
4	Nervo ciático íntegro observado imediatamente antes da transecção.....	31
5	Coto proximal e distal do nervo ciático transeccionado.....	31
6	Analgesímetro Ugo Basile®.....	33
7	Arena utilizada no Teste de Campo Aberto.....	34
8	Caracterização da hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático de ratos.....	39
9	Avaliação do efeito da anestesia inalatória por halotano sobre o limiar de dor dos animais.....	40
10	Efeito da crotoxina sobre a hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático.....	42
11	Efeito da crotoxina sobre a atividade motora dos ratos.....	44
12	Efeito da crotoxina através nos níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK).....	45
13	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 1^{o} dia após a cirurgia.....	47
14	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 3^{o} dia após a cirurgia.....	48
15	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 7^{o} dia após a cirurgia.....	49
16	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 14^{o} dia após a cirurgia.....	50
17	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 64^{o} dia após a cirurgia.....	51
18	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 3^{o} dia após a cirurgia.....	52
19	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 7^{o} dia após a cirurgia.....	53

Figura	Título	Página
20	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 14º dia após a cirurgia.....	54
21	Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 64º dia após a cirurgia.....	55
22	Efeito da metisergida na antinocicepção produzida pela crotoxina.	57
23	Efeito da naloxona na antinocicepção promovida pela crotoxina....	58
24	Efeito da ioimbina na antinocicepção promovida pela crotoxina.....	59
25	Efeito do atenolol na antinocicepção produzida pela crotoxina.....	60
26	Efeito do sulfato de atropina sobre a analgesia produzida pela crotoxina.....	61
27	Efeito do sulfato de atropina administrado 24 h após a cirurgia sobre a analgesia produzida pela crotoxina.....	62
28	Efeito da N-metil-atropina sobre a analgesia produzida pela crotoxina.....	63
29	Efeito do zileuton sobre a antinocicepção produzida pela crotoxina.....	64
30	Avaliação do envolvimento de medidores da via da cicloxigenase.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	receptor opióide *delta*
κ	receptor opióide *kappa*
μ	receptor opióide *mu*
α_1	receptor *alfa* 1 adrenérgico
α_2	receptor *alfa* 2 adrenérgico
AMPA	3',5' – α-amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol
AMP_c	3',5' – adenosina-monofosfato cíclico
CA	crotapotina
Cb	fosfolipase A_2
CCI	chronic constriction injury
Cdt	*Crotalus durissus terrificus*
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CK	creatinofosfoquinase
Ctx	crotoxina
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
ERKs	quinase reguladas por sinais extracelulares
FLA_2	fosfolipase A_2
GABA	àcido gama aminobutírico
GMP_C	guanosina monofosfato cíclico
IASP	Associação Internacional para Estudos da dor
i.c.v.	intra-cerebro-ventricular
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
i.p.	intraperitoneal
IP_3	inositol trifosfato
i.v.	intravenosa
JNK	Quinase N-terminal c-Jun
LXA_4	lipoxina A_4
MAPK	proteinoquinase ativada por mitógenos

mGLu	receptor metabotrópico para glutamato
NKA	neurocinina A
NKB	neurocinina B
N-metil	nitrato metil
NGF	fator de crescimento neural
NMDA	N_metil-D-aspartato
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PGE_2	prostaglandina E_2
PKA	proteinaquinase A
PKC	proteinaquinase C
PMN	polimorfonucleares
p.o.	via oral
PSL	particial sciatic nerve constriction
s.c.	via subcutânea
SIP	sympathetically independent pain
SMP	sympathetically maintened pain
SP	substância P
SNC	sistema nervoso central
VCdt	veneno de *Crotalus durissus terrificus*
v.o.	via oral
WDR	Wide dinamic range neurons

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... 1
ABSTRACT..... 2
1 INTRODUÇÃO..... 3
1.1 Efeito analgésico do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt)..... 6
1.2 Dor..... 10
1.2.1 Dor – Considerações gerais..... 10
1.2.3 Dor neuropática..... 20
1.3 Neuromas..... 21
1.4 Controle da dor neuropática..... 23
1.5 Modelos experimentais para indução de dor neuropática..... 25
2 OBJETIVOS..... 27
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 28
3.1 Animais..... 28
3.2 Obtenção da crotoxina (Ctx) 28
3.2.1 Análise Eletroforética em SDS-PAGE para comprovação da pureza da crotoxina..... 29
3.3 Planejamento geral..... 30
3.4 Transecção do nervo ciático de ratos..... 31
3.5 Análise histopatológica..... 31
3.6 Determinação da hiperalgesia mecânica..... 32
3.7 Avaliação da atividade geral dos animais..... 33
3.8 Dosagem de creatinoquinase..... 34
3.9 Tratamentos farmacológicos..... 35
3.10 Análise Estatística..... 37
4 RESULTADOS..... 38
4.1 Caracterização de hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático..... 38

4.2 Caracterização do efeito da crotoxina sobre a hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático de ratos..... 41
4.3 Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da crotoxina..... 43
4.3.1 Efeito da crotoxina sobre a atividade geral dos ratos submetidos à transecção do nervo ciático..... 44
4.3.2 Efeito da crotoxina sobre os níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK)..... 45
4.4 Análise histopatológica dos órgãos..... 46
4.4.1 Análise histopatológica dos cotos do nervo ciático submetidos à transecção..... 46
4.5 Caracterização dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina..... 56
4.5.1 Avaliação do envolvimento de receptores serotoninérgicos..... 57
4.5.2 Avaliação do envolvimento de receptores opióides..... 58
4.5.3 Avaliação do envolvimento de receptores adrenérgicos.. 59
4.5.3.1 Estudo da participação de receptores α-adrenérgicos..... 59
4.5.3.2 Avaliação do envolvimento de receptores β-adrenérgicos..... 60
4.5.4 Avaliação do envolvimento de receptores muscarínicos. 61
4.5.5 Avaliação do envolvimento de mediadores derivados da via da 5-lipoxigenase..... 64
4.5.6 Avaliação do envolvimento de mediadores derivados da via da cicloxigenase..... 65
5 DISCUSSÃO..... 66
6 CONCLUSÕES..... 81
7 BIBLIOGRAFIA..... 82
8 TRABALHO CIENTÍFICO..... 100

NOGUEIRA-NETO, F.S. **Avaliação dos efeitos da crotoxina isolada do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre a transecção do nervo ciático de ratos: avaliação histológica da formação do neuroma e capacidade de interferir com a condutividade nervosa (dor).** Botucatu, 2007. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A crotoxina, uma neurotoxina isolada do veneno de serpente Crotalus durissus terrificus, apresenta efeito antiinflamatório, imunomodulador e analgésico. Neste trabalho, o efeito da crotoxina sobre o desenvolvimento do neuroma e dor neuropática foi investigado. Para a indução da lesão nervosa, o nervo ciático de ratos foi submetido à transecção e remoção de um fragmento de 0,5 cm. Para avaliação da hiperalgesia foi utilizado o teste de pressão de pata. A formação do neuroma foi determinada por estudos histopatológicos. A hiperalgesia foi detectada 2 h após a cirurgia persistindo por 64 dias. O grupo controle desenvolveu neuroma no coto proximal do nervo transeccionado, a partir do 7^{o} dia, sendo que 80 % dos animais apresentaram neuromas ao final do experimento (64^{o} dia). A crotoxina aplicada nos cotos proximais e distais imediatamente após a transecção do nervo promoveu o bloqueio da hiperalgesia. O efeito analgésico foi observado 2 h após a administração da crotoxina, persistindo por 64 dias. A analgesia induzida pela crotoxina foi bloqueada pela administração de atropina e pela administração de zileuton, e inibida parcialmente pela administração de ioimbina e metisergida. Estudos histopatológicos mostram que a crotoxina retarda em 7 dias o desenvolvimento do neuroma. Estes resultados demonstram que a crotoxina promove analgesia de longa duração e retarda o desenvolvimento do neuroma. O efeito analgésico da crotoxina neste modelo de dor neuropática é mediado por ativação de receptores muscarínicos centrais e parcialmente, por receptores α-adrenérgicos e serotoninérgicos. Mediadores lipídicos derivados da via da 5-lipoxigenase, participam da modulação destes efeitos.

Palavras-chave: Crotoxina, analgesia, neuroma, dor neuropática, receptor muscarínico, inibidores da lipoxigenase, *Crotalus durissus terrificus*.

NOGUEIRA-NETO, F.S. **Study of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in rats following sciatic nerve transection: histopathological study of neuroma development and neuropathic pain inhibition.** Botucatu, 2007. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Crotoxin (CTX), a neurotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom(CdtV) induces analgesia, anti-inflammatory and immunomodulation effects. However, CTX effects on neuropathic pain have never been showed. For induction of neuropathic pain, the sciatic nerve of male Wistar rats was transected in two locations at the mid-thigh level and 0.5 cm of the nerve was removed. Pain-related behavior and development of neuromas were analyzed over a 64-day period after surgery. The rat paw pressure test was used for hyperalgesia evaluation. The presence of neuromas was determined by histological analysis of the nerves. Hyperalgesia was detected 2 h after surgery and persisted for 64 days. Control group showed neuromas until day 7, however 80% of the rats presented neuromas on day 64. CTX applied to the proximal and distal nerve stumps, immediately after nerve transection, blocked hyperalgesia. The analgesic effect was observed 2 h after CTX treatment and persisted for 64 days. CTX-induced analgesia was blocked by administration of atropine and administration of zileuton and partially inhibited by yohimbine and methysergide. Histological analysis showed that CTX delays for about 7 days the development of neuromas. The results indicate that CTX induces a long-lasting analgesic effect on neuropathic pain of transected sciatic nerve and inhibits the development of the neuropathy. The analgesic effect is mediated by central muscarinic receptors and partially by α-adrenoceptors and serotonergic receptors. 5-lipoxygenase lipidic mediators are involved in this modulation.

Key Words: Crotoxin, analgesia, neuroma, neuropathic pain, muscarinic receptors, *Crotalus durissus terrificus* venom

1 INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero Crotalus, popularmente conhecidas como cascavéis, são responsáveis por aproximadamente 10% do total de 20.000 acidentes ofídicos anuais que ocorrem no Brasil (SAÚDE, 1998). No estado de São Paulo (região de Ribeirão Preto e Botucatu), esta porcentagem aumenta para 25% (BARRAVIERA, 1990; CARDOSO et al., 2003). As cascavéis sul-americanas são representadas principalmente pela Crotalus durissus terrificus (HAAD, 1980; ROSENFELD, 1971). Estas serpentes recebem a denominação popular de “cascavel”, em virtude da existência de uma estrutura, na extremidade da cauda, que mimetiza um “guizo” ou “chocalho” (origem do latim cascabus = guizo ou chocalho). Esta estrutura tem como função a intimidação de animais de grande porte (CARDOSO et al., 2003; FONSECA, 1949). As cascavéis, também conhecidas como boicininga, maracabóia ou maracambóia, habitam campos abertos, regiões secas e pedregosas, sendo encontradas preferencialmente em cerrados e pastos. Exemplares desta espécie são encontrados em todo território brasileiro, com exceção da Floresta Amazônica, Mata Atlântica e regiões litorâneas. Entretanto, algumas espécies já foram encontradas nos campos da Amazônia (SAÚDE, 1998).



Figura 1- Serpente *Crotalus durissus terrificus*

O veneno das serpentes *Crotalus durissus terrifius* possui atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante *in vivo,* e considerável atividade hemolítica

in vitro (NAHAS et al., 1964; ROSENFELD, 1971). O veneno crotálico é constituído por inúmeras substâncias, cujos efeitos biológicos variam nos diferentes espécimes animais. Algumas destas substâncias foram isoladas e caracterizadas, e incluem as toxinas crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina (BRAZIL, 1972). Dentre as substâncias isoladas do veneno, destaca-se ainda, uma enzima tipo trombina (RAW et al., 1986), responsável provavelmente, pelos distúrbios da coagulação sangüínea. Tem sido sugerido que a giroxina e a enzima tipo trombina sejam o mesmo componente, uma vez que ambas apresentam as mesmas características bioquímicas e biológicas (ALEXANDER et al., 1988).

A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotoxina, seu principal componente tóxico (BRAZIL, 1972) a qual contribui com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total. A crotoxina foi isolada por Slotta & Fraenkel-Conrat, em 1938, e sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrat & Singer (1956). A crotoxina é uma β-neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A_2 (FLA_2 - CB). Seu peso molecular é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica e miotóxica (BRAZIL, 1972; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; STOCKER, 1990).

A subunidade CA (crotapotina) apresenta peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica. Foi demonstrado, através de estudos de caracterização e sequenciamento, que esta subunidade é formada por três cadeias polipeptídicas, com 88 aminoácidos, unidas por sete pontes dissulfídicas (AIRD et al., 1990). Sua função não está totalmente evidenciada, porém é aceito que CA pode agir como uma molécula carreadora, potencializando a atividade letal de CB, ao mesmo tempo em que diminui a atividade enzimática desta enzima, dentro do complexo crotoxina (BON, 1989; CHOUMET et al., 1996).

A subunidade CB ou FLA_2 apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7, sendo constituída por uma cadeia única polipeptídica contendo 123 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfídicas (AIRD et al., 1990). Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no veneno crotálico ou na fração

crotoxina. Esta fração possui maior atividade enzimática que o complexo crotoxina, porém menor toxicidade, uma vez que maiores doses de CB, comparada com crotoxina ou veneno, são necessárias para bloquear a transmissão neuromuscular (CHOUMET et al., 1996).

A crotoxina atua sobre o sistema nervoso periférico, bloqueando a transmissão na junção neuromuscular, por atuar principalmente na pré-sinápse (BRAZIL, 1972). Esta toxina provoca alterações na liberação de acetilcolina, em 3 fases: diminuição transitória inicial, seguida por uma facilitação e, por fim, inibição completa e irreversível da liberação de acetilcolina (BRAZIL, 1972; CHANG e LEE, 1977; HAWGOOD e SANTANA DE SA, 1979; HAWGOOD e SMITH, 1977).

A crotoxina exerce seu efeito por meio da associação da fração FLA_2 aos seus alvos nas membranas celulares, levando à dissociação do complexo, onde CA permanece em solução, enquanto CB interage com seus aceptores. Foram realizados estudos no intuito de compreender a ligação da crotoxina às membranas pré-sinápticas e esclarecer a participação da subunidade CA (DELOT e BON, 1993). Delot e colaboradores (1993) observaram que CA participa temporariamente da etapa na qual a CB se associa com seu aceptor na membrana, formando um complexo ternário transitório. A sub-unidade CA só se dissocia do complexo depois do acoplamento irreversível da unidade CB ao seu aceptor na membrana das terminações nervosas.

Foi demonstrado também que, em altas concentrações, a crotoxina pode atuar na membrana pós-sináptica, através da dessensibilização do receptor da acetilcolina (BRAZIL, 1972).

O diagnóstico clínico do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus* baseia-se, principalmente, na observação de manifestações sistêmicas decorrentes da atividade neurotóxica do veneno. Os sintomas do envenenamento caracterizam-se pelo aparecimento do chamado “fácies miastênico” ou “fácies neurotóxico”, onde se observam ptose palpebral, diplopia, olftalmoplegia, com dificuldade de acomodação visual, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos. Além disso, os pacientes relatam dores musculares generalizadas, urina escurecida, refletindo a eliminação de mioglobina, com manifestações evidentes de rabdomiólise,

decorrente da atividade miotóxica do veneno (AZEVEDO-MARQUES et al., 1990; ROSENFELD, 1971).

Apesar da presença de efeitos sistêmicos marcantes, não são observados, nos envenenamentos causados pela cascavel, sinais inflamatórios significativos no local da picada (AMORIN et al., 1951; BRAZIL, 1934). Ausência de dor local ou dor de pequena intensidade, seguida de parestesia local, às vezes regional, com sensação de formigamento e adormecimento são relatadas no envenenamento humano (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992; ROSENFELD, 1971). Cabe ressaltar que, além de não causar dor, Brazil (1934, 1950) relatou que este veneno é capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado, principalmente no início do século passado, para o tratamento de dores, principalmente de origem neoplásica.

1.1 Efeito analgésico do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus (VCdt)

Os relatos sobre a ação analgésica de venenos de serpentes em humanos, remontam ao início do século XX (BRAZIL, 1950, 1934). Monalesser & Taguet 1933, citado em Brazil, (1950) demonstraram o efeito analgésico dos venenos de *Naja tripudians* em pacientes com câncer. Os resultados destes estudos, apresentados na França, em fevereiro de 1933, durante a reunião de “Sociedade Médica dos Hospitais de Paris” e em março do mesmo ano, em uma sessão da “Academia de Medicina de Paris”, mostraram que estes venenos, além de efeito analgésico, acarretavam a estabilização e, algumas vezes, a regressão de tumores.

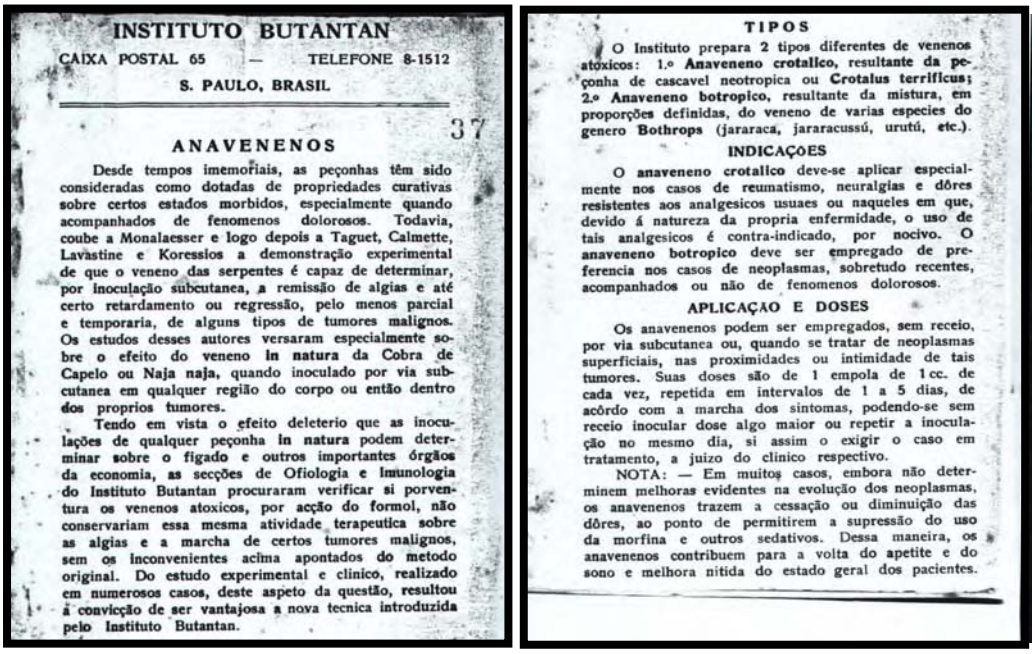
Estes trabalhos tiveram grande repercussão no Brasil e o Dr. Vital Brazil, nesta época trabalhando no Instituto Vital Brazil, no Rio de Janeiro, estimulado por estes estudos, propôs a utilização do veneno de *Crotalus durissus terrificus* como possível analgésico em seres humanos. A escolha recaiu sobre o veneno desta serpente, em decorrência de seu efeito neurotóxico, semelhante ao veneno de *Naja*. Nesta época, acreditava-se que a ação analgésica encontrada no veneno de *Naja* era consequência do efeito neurotóxico deste veneno. Para estes estudos, o Dr. Vital Brazil preparou soluções altamente diluídas do

veneno crotálico, denominadas soluto crotálico (Figura 2). Estas soluções eram distribuídas a vários médicos no Brasil e no exterior e utilizadas no tratamento de dores, em sua maioria, de origem neoplásica. Da mesma maneira que o observado para o veneno de *Naja*, o veneno da cascavel mostrou-se eficaz como analgésico (BRAZIL, 1950, 1934).



Figura 2 – Soluto Crotálico

Além do soluto crotálico, é interessante notar a existência de produtos denominados anavenenos, utilizados também como analgésicos em seres humanos (figura 3). Os anavenenos eram produzidos no Instituto Butantan e obtidos pelo tratamento de venenos de serpentes, incluindo o veneno de cascavel, com formol, com o intuito de destoxificar estes venenos.



INSTITUTO BUTANTAN

CAIXA POSTAL 65 — TELEFONE 8-1512

S. PAULO, BRASIL

37

ANAVENENOS

Desde tempos immemoriais, as peçonhas têm sido consideradas como dotadas de propriedades curativas sobre certos estados morbidos, especialmente quando acompanhados de fenomenos dolorosos. Todavia, coube a Monalaesser e logo depois a Taguet, Calmette, Lavastine e Koressios a demonstração experimental de que o veneno das serpentes é capaz de determinar, por inoculação subcutanea, a remissão de algias e até certo retardamento ou regressão, pelo menos parcial e temporaria, de alguns tipos de tumores malignos. Os estudos desses autores versaram especialmente sobre o efeito do veneno **in natura** da Cobra de Capelo ou Naja naja, quando inoculado por via subcutanea em qualquer região do corpo ou então dentro dos proprios tumores.

Tendo em vista o efeito deleterio que as inoculações de qualquer peçonha **in natura** podem determinar sobre o figado e outros importantes órgãos da economia, as secções de Ofiologia e Imunologia do Instituto Butantan procuraram verificar si porventura os venenos atoxicos, por acção do formol, não conservariam essa mesma atividade terapeutica sobre as algias e a marcha de certos tumores malignos, sem os inconvenientes acima apontados do metodo original. Do estudo experimental e clinico, realizado em numerosos casos, deste aspeto da questão, resultou a convicção de ser vantajosa a nova tecnica introduzida pelo Instituto Butantan.

TIPOS

O Instituto prepara 2 tipos diferentes de venenos atoxicos: 1.º **Anaveneno crotalico**, resultante da peçonha de cascavel neotropica ou **Crotalus terrificus**; 2.º **Anaveneno botropico**, resultante da mistura, em proporções definidas, do veneno de varias especies do genero **Bothrops** (jararaca, jararacussú, urutú, etc.).

INDICAÇOES

O **anaveneno crotalico** deve-se aplicar especialmente nos casos de reumatismo, neuralgias e dôres resistentes aos analgesicos usuaes ou naqueles em que, devido á natureza da propria enfermidade, o uso de tais analgesicos é contra-indicado, por nocivo. O **anaveneno botropico** deve ser empregado de preferencia nos casos de neoplasmas, sobretudo recentes, acompanhados ou não de fenomenos dolorosos.

APLICAÇAO E DOSES

Os anavenenos podem ser empregados, sem receio, por via subcutanea ou, quando se tratar de neoplasmas superficiais, nas proximidades ou intimidade de tais tumores. Suas doses são de 1 empola de 1 cc. de cada vez, repetida em intervalos de 1 a 5 dias, de acôrdo com a marcha dos sintomas, podendo-se sem receio inocular dose algo maior ou repetir a inoculação no mesmo dia, si assim o exigir o caso em tratamento, a juizo do clinico respectivo.

NOTA: — Em muitos casos, embora não determinem melhoras evidentes na evolução dos neoplasmas, os anavenenos trazem a cessação ou diminuição das dôres, ao ponto de permitirem a supressão do uso da morfina e outros sedativos. Dessa maneira, os anavenenos contribuem para a volta do apetite e do sono e melhora nitida do estado geral dos pacientes.

Figura 3- Bula sobre anavenenos

Curiosamente, décadas se passaram e a literatura referente ao uso de venenos de serpentes em seres humanos para tratamento de algias, tornou-se escassa. Particularmente a partir de 1980, vários estudos utilizando modelos experimentais de avaliação da sensibilidade dolorosa foram realizados com o objetivo de confirmar e caracterizar os mecanismos envolvidos na atividade analgésica de venenos de serpentes (CURY e PICOLO, 2006; HABERMEHL, 1981).

Assim, baseados nos dados da literatura sobre o efeito analgésico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em humanos, estudos experimentais têm sido realizados com o intuito de caracterizar os mecanismos envolvidos neste efeito.

Estes estudos demonstraram que o veneno de cascavel, quando administrado em camundongos, induz antinocicepção de longa duração (5 dias), no método da placa quente, mas não no teste da retirada da cauda (tail-flick). Estes dados indicam que a ação deste veneno, no Sistema Nervoso Central, não é consequência da inibição de reflexos espinhais específicos, mas depende da ação em centros supra-espinhais ainda não determinados (BRIGATTE et al., 2001; GIORGI et al., 1993; PICOLO et al., 1998). Estudos farmacológicos evidenciaram a participação de receptores opióides (GIORGI et al., 1993), do tipo *kappa* (BRIGATTE et al., 2001), na antinocicepção observada no modelo da placa quente. O tratamento prolongado com o veneno induz tolerância ao efeito antinociceptivo, mas não dependência física (BRIGATTE et al., 2001).

Adicionalmente foi demonstrada ação antinociceptiva deste veneno em modelos de dor inflamatória, como o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (GIORGI et al., 1993) e na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e também no modelo de hiperalgesia induzida por prostaglandina E_2 (PICOLO et al., 2000a). Nos modelos de hiperalgesia o efeito antinociceptivo do veneno administrado por via oral envolve a ativação de receptores opióides periféricos do tipo *delta* e *kappa*, da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc e a participação de canais para potássio sensíveis a ATP (CHACUR et al., 2003; PICOLO e CURY, 2004; PICOLO et al., 2000a).

Estudos recentes de avaliação do efeito antinociceptivo do veneno crotálico em dores crônicas mostram que o veneno induz antinocicepção em modelo experimental de dor de origem neoplásica (BRIGATE et al., 2004) e em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2003). Esta antinocicepção é também mediada por receptores opióides do tipo *kappa* e *delta* (BRIGATE et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2003). O efeito antinociceptivo do veneno; no modelo de dor neuropática; é de longa duração; sendo detectado por até 3 dias após a administração de uma única dose do veneno (GUTIERREZ, 2005).

Estudos sobre a caracterização da substância(s) presente(s) no veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* que seriam responsáveis por esta ação analgésica tem mostrado que pelo menos 3 componentes deste veneno são capazes de causar analgesia. Mancin e colaboradores (1998) demonstraram o efeito analgésico da fração crotamina (uma miotoxina) em modelos de placa quente e no modelo das contorções abdominais induzidas pelo acido acético. Além da crotamina; foi demonstrada a ação analgésica para um novo peptídeo isolado deste veneno; denominado crotalfina (KONNO et al., 2007, manuscrito submetido). Este peptídeo; da mesma forma que o observado para o veneno bruto; induz efeito analgésico de longa duração; quando administrado por via oral; em modelos de dor aguda e crônica. Este efeito é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ e δ (KONNO et al., 2007, manuscrito submetido). O terceiro componente isolado do veneno crotálico e que apresenta efeito analgésico é a crotoxina. Dados recentes mostraram que a crotoxina induz; em camundongos; efeito analgésico em modelos de dor aguda, quando administrada por via i.p. ou i.c.v. Este efeito da crotoxina não é mediado pela ativação de receptores opióides ou muscarínicos (ZHANG et al., 2006). Adicionalmente, estudos mostram, em um modelo experimental de dor de câncer, que a crotoxina interferiu com o desenvolvimento do tumor, além de inibir os sintomas da dor de câncer (BRIGATTE, 2005).

Apesar destes dados, não se conhece ainda o efeito da crotoxina sobre as dores neuropáticas.

1.2 Dor

De acordo com a IASP (International Association for the Study of Pain), conceitua-se dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual atual ou potencial.

Uma vez que os mecanismos neurofisiológicos relacionados à percepção da dor entre o *homo sapiens* e os animais se assemelham, é lícito salientar que os estímulos dolorosos deflegram transdução, transmissão e percepção equivalentes em diferentes espécies.

A dor apresenta grande abrangência quanto à sua representação física no paciente. O conjunto das inter-relações entre o estímulo proveniente da lesão propriamente dita e as influências oriundas do meio, resultam em diferentes níveis de percepção da dor. As alterações em termos quantitativos e qualitativos da percepção dolorosa são moduladas por experiências anteriores, aspectos culturais, realidades sócio-econômicas e estado emocional.

A dor é considerada como o 5º sinal vital, apresentando-se em 31,2% da população americana, com gastos médicos anuais de US$ 70 bilhões (MÁRQUEZ, 2004). No Brasil, relatos apontam para a existência de 13,6 milhões de pessoas acometidas por quadros dolorosos. Cerca de 50%-60% destas pessoas apresentam dores crônicas (TEIXEIRA, 1999b).

É importante salientar ainda que a questão da dor em animais vem se tornando importante foco de estudo também no campo da Medicina Veterinária. A dor aguda, crônica, visceral, somática e neuropática associadas às variações de espécie, raça, idade, sexo, condição ambiental e o fator individual propriamente dito, tornam as tabelas de scores de dor uma ferramenta que requer grande sensibilidade de interpretação.

1.2.1 Dor – Considerações gerais

O Sistema somestésico, caracterizado pela capacidade do organismo em receber múltiplas informações em diferentes partes do organismo, é composto por neurônios, fibras e sinapses nervosas e é representado por 2 sub-sistemas: o sub-sistema Epicrítico e o sub-sistema Protopático. A dor

enquadra-se como uma sub-modalidade do sub-sistema Protopático (LENT, 2004).

Dor é a percepção de sensações evocadas por mecanismos lesivos diversos. Nocicepção é o processo de identificação dos sinais sensoriais desencadeados pela lesão tecidual. As membranas dos nociceptores (transdutores sensoriais dos estímulos dolorosos) são dotadas de canais iônicos que são ativados durante a lesão. Uma vez ativados, estes canais despolarizam e produzem potenciais de ação (Bevan,1999; Bromm, 2000; Flor, 2000; Dworkin, 2003).

O axônio, uma estrutura exclusiva dos neurônios, é responsável pela transmissão de informações no sistema nervoso. Axônios aferentes primários veiculam informações entre os receptores sensoriais somáticos nociceptivos e a medula espinhal ou tronco encefálico. Estes axônios entram na medula espinhal pelas raízes dorsais e seus corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal.

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias do tipo C e Aδ, as quais possuem terminações sensoriais (nociceptores) nos tecidos periféricos e são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, os quais serão responsáveis pelo desencadeamento de potenciais de ação. Cabe ressaltar que estas fibras possuem elevado limiar de ativação.

As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas Aδ, conduzem mais rapidamente os estímulos periféricos, sendo ativadas por estímulos mecânicos e térmicos. Estes nociceptores são classificados como sendo do tipo 1 e tipo 2. Nociceptores do tipo 1 apresentam alto limiar de ativação para estímulos de natureza térmica e respondem aos estímulos mecânicos. Estes receptores são encontrados na pele glabra e pele provida de pelo. Nociceptores do tipo 2 possuem baixo limiar de ativação ao estímulo térmico e são mecanosensíveis, sendo encontrados na pele provida de pelo. As fibras C, denominadas nociceptores polimodais possuem baixa velocidade de condução, por não apresentarem mielina e são ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Estas fibras apresentam percepção lenta e resposta de longa duração (dor lenta). As fibras mielinizadas de condução rápida Aβ,

responsáveis pela sensação de tato, em algumas condições estão também envolvidas na transmissão da dor (LOESER, 2001; SCHEMELZ et al., 1994; WOOLF e WALL, 1986).

O potencial de ação na fibra nervosa sensorial é desencadeado de acordo com o estímulo nociceptivo. Assim, estímulos mecânicos desencadeiam o potencial de ação por meio de corrente iônica gerada em canais; o estímulo térmico envolve proteínas de membrana e/ou moléculas efetoras intracelulares e os estímulos químicos atuam por meio da ação em receptores específicos.

Os receptores ionotrópicos podem ser cátions não-seletivos ou canais de Na^+ não dependentes de voltagem incluindo receptores vanilóides I sensíveis à capsaina, canais iônicos dependentes de ATP e canais iônicos pH-dependentes. Uma vez ativados, os canais se abrem permitindo a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} para o interior destes nociceptores, promovendo a despolarização da membrana. Se a despolarização é suficiente para ativar os canais de sódio dependentes de voltagem, estes também são abertos, promovendo disparo dos potenciais de ação e a mediação da condução de estímulos sensoriais da inervação periférica para a medula espinhal. Neurônios sensoriais, em particular fibras C, expressam grande número de canais de Na^+ dependentes de voltagem. De particular interesse são os canais de sódio dependentes de voltagem do tipo $Na_v1.8$ e $Na_v1.9$, resistentes a tetrodotoxina. Ambos os canais são exclusivos para nociceptores sugerindo sua relevância na transmissão nociceptiva e também direcionando para sua importância no desenvolvimento de drogas que bloqueiam seletivamente estes canais, acarretando a inibição da dor. Adicionalmente aos canais de Na^+, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem particularmente os do tipo CaV1, CaV2.1 e Cav2.2, estão relacionados com a transmissão nociceptiva assim como também estão envolvidos na liberação de neurotransmissores e sensibilização central. Dados experimentais tem demonstrado que a abertura de alguns canais de K^+ induzem antinocicepção (GIORDANO, 2005; LEE et al., 2005).

Dor transitória é normalmente observada quando fibras nervosas primárias aferentes do tipo C e Aδ são ativadas por estímulos breves de alta intensidade, que produzem pouco ou nenhum dano tecidual.

Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, as fibras nervosas, particularmente as do tipo C, são ativadas por estímulos de baixa

intensidade, acarretando dor mais persistente. Neste caso, a sensibilização dos receptores da dor (nociceptores), causando hiperalgesia, é o denominador comum de todos os tipos de dor inflamatória. O fenômeno de hiperalgesia envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, pela ação de mediadores químicos, liberados durante a lesão nervosa, quanto facilitação central (corno dorsal da medula espinhal e tálamo) da transmissão nervosa (DRAY et al., 1994; FERREIRA e LORENZETTI, 1995; LEVINE et al., 1993). Além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores "silenciosos" ou "adormecidos" (silent nociceptors/ sleeping nociceptors), são ativados durante processos inflamatórios, contribuindo para a hiperalgesia. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; SCHEMELZ et al., 1994).

Hiperalgesia, ou seja, o aumento da sensibilidade à dor, pode ser descrita como primária no caso de ocorrência nos limites da área lesionada, ou secundária, quando detectada nos tecidos circunvizinhos à área receptora do estímulo, regiões estas não acometidas pelo estímulo nociceptivo inicial (LOESER, 2001; OKADA et al., 2001; TEIXEIRA, 1999b; TEIXEIRA, 2003).

Substâncias como acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, substância P, tromboxanos, PAF, interleucinas (IL1, IL6, IL8), TNF, NGF, íons K^+ e AMPc presentes no ambiente tecidual e liberadas por mastócitos, sinoviócitos, leucócitos e vasos sanguíneos, atuam ativando diretamente o nociceptor e/ou alternando o limiar de ativação destes receptores (VALE, 2000). Estes mediadores liberados durante a lesão tecidual, podem atuar *per se*, agir conjuntamente com outros mediadores e ainda, liberar outros mediadores.

Ainda, a redução do pH extracelular provocado por processos inflamatórios, anóxia, ou hipóxia, produz a excitação dos nociceptores, resultando em dor que persiste até a remissão destas alterações (RIEDEL e NEECK, 2001; TEIXEIRA, 2003).

Adicionalmente, a liberação de ATP (importante neurotransmissor excitatório) promove a ativação de macrófagos, os quais liberam citocinas e prostanóides, levando à sensibilização dos neurônios sensitivos (MILLAN, 1999; OKADA et al., 2001).

A indução de hiperalgesia está baseada na teoria da "porta hiperalgésica", a qual considera que, quando o nociceptor está inativo, existe equilíbrio entre os níveis intracelulares de AMPc e GMPc. Na vigência de hiperalgesia, ocorre incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínas quinases, como PKA e fosforilação de canais iônicos, aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular, despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nervoso (FERREIRA, 1994 para revisão; CUNHA et al., 1999; ENGLAND et al., 1996). Alguns mediadores hiperalgésicos elevam diretamente as concentrações intracelulares de AMPc mas outros, cujos receptores não estão acoplados à adenilato ciclase, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc, como a geração de prostanóides ou ativação de PKC (BEVAN, 1999, para revisão). A ativação da PKC leva à fosforilação e ao aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca^{2+} e Na^{+} (JULIUS e BASBAUM, 2001; LORENZETTI e FERREIRA, 1996; MILLAN, 1999). Recentemente, foi demonstrado que a via das MAPKs pode ser ativada independentemente da ativação da PKC ou PKA. A cascata da MAPK é ativada pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina (JI e WOOLF, 2001), sendo subdividida em 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK. Dai e colaboradores (2002) demonstraram a participação das MAPK, mais especificamente das ERKs em processos hiperalgésicos.

É importante salientar que, na vigência de estímulos nociceptivos de grande intensidade, dor pode ser observada também em resposta a outros estímulos que usualmente não provocam dor (estímulos não nocivos). Este processo é denominado de alodinia (BESSON, 1999; DWORKIN et al., 2003; KIDD e URBAN, 2001). Várias teorias têm sido propostas para explicar a gênese do fenômeno de alodinia. Tem sido sugerido que a sensibilização dos feixes nervosos sensitivos ascendentes torna-os susceptíveis à estimulação por mecanoreceptores (fibras Aβ), além dos nociceptores (WILLIS, 1993). Ainda, a estimulação dos neurônios dinâmicos de amplo espectro (wide-dynamic-range neurons-WDR) por fibras nociceptivas aferentes primárias, a inervação de tecidos não lesados por fibras C sensibilizadas, o aumento da eficácia sináptica dos mecanoreceptores (fibras Aβ), em decorrência da acentuada ativação dos nociceptores, ou alterações das vias descendentes de

controle da dor (WILLIS, 1993) têm sido propostos como mecanismos de indução de alodinia. Adicionalmente, tem sido sugerido que em condições de dor persistente, a atividade contínua das fibras C resulta em sensibilização, na medula espinhal, de um interneurônio, normalmente inibitório, relacionado às fibras C e Aβ. Nestas condições, a ativação deste interneurônio, pela estimulação normal das fibras Aβ, acarreta, em vez de inibição, aumento acentuado da atividade da fibra C (CERVERO e LAIRD, 1996). Ainda, foi evidenciado que após injúria periférica, ocorre reorganização anatômica das terminações nervosas aferentes Aβ, que passam a ocupar as camadas mais superficiais do corno dorsal da medula espinhal, usualmente envolvidas no processamento de informações nociceptivas (WOOLF et al., 1992). Wolf e colaboradores (2000) sugeriram também que a injúria nervosa periférica pode acarretar alterações fenotípicas das fibras Aβ, as quais passam a produzir substâncias nociceptivas.

Durante a lesão tecidual periférica ou inflamação ou ainda, lesão do Sistema Nervoso Central ou Periférico, a ativação de fibras aferentes primárias do tipo C, induz aumento da excitabilidade de neurônios espinhais, fenômeno denominado de sensibilização central (WOOLF, 1983; WOOLF e WALL, 1986). O fenômeno de sensibilização central, juntamente com a sensibilização periférica (TREEDE et al., 1992), medeiam os processos de alodinia e hiperalgesia.

O corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão da informação nociceptiva da periferia para o Sistema Nervoso Central. A medula espinhal é composta pela substância cinzenta, envolvida por tratos de substância branca denominados de colunas. As fibras sensitivas aferentes penetram na medula espinhal pelo corno dorsal que é organizado laminarmente (Lâmina de Rexed). As lâminas de Rexed são numeradas de I a X, cada uma com sua característica morfofuncional e respectiva fibra advinda do sistema sensorial periférico. As fibras C estabelecem suas terminações na lâmina II. As fibras Aδ terminam nas lâminas I e V e por sua vez as fibras Aβ terminam nas lâminas II, IV e V. A lâmina II denominada de substância gelatinosa de Rolando, é um importante local de modulação da dor. Os axônios aferentes que entram pelo corno dorsal realizam sinapses com neurônios

denominados de segunda ordem, os quais ascendem por diversos tratos. A via neoespinotalâmica da dor é a principal via utilizada para a transmissão dos estímulos de dor e de temperatura. A esta via se atribui a sensibilidade do tipo discriminativa e neurosensorial. As fibras desta via projetam-se em ascensão ao córtex cruzando o bulbo, ponte e mesencéfalo sem o estabelecimento de sinapses, até alcançarem o tálamo em seus núcleos intralaminar e ventral posterior, para então realizarem sinapses com neurônios de terceira ordem que se dirigem ao córtex somatosensorial (núcleo ventral posterior e núcleo intralaminar) (LOESER, 2001; OKADA et al., 2001; RIEDEL e NEECK, 2001; TEIXEIRA, 1999a; TEIXEIRA e FIGUEIRÓ, 2003; VALE, 2000). A via paleoespinotalâmica está envolvida com o aspecto afetivo-emocional da dor e gera uma dor difusa e mal localizada. Nesta via, os neurônios sensoriais adentram na medula da mesma forma que a via espinotalâmica. Os neurônios de 2^{a} ordem estão localizados na coluna posterior da medula e seus axônios cruzam o plano mediano, ganham o funículo lateral do lado oposto e se projetam para diversos pontos da formação reticular (neurônios de 3^{a} ordem), onde ocorrem sinapses antes de adentrarem para os núcleos intralaminares do tálamo. Os neurônios de 2^{a} ordem também ascendem pelo funículo lateral do mesmo lado. A partir do tálamo os neurônios projetam-se para diversas regiões corticais. A sensação dolorosa mediada por esta via se torna consciente já no tálamo.

Muitos neurotransmissores estão envolvidos na modulação da transmissão desta informação nociceptiva na medula espinhal (Aimone, 1989). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório das fibras nervosas aferentes primárias. A ação deste aminoácido é mediada por receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), responsáveis pela transmissão sináptica excitatória lenta; por receptores AMPA (α-amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol), responsáveis pela transmissão sináptica rápida e por receptores do tipo glutamato metabotrópico (mGluR) (FUNDYTUS, 2001; HOLLMANN e HEINEMANN, 1994; MONAGHAN et al., 1989). O glutamato ativa receptores AMPA por ativação do fluxo de Na^{+}, K^{+} e Ca^{2+} para o interior do neurônio, despolarizando a membrana neuronal por um curto período. Após este primeiro estímulo, ocorre a ativação de receptores NMDA por influxo de Ca^{2+} e Na^{+} e efluxo de K^{+}. O receptor NMDA em condições de repouso, apresenta seu canal iônico

bloqueado por uma molécula de Mg^{2+} e necessita da presença de glicina e glutamato para ser ativado. Receptores NMDA contribuem para a hipersensibilidade dos neurônios espinhais na vigência de dor inflamatória (AANONSEN et al., 1990; SHER e MITCHELL, 1990). Receptores metabotrópicos estimulados por glutamato, acarretam a estimulação da fosfolipase C, com subseqüente formação de 2os mensageiros (IP_3 e DAG-diacil glicerol). O IP_3 (fosfato inositol) libera íons Ca^{2+} intracelular levando à liberação de ácido araquidônico e formação de prostaglandina E_2. O DAG estimula a translocação de PKC para as membranas celulares. O aumento da concentração de cálcio intracelular serve como 2^{o} mensageiro para desencadeamento da síntese de AMP e ativação de fosfolipase A_2 e PKC ligadas à membrana neuronal nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, acarretando a despolarização lenta. A PKC interfere na estabilidade da membrana neuronal aumentando a sensibilidade do receptor NMDA por remover o íon Mg^{2+}. A PKC também ativa proto-oncogenes e aumenta a formação de genes imediatos (C-fos, C-jun, Krox-24, Jun-D, Fos-B), sendo que produtos protéicos destes genes imediatos atuam como 3os mensageiros, resultando na síntese de RNAm envolvidos na geração de fatores de crescimento, de novos canais protéicos, de neuropeptídeos e enzimas que alteram prolongadamente a atividade da membrana neuronal. Estes genes podem ser facilmente ativados, tornando uma dor temporária em dor permanente. Pode-se afirmar, portanto, que a ativação da PKC é uma condição importante para a sensibilização neuronal e hiperalgesia (MILLAN, 1999; NISHIDA et al., 1994; OKADA et al., 2001; RIEDEL e NEECK, 2001).

Além dos aminoácidos excitatórios, vários neurotransmissores liberados na medula espinhal participam da transmissão da informação nociceptiva. Substância P (SP), o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e Neurocinina A (NKA) são liberados em resposta a vários estímulos nocivos (DUGGAN et al., 1988; DUGGAN et al., 1990) e induzem diminuição do limiar de dor (PICARD et al., 1993). As taquicininas (SP e NKA) exercem seus efeitos biológicos através da interação com os receptores NK1 e NK2, respectivamente (MAGGI et al., 1993; SANDKUHLER et al., 2000), enquanto que o CGRP atua via dois tipos de receptores- CGRP1 e CGRP2. Cabe ressaltar que o CGRP e a SP coexistem nas terminações centrais de neurônios

aferentes primários, sendo liberados conjuntamente em resposta a um mesmo estímulo nocivo, induzindo a síntese de agentes inflamatórios (citocinas e PGE_2) assim como de enzimas (proteases e colagenases) (SEYBOLD et al., 2003).

Vários dados da literatura têm evidenciado ainda, que as células da glia (astrócitos e migroglia) da medula espinhal, por meio de liberação de mediadores nociceptivos, têm papel relevante para a transmissão da informação nociceptiva no SNC (BARRES, 1991; MILLIGAN et al., 2003; WATKINS e MAIER, 2003; WATKINS et al., 2001). As células da glia sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios nociceptivos. Dentre as substâncias secretadas pela glia, podemos citar as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o óxido nítrico, quimiocinas e citocinas (AGULLO et al., 1995; HARTUNG et al., 1988; MARRIOTT et al., 1991; STELLA et al., 1994). Além de sintetizar estas substâncias, a glia expressa receptores para o glutamato, SP, CGRP (AMANN et al., 1996) e as citocinas (STREIT e KINCAID-COLTON, 1995).

O aumento da excitabilidade da medula espinhal (sensibilização central) deve-se à capacidade do sistema nervoso de apresentar plasticidade funcional e é decorrente de múltiplos mecanismos, sendo o mais importante, a ativação de receptores NMDA para glutamato (DOUBELL et al., 1999, para revisão). Estes mecanismos são caracterizados por: a) aumento da liberação de neurotransmissores das terminações nervosas aferentes primárias; b) aumento da despolarização do neurônio pós-sináptico pelos neurotransmissores excitatórios liberados das fibras aferentes primárias; c) alterações pós-translacionais de receptores, mediadas pela ativação de receptores metabotrópicos (mGluR, NK1). O glutamato promovendo a abertura de canais iônicos, produz a despolarização das fibras sensitivas. A ativação destes receptores nos neurônios da medula espinhal, causada pela ativação de fibras C, produz potenciais sinápticos lentos, que se somam temporária e espacialmente, como conseqüência da atividade das fibras C e da ativação de diversas fibras C, respectivamente. A somação destes potenciais acarreta aumento da despolarização dos neurônios, com ativação de canais iônicos sensíveis à voltagem e de receptores NMDA ionotrópicos, normalmente bloqueados por um íon magnésio. Estas alterações acarretam aumento do

cálcio intracelular e ativação de proteína quinase C. A ativação da proteína quinase promove também a fosforilação deste receptor NMDA, remoção do íon magnésio (CHEN e HUANG, 1992) e ativação adicional deste receptor. A ativação subsequente de outras proteínas quinases promove fosforilação adicional do receptor NMDA e o aumento do tempo de abertura do seu canal (YU et al., 1997).

A medula espinhal está sob a influencia de tratos descendentes excitatórios e inibitórios, que, via interneurônios presentes no corno dorsal, facilitam ou reduzem a transmissão nociceptiva. Os mecanismos de modulação da dor podem ocorrer em dois pontos: na lâmina II (substância gelatinosa) da medula e no tronco cerebral e tálamo.

A células da lâmina II do corno dorsal são principalmente interneurônios inibitórios curtos que se projetam para a lâmina I e V e regulam a transmissão no nível da primeira sinapse da via nociceptiva, entre as fibras aferentes primárias e os neurônios de transmissão do trato espinotalâmico. Essa função de “porteiro” deu origem ao termo “teoria de controle do portão ou comporta”, proposta por Ronald Melzack e Patrick Wall em 1965. Nesta teoria, é proposto que as células da lâmina II respondem tanto à atividade das fibras aferentes que entram na medula espinhal e respondem também à atividade das vias descendentes. A substância gelatinosa é rica tanto em peptídeos opióides quanto em receptores opióides (MÁRQUEZ, 2004; MILLAN, 1999; OKADA et al., 2001; RIEDEL e NEECK, 2001; TEIXEIRA et al., 2003b).

Na via descendente de controle da dor, a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo tem importante papel para a inibição da transmissão da dor. Diversas estruturas encefálicas podem influenciar a atividade da substância cinzenta periaquedutal (PAG) do mesencéfalo. A PAG recebe aferências de várias estruturas do encéfalo, das quais muitas estão relacionadas na transmissão de sinais emocionais. Os neurônios da PAG enviam axônios descendentes para regiões da linha média do bulbo, em particular para os núcleos da rafe, que utilizam serotonina como neurotransmissor. Os neurônios do bulbo por sua vez, projetam axônios descendentes até os cornos dorsais da medula espinhal, onde podem deprimir a atividade dos neurônios nociceptivos. Tanto a PAG quanto a substância gelatinosa são particularmente ricas em neurônios que contém encefalinas e os

peptídeos opióides liberados destas regiões têm importante papel nas dores patológicas. Existe também uma via noradrenérgica proveniente do *locus ceruleus,* que exerce efeito inibitório sobre a transmissão da dor (MÁRQUEZ, 2004; MILLAN, 1999; OKADA et al., 2001; RIEDEL e NEECK, 2001; TEIXEIRA et al., 2003a)

1.2.3 Dor neuropática

É importante salientar que além das dores agudas provenientes de processos inflamatórios, as dores crônicas têm importante significado patológico. As enfermidades e síndromes que condicionam o fenômeno de dor crônica afetam milhões de pessoas em todo o mundo, produzindo enorme repercussão nos pacientes, em seus familiares e na sociedade como um todo.

A injúria do nervo periférico em humanos resulta, muitas vezes, em dor neuropática crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) e hiperalgesia (dor exagerada em resposta a estímulos lesivos) (PAYNE e NORFLEET, 1986). Alterações no Sistema Nervoso Periférico e na medula espinhal contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática. As vias aferentes nociceptivas sofrem modificações na despolarização do neurônio, na liberação de neurotransmissores e na reorganização das sinapses.

Na vigência de dor neuropática, são observadas alterações no tálamo, uma vez que a estimulação da região ventrocaudal talâmica em pacientes com dor neuropática, causa sensação de dor, enquanto que em indivíduos sem este tipo de dor, a sensação observada é apenas térmica (TASKER et al., 1988). Outros estudos demonstram, ainda alterações nas conexões das vias nociceptivas no córtex cerebral. Análises do metabolismo neuronal, através de técnicas de imagem (tomografia por emissão de pósitrons), em pacientes com dor neuropática, mostram expansão da zona cortical responsável pela dor, fazendo com que os estímulos nociceptivos afetem amplas zonas corticais de percepção, contribuindo para maior alteração na afetividade do indivíduo (BROMM et al., 2000; FLOR et al., 2000). As sinapses inibitórias da via nociceptiva atuam na medula espinhal, por intermédio da ativação de interneurônios inibitórios e das vias descendentes superiores. Tem sido

demonstrado que nas lesões periféricas das fibras C, ocorre diminuição dos níveis de GABA nos interneurônios inibitórios espinhais (CAVIEDES e HERRANZ, 2002; STILLER et al., 1996). Além disso, diminuição nos níveis de serotonina e noradrenalina, nos neurônios inibitórios descendentes foi também observada (SIDDALL e COUSINS, 1997a, b).

Considera-se que existam dois tipos de dor neuropática, a dor mantida pela atividade simpática (sympathetically maintained pain – SMP) e a dor independente desta atividade (sympathetically independent pain – SIP). Evidências têm sugerido que neurônios sensitivos lesados apresentam aumento de responsividade à adrenalina circulante ou noradrenalina liberada das terminações simpáticas pós-ganglionares. Estas catecolaminas atuam reduzindo o limiar de resposta nos nociceptores (DEVOR, 1994). Os estudos dos mecanismos envolvidos nesta sensibilidade têm mostrado que a injúria nervosa induz a emergência de fibras simpáticas no gânglio da raiz dorsal, aumentando a quantidade de noradrenalina liberada nos neurônios aferentes hiperresponsivos (SMALL et al., 1996). Os adrenoceptores $\alpha 2$ são os mais importantes nesta interação, mas a participação de receptores $\alpha 1$ deve ser também considerada. A interação de agonistas adrenérgicos a estes adrenoreceptores, na membrana celular dos neurônios é a responsável, nos casos de SMP, pela origem das descargas ectópicas (DEVOR et al., 1994).

1.3 Neuromas

Dentre as alterações no processo lesivo de feixes nervosos podemos incluir a formação de neuromas.

Neuromas dolorosos foram primeiramente descritos por Ambroise Pare em 1634. Nestes neuromas, ocorre a presença de focos ectópicos nas fibras nervosas periféricas lesadas, os quais mantém os impulsos nervosos aferentes para o Sistema Nervoso Central. A entrada destes impulsos ectópicos na medula espinhal, sensibiliza os neurônios do corno dorsal da medula (DEVOR, 1994; GRACELY et al., 1992). Canais de sódio dependentes de voltagem parecem ser os responsáveis pela manutenção dos impulsos ectópicos aferentes (PORRECA et al., 1999). Fibras mielinizadas largas, do tipo Aβ,

normalmente envolvidas na transmissão dos impulsos não nocivos, são as que apresentam maior quantidade de impulsos ectópicos na vigência de lesão nervosa periférica. Estas fibras enviam projeções colaterais para o corno dorsal da medula espinhal. Estes fatos, associados à sensibilização central, na vigência de lesão nervosa periférica, contribuem para o desenvolvimento da dor espontânea, de alodinia e de hiperalgesia, fenômenos que caracterizam a dor neuropática (DEVOR, 1994; MAO et al., 1995; SELTZER et al., 1991).

Em injúrias nervosas periféricas, decorrentes de lesão sem perda de continuidade ou transecção parcial ou total do feixe nervoso, uma cascata de eventos tem início, acarretando transformações axonais. Alterações do corpo celular no neurônio lesado, assim como nos segmentos proximais e distais do axônio são observados. No período de 24 horas pós injúria, um único axônio produz múltiplos brotamentos axonais formando a unidade de regeneração (GUYTON, 1993; KEMPERMANN e GAGE, 1999a; MORRIS et al., 1972). Na porção terminal destes brotamentos observa-se o referido cone de crescimento o qual apresenta grande afinidade por fibronectinas e lamininas da lamina basal da célula de Schwann (GUYTON, 1993; KEMPERMANN e GAGE, 1999b; LETOURNEAU e WESSELLS, 1974).

O coto distal lesionado apresenta degeneração Walleriana, em função do bloqueio no aporte de macromoléculas essenciais, originárias do corpo celular do axônio (WALL e GUTNICK, 1974). Em um neurônio integro, as macromoléculas em questão movem-se no interior de vesículas que caminham sobre os microtúbulos do axônio sendo este processo sustentado por ATP e proteínas denominadas cinesinas (no transporte anterógrado) e dineína (no transporte retrógrado)(DEVOR, 1994; MAGGI et al., 2003).

O processo regenerativo apresenta um crescimento desordenado dos feixes axonais, com a formação de uma massa amorfa, o neuroma (TERZIS e SMITH, 1987). O modelo de neuroma replica a síndrome da dor fantasma observada em pacientes submetidos à amputação ou transecção nervosa em membros intactos (anestesia dolorosa).

Estudos histológicos apresentam como base para identificação de um neuroma, os seguintes critérios: crescimento desordenado dos brotamentos axonais, proliferação de células de Schwann, erosão/perda do perineuro, perda da arquitetura funicular com ruptura da bainha epineural, crescimento

desordenado dos axônios e presença de fibrose intra-neural (KRYGER et al., 2001; SUNDERLAND, 1979).

Respostas anormais à norepinefrina liberada no microambiente dos brotamentos também são relatadas em função da ativação de um α-adrenoreceptor na membrana aferente primária ou de células adjacentes que interagem com esta terminação primária. O corpo celular aferente da raiz ganglionar dorsal pode também tornar-se fonte de descargas ectópicas espontâneas e apresentar resposta anormal à estímulos iônicos, mecânicos, térmicos (frio) e noradrenérgicos (DEVOR et al., 1989). Após a injúria nervosa, o coto proximal do feixe lesionado apresenta-se edemaciado e a indicação de formação de neuroma é possível apenas através de estudo histológico.

Fatores neurotróficos de crescimento (NGF-fator de crescimento neural) apresentam-se intimamente ligados aos processos regenerativos pós traumáticos (CHAO et al., 1998), podendo atuar como importante componente no processo de formação do neuroma (ALOE et al., 1981; SCHWOB et al., 1994) e como mediador da dor neuropática (RO et al., 1999).

1.4 Controle da dor neuropática

O tratamento da dor neuropática em humanos é freqüentemente, ineficaz. Contudo, quando se considera a complexidade dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática, torna-se compreensível a dificuldade encontrada na clínica para o tratamento desse processo.

Em geral, a terapêutica consiste da utilização de antidepressivos tricíclicos, considerados os melhores fármacos para este tipo de dor (KINGERY, 1997; SINDRUP et al., 1990), de anticonvulsivantes e/ou, da administração sistêmica de anestésicos locais, como lidocaína (DWORKIN et al., 2003). Alguns ensaios clínicos têm mostrado ação analgésica para agonistas GABA (FROMM, 1994; MELLICK e MELLICK, 1997) e antagonistas de receptores NMDA, como ketamina (BACKONJA et al., 1994; EIDE et al., 1994; FELSBY et al., 1996). Atualmente, o tratamento com drogas que reduzem a excitabilidade dos neurônios, como carbamazepina ou gabapentina vêm sendo difundido. Desta forma a carbamazepina por bloquear os potenciais de ação produzidos pelos canais de sódio e potássio voltagem-dependentes e

a gabapentina por ligar-se aos sítios dos canais de cálcio dependentes de voltagem (SCHAIBLE e RICHTER, 2004), tem sido utilizadas no tratamento da dor neuropática.

A utilização de agonistas α2 adrenérgicos, como clonidina, em casos de dores não dependentes da atividade simpática, tem sido também preconizada (BOSWELL et al., 1997). Estudos recentes em animais submetidos à dor neuropática, têm demonstrado que o efeito antinociceptivo da clonidina é mediado pela ativação seqüencial, na medula espinhal, da via receptores adrenérgicos α2 – receptores muscarínicos – oxido nítrico (XU et al., 2000). Nos casos de SMP, o bloqueio simpático (simpatectomia) tem sido considerado o melhor tratamento para a dor neuropática (HABLER et al., 1997), apesar da sua eficácia ser discutida (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

A eficácia da utilização de opióides em pacientes com dor neuropática é bastante controversa e discutida (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Apesar da demonstração da eficácia de agonistas de receptores μ, δ e κ no controle deste tipo de dor (KEITA et al., 1995; PRZEWLOCKI et al., 1999; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001), muitos trabalhos monstram ausência de efeito da morfina na dor neuropática (CATHELINE et al., 1996; PORTENOY, 1990). Várias evidências clínicas têm sugerido que a ineficácia do tratamento da dor neuropática pelos opióides, é decorrente da redução na sensibilidade dos opióides, observada nestas condições (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este fato, entre eles, alteração no número de receptores opióides espinhais ou no sinal de transdução após a ligação receptor opióide/agonista (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Estas alterações incluem “down regulation” ou destruição dos receptores opóides, mediada provavelmente pelo aumento na produção de proteína quinase C, seguida de ativação de receptores NMDA em células pós sinápticas e aumento na expressão de receptores glutaminérgicos metabotrópicos espinhais do tipo I (FUNDYTUS, 2001). Contudo, vários trabalhos têm mostrado analgesia por opióides em alguns tipos de dor neuropática, como nevralgia pós-herpética (WATSON et al., 1998) e dor neuropática de pacientes diabéticos (HARATI et al., 1998).

Ainda, nos casos de cor crônica originadas por neuromas formados após lesão total ou parcial de feixes nervosos periféricos, algumas tentativas para o controle da dor têm sido realizadas, empregando substâncias capazes de dessensibilizar a fibra nervosa. Entre estas substâncias podemos citar anestésicos locais (MCCARTHY et al., 2002), glicerol (BURCHIEL e RUSSELL, 1985,Westerlund, 2001 #1926), fenol (FELSENTHAL, 1974; WESTERLUND et al., 2001) e álcool (FERRER-BRECHNER, 1989; WILSON, 1981). Apesar do uso destas substâncias apresentar resultados positivos na dor espontânea dos neuromas, seus efeitos são temporários, o que gera a necessidade de tratamento constante.

1.5 Modelos Experimentais para Indução de Dor Neuropática

Os mecanismos envolvidos na dor neuropática são ainda pouco conhecidos, particularmente pela escassez de modelos animais disponíveis para estes estudos. Principalmente nestas últimas duas décadas, vários modelos de dor neuropática têm sido utilizados, os quais têm possibilitado o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e de drogas com atividade analgésica neste tipo de dor (Devor & Seltzer, 1999, para revisão).

Dentre os vários modelos experimentais para o estudo da dor neuropática, podemos citar:

- modelos de dores crônicas neoplásicas (WANG e WANG, 2003, para revisão);
- modelos de dor originária da injúria parcial ou total de nervos periféricos ou espinhais (BENNETT e XIE, 1988; KIM e CHUNG, 1992; LINDENLAUB e SOMMER, 2000; SELTZER et al., 1990; ZELTSER et al., 2000).

Em relação aos modelos de injúria nervosa, estes se dividem em modelos de constrição (total ou parcial) ou transeccção (total ou parcial) nervosa. Injúria parcial pode ser produzida por constrições crônicas do nervo ciático (chronic constriction injury – CCI), através de ligações frouxas neste nervo (BENNETT e XIE, 1988). Neste modelo, são observados dor espontânea, hiperalgesia e alodinia em resposta a estímulos térmicos e mecânicos (ATTAL et al., 1990; BENNETT e XIE, 1988). Seltzer *et al* (1990) propuseram um modelo para indução de trauma nervoso, caracterizado por

ligações firmes do nervo ciático, na parte superior da coxa do animal, induzindo lesão das fibras A e C, de um terço até a metade do nervo (partial sciatic nerve ligation - PSL). Uma variante deste modelo, proposto por Kim & Chung (1992), compreende ligações firmes do nervo espinhal, nos segmentos L5 ou L5+6 (spinal nerve ligation - SNL).

Em relação aos modelos de transecção do feixe nervoso, esta transecção pode ser parcial (LINDENLAUB e SOMMER, 2000) ou total (ZELTSER et al., 2000). Em ambos os modelos, a dor é gerada em decorrência da formação do neuroma e caracterizada por hiperalgesia, alodinia e dor expontânea.

*

* *

Em resumo, frente ás dificuldades encontradas para o controle da dor neuropática, os tratamentos com fármacos em geral estão associados à abordagens multidisciplinares na tentativa de amenizar o quadro doloroso no paciente acometido pela neuropatia. Desta forma, a busca por agentes analgésicos torna-se alvo de constantes pesquisas. Como apresentado por Cury e Picolo (2006), um vasto campo de estudo no universo das toxinas animais e suas propriedades analgésicas encontra-se à espera do mundo científico para novas descobertas.

Neste sentido a crotoxina apresenta ação analgésica em modelos de dor aguda e crônica, mas não se conhece seus efeitos frente à dor neuropática.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da crotoxina sobre o desenvolvimento do neuroma e a dor decorrente da lesão nervosa periférica.

Os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar a dor neuropática induzida pela transecção total do nervo ciático de ratos.
2. Caracterizar e identificar as etapas de formação do neuroma no coto do nervo ciático submetido à transecção total.
3. Avaliar da capacidade da crotoxina em interferir com a formação do neuroma após transecção do nervo ciático.
4. Avaliar a ação antinociceptiva da crotoxina no modelo de dor neuropática desenvolvido neste estudo.
5. Avaliar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina neste modelo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 160-180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 ± 1 ^{o}C) e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos, para prevenir os efeitos decorrentes das variações ambientais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus Botucatu em 12 de Abril de 2005 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB-protocolo n° 201/05) e seguiram as normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

3.2 Obtenção da crotoxina (Ctx)

Todas as etapas de obtenção da crotoxina foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

A purificação da fração crotoxina do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* foi realizada segundo o método descrito por Faure & Bon (1987), modificado. Uma alíquota contendo 15 mg do veneno foi ressuspensa em 1 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos (Ultra-Centrífuga Eppendorf) para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de troca aniônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 mL, em sistema FPLC (fast-performance liquid chromatography, Pharmacia), em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,0, para o isolamento da crotoxina. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas em um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl, tamponado com o tampão de equilíbrio. Foram obtidos 3 picos principais (Picos I, II e III), onde o Pico II corresponde à

eluição da crotoxina. Frações de 1 mL por tubo foram coletadas e a eluição foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm.

As frações contendo a crotoxina foram testadas quanto à homogeneidade, por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os tubos correspondentes à crotoxina foram reunidos e dialisados e a sua concentração foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

3.2.1 Análise Eletroforética em SDS-PAGE para comprovação da pureza da crotoxina

A análise da pureza da crotoxina isolada foi realizada submetendo as amostras obtidas durante o processo de purificação à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). O gel preparado na concentração de 12,5% de acrilamida, foi montado em placas de vidro 8 x 5 cm, unidas por espaçadores de 1,0 mm de espessura (Sistema BIO-RAD, Mini Protean II). As amostras da crotoxina (3µg) foram diluídas em Tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6.9, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, 1 mM de PMSF, 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) e fervidas por 5 min. O material foi aplicado em gel de empilhamento 4% e submetido à corrente de 20 mA por 1 h e 30 min. Após a corrida, as proteínas foram reveladas por coloração de prata, conforme descrito por Santoro (1999).

As alíquotas de crotoxina consideradas isentas de contaminantes, foram estocadas a –20^{o}C até o momento do uso.

Para comprovar a eficiência do material obtido, foi realizada a determinação da toxicidade da fração crotoxina por ensaios de atividade letal (DL50), atividade miotóxica e atividade fosfolipásica A_2.

A crotoxina foi diluída em salina estéril 0,85%, (p/v) no momento da utilização.

3.3 Planejamento geral

Para a padronização do modelo experimental de neuroma, os animais foram submetidos à diferentes técnicas cirúrgicas de neurectomia total ou parcial do nervo ciático, estabelecendo-se a técnica da neurectomia total como a de melhor resultado no tocante à indução da formação do neuroma.

A instalação dos fenômenos nociceptivos e o desenvolvimento do neuroma foram analisadas em diversos períodos de tempo após a realização da neurectomia total do nervo ciático. Para a caracterização da formação do neuroma, foram realizadas análises histopatológicas do coto proximal do nervo ciático transeccionado. Para avaliação da instalação de dor neuropática foi investigado o desenvolvimento de hiperalgesia.

Para investigar o efeito da crotoxina sobre o desenvolvimento do neuroma e a instalação da hiperalgesia, foram inicialmente realizados ensaios preliminares para a determinação do esquema de tratamento a ser utilizado. Após estes ensaios, optou-se por utilizar tratamento único com a crotoxina, instilada uma única vez, durante a cirurgia, no coto proximal e distal do nervo ciático transeccionado.

Com intuito de investigar o possível aparecimento de toxicidade induzida pela crotoxina, foram realizadas análises histopatológicas do cérebro, coração, pulmão, rim, fígado, baço e da musculatura em contato com o coto. Também foram coletadas amostras de sangue da aorta abdominal para a mensuração dos níveis séricos de creatinofosfoquinase. Ainda, uma vez que nosso objeto de estudo é a crotoxina, uma toxina que pode interferir com a atividade motora dos animais, e uma vez que o método de avaliação da sensibilidade dolorosa presentemente utilizado emprega uma resposta motora, tornou-se necessário investigar se a crotoxina estaria interferindo na atividade motora dos animais. A atividade motora foi avaliada através do teste do Campo Aberto.

Com objetivo de identificar quais os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina neste modelo de dor neuropática, foram utilizados antagonistas de receptores muscarínicos, adrenérgicos, opióides, serotoninérgicos, além de inibidores das enzimas cicloxigenase e 5-lipoxigenase.

3.4 Transecção do nervo ciático de ratos

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com halotano, utilizando-se o vaporizador Fluovapor 1220 da marca K.Takaoka®. Realizou-se a tricotomia do aspecto lateral do membro posterior direito em todo o eixo longitudinal referente ao fêmur e inervação ciática regional. Após incisão de pele, a musculatura bíceps femural foi separada na região de transição entre o caput vertebral e o caput pélvico. Após o afastamento dos caputs citados, o nervo ciático foi exposto no terço médio da coxa, região entre a articulação coxo-femural e a trifurcação do nervo ciático (figura 4). Foi realizada a transecção do nervo ciático e a retirada de 5mm do nervo exposto (figura 5). Ao final do procedimento experimental os tecidos incisados foram suturados em camadas, utilizando-se fio de seda número 4-0.

O grupo falso operado foi constituído por animais submetidos à incisão da pele, fáscia, músculo e apenas manipulação do nervo, nas mesmas condições dos animais neurectomizados.

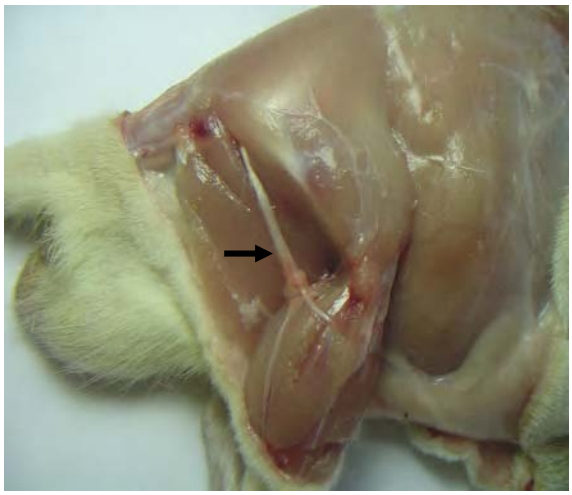


Fig 4 –Nervo ciático íntegro observado imediatamente antes da transecção (seta). Figura ilustrativa (dissecção).

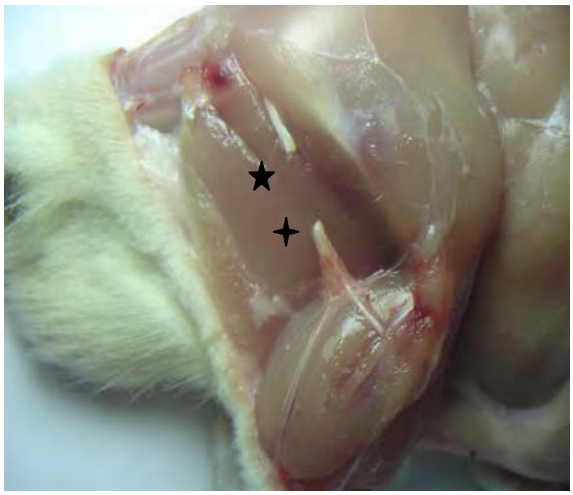


Fig 5 - Coto proximal (★) e distal (✦) do nervo ciático transeccionado. Figura ilustrativa (dissecção).

3.5 Análise histopatológica

Os animais foram eutanasiados em câmara de Co2 em diferentes tempos após a cirurgia e/ou tratamentos.

Os cotos remanescentes e a musculatura circunvizinha ao coto foram coletados e fixados em solução tamponada de formol à 10% para análise histopatológica e avaliação dos efeitos da crotoxina sobre a formação do neuroma, nos dias 1, 3, 7, 14, 21, 28, e 64 do pós-operatório. Os critérios estabelecidos para considerar a formação do neuroma foram a presença de desorganização estrutural com brotamentos axonais regenerados associados à presença de células de Schwann, erosão do perineuro, perda da arquitetura funicular e presença de fibrose intraneural (KRYGER et al., 2001).

Além disso, para análise dos possíveis efeitos tóxicos da crotoxina foram coletados o encéfalo, coração, pulmão, rim, fígado e baço. Para esta análise, foi escolhido o tratamento (ver item 3.9) no qual a crotoxina (0,01 mM) foi administrada localmente no momento cirúrgico e sucessivamente por 7 dias consecutivos, via subcutânea, na dose de 18 μg/animal em 300μl de solução salina 0.9% (SAMPAIO et al., 2003). Os órgãos coletados foram fixados em formol 10%, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes (70% até álcool absoluto), diafanizados em xilol, impregnados por parafina líquida e, finalmente, incluídos em parafina. Os blocos de parafina, de forma regular, foram cortados em micrótomo, obtendo-se cortes de 5 μm de espessura, os quais foram, subseqüentemente, corados pela hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA, 2004).

3.6 Determinação da hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile-Itália) (Figura 6), realizado de acordo com o método descrito por Randall & Sellito (1957).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado anteriormente à intervenção cirúrgica (medida inicial) e em diversos tempos (medidas finais) após a transecção do nervo ciático e/ou tratamento com crotoxina ou salina (controle).

Os resultados foram analisados pela comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, pela comparação das médias entre os diversos grupos experimentais.

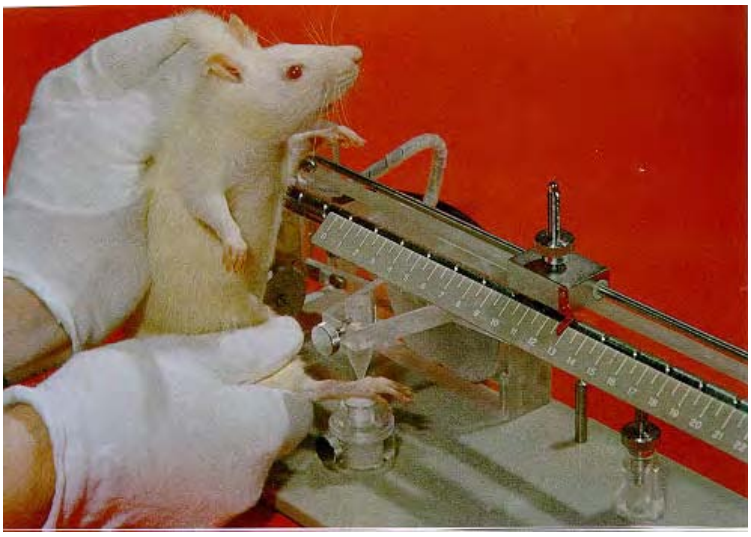


Figura 6 - Analgesímetro Ugo Basile®

3.7 Avaliação da atividade geral dos animais

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o teste do Campo Aberto (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular de 97 cm de diâmetro, pintada de branco (Figura 7).

O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais.

Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de três minutos. Os parâmetros avaliados foram:

a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena;

b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com

o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto.

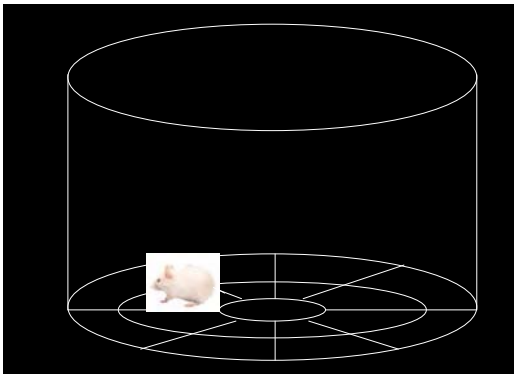


Figura 7 - Arena utilizada no Teste de Campo Aberto

3.8 Dosagem de creatinoquinase

Foi utilizada a dosagem de creatinoquinase plasmática (CK) para avaliação dos efeitos miotóxicos da crotoxina, uma vez que a miotoxicidade induz a elevação das enzimas musculares, sobretudo CK (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; DE SOUSA-E-SILVA et al., 2003; FURTADO et al., 2003).

Ratos Wistar machos foram submetidos à coleta de sangue por punção da aorta abdominal (sob anestesia inalatória) para a dosagem de CK (FURTADO et al., 2003), 4 horas após o tratamento com a toxina ou salina (controle).

Após a formação do coágulo, a amostra de sangue foi centrifugada a 3.000 r.p.m. em centrifuga refrigerada a 4ºC, sendo a atividade da creatinoquinase determinada pelo método colorimétrico básico, através da reação ADP/fosfocreatina (CK ativada com Nac; Merck-1-test, Merck, Rio de Janeiro, Brasil). Os valores de CK foram expressos em unidade internacional por litro (U/L) de soro.

3.9 Tratamentos farmacológicos

Para a padronização do tratamento com crotoxina foram realizados três diferentes procedimentos:

a) Tratamento local: os cotos proximal e distal foram tratados uma única vez com crotoxina 0,01mM (13 μg/50 μl de solução salina 0,9%) por meio de embebição dos cotos imediatamente após a transecção.

b) Tratamento diário: os cotos proximal e distal foram tratados com crotoxina 0,01mM imediatamente após a transecção e adicionalmente, realizou-se a administração subcutânea de crotoxina na dose de 18 μg/animal (SAMPAIO et al., 2001), nos 7 dias subseqüentes à cirurgia.

c) Tratamento semanal: os cotos proximal e distal foram tratados com crotoxina 0,01mM imediatamente após a transecção e adicionalmente, realizou-se a administração subcutânea de crotoxina na dose de 18 μg/animal (SAMPAIO et al., 2003), uma vez por semana, nas 3 semanas subseqüentes à cirurgia.

Animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais foram utilizados como controles.

Para caracterizar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina, foram utilizados os seguintes tratamentos:

Antagonistas de receptores muscarínicos

- Sulfato de atropina (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista de receptor muscarínico, dissolvida em salina 0,9 % e administrada na dose de 10 mg/kg por via i.p. 30 minutos antes da cirurgia.
- N metil-atropina (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista de receptor muscarínico periférico, dissolvida em salina 0,9 % e administrada na dose de 30 mg/kg por via i.p. 20 minutos antes da cirurgia. A N-metil-atropina não atravessa a barreira hematoencefálica, atuando desta forma, apenas nos receptores muscarínicos periféricos.

Antagonistas de receptores adrenérgicos

- Ioimbina (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista de receptor α_2 adrenérgico, dissolvida em salina 0,9 % e administrada na dose de 2 mg/kg por via i.p. 15 minutos antes da cirurgia.
- Atenolol (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista de receptor β adrenérgico, dissolvido em salina 0,9 % e administrado na dose de 1 mg/kg por via i.p. 30 minutos antes da cirurgia.

Antagonista de receptor serotoninérgico

- Metisergida (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista de receptor 5-HT, dissolvida em salina 0,9 % e administrada na dose de 5 mg/kg por via i.p. 30 minutos antes da cirurgia.

Antagonista de receptor opióide

- Naloxona (RBI/Sigma Chemical CO., EUA), antagonista inespecífico de receptor opióide, dissolvida em salina 0,9 % e administrada na dose de 1 mg/kg por via i.p. 105 minutos após a cirurgia.

Inibidor da enzima 5-lipoxigenase

- Zileuton (Abbot Lab. North Chicago), inibidor seletivo da via da 5-lipoxigenase, dissolvido em solução hidroalcoólica 10 %, e administrado na dose de 100 mg/kg por via p.o. 60 minutos antes da cirurgia.

Inibidor da ciclooxigenase

- Indomentacina (RBI/Sigma Chemical Co., EUA,.), inibidor da ciclooxigenase, dissolvida em Tris (1M, pH 8,0) e administrada 60 minutos antes da cirurgia na dose de 4 mg/kg por via i.v.

Controles

- Grupos controles receberam salina 0,9 % ou solução hidroalcoólica 10 % ou Tris (1M, pH 8,0) nas mesmas condições do grupo experimental correspondente.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (SNEDECOR et al., 1946) associado ao teste de Tukey (SOKAL e ROHLF, 1981), para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p<0,05$.

4 Resultados

4.1 Caracterização de hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático

A transecção do nervo ciático acarretou diminuição do limiar de dor dos animais, em relação à medida inicial, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Este fenômeno foi observado a partir da 2ª hora após a cirurgia (Fig 8A), permanecendo pelo menos até o 64º dia do pós-operatório (Fig 8B). Os animais do grupo controle (grupo não neurectomizado) não apresentaram alteração significativa do limiar de dor durante todo o período de observação.

Uma vez que os animais foram avaliados no teste de pressão de patas de ratos na 2ª hora após a cirurgia, foi necessário determinar se a anestesia com halotano realizada durante a cirurgia, poderia estar interferindo com a resposta motora dos animais neste teste. Assim, um experimento controle adicional foi realizado, no qual animais normais foram submetidos ao procedimento anestésico e então avaliados no teste de pressão de pata, 2 e 24 horas após a anestesia. Os resultados demonstraram que o procedimento anestésico não interferiu com o limiar de dor dos animais quando comparado à medida inicial (Fig 9).

Nas figuras 8a, 8b e 9, os valores basais (tempo 0) foram obtidos imediatamente antes do procedimento anestésico.

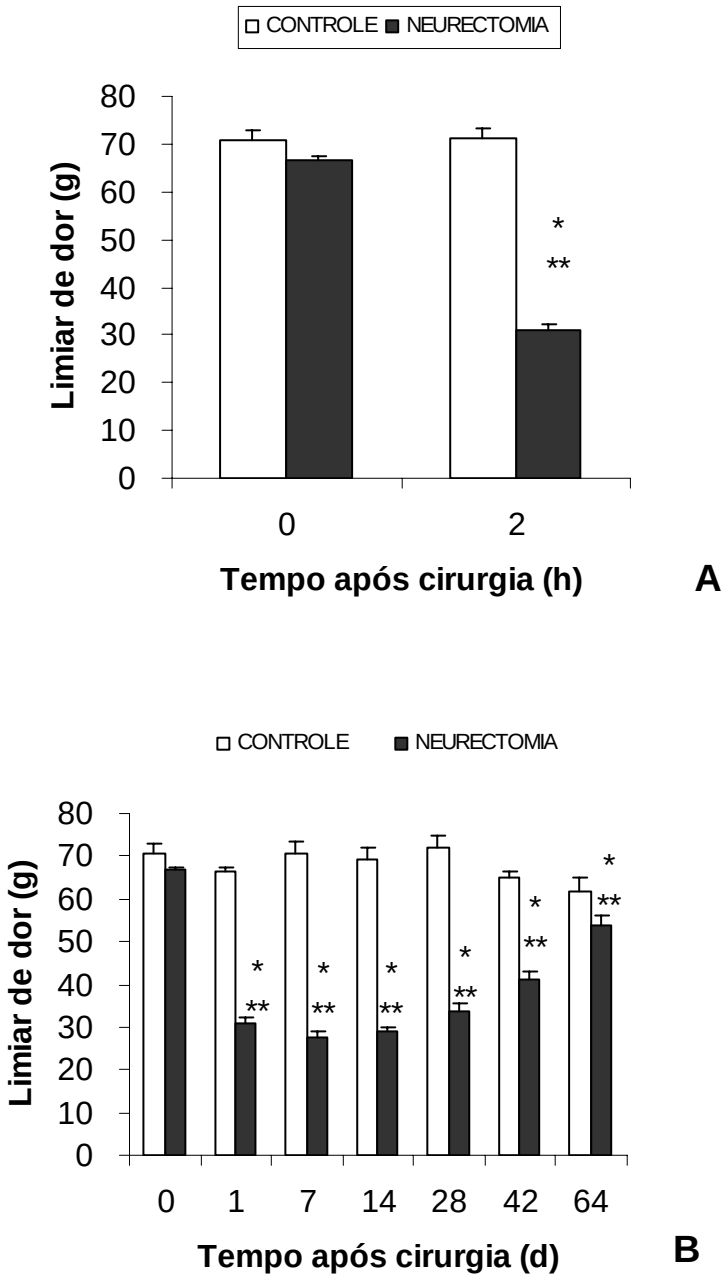


Figura 8 - Caracterização da hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático de ratos. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para indução de retirada da pata. As medidas foram realizadas imediatamente antes da cirurgia (tempo 0) e 2 h (Fig 8A) ou 1, 7, 14, 28, 42, e 64 dias (Fig 8B) após a cirurgia. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 21 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (tempo 0) e **p<0,05 por comparação com o grupo controle (grupo não neurectomizado).

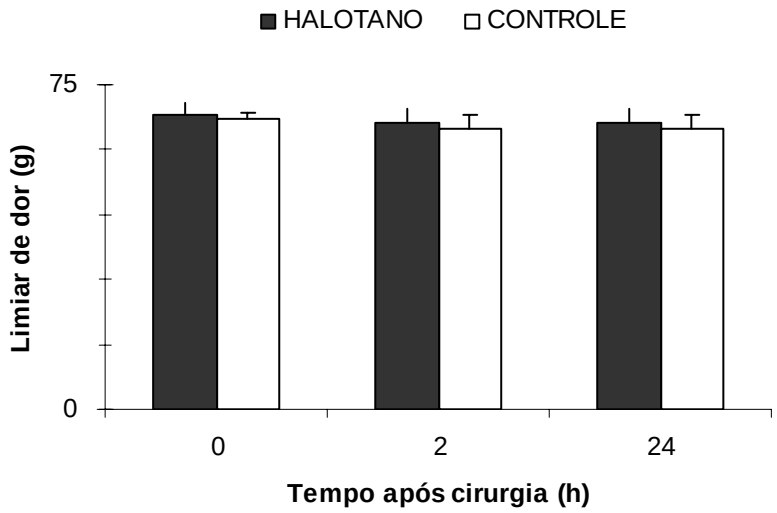


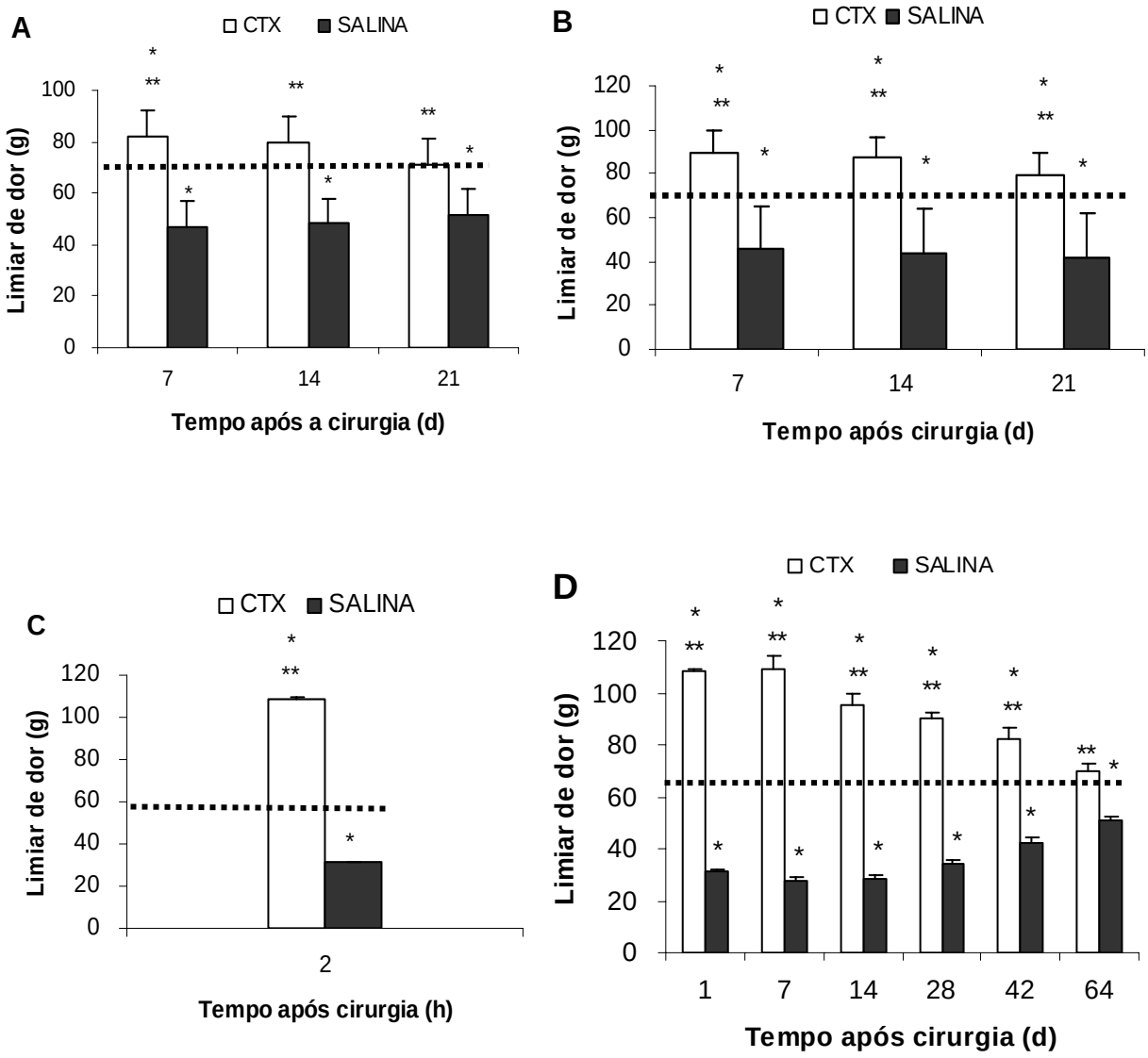
Figura 9- Avaliação do efeito da anestesia inalatória por halotano sobre o limiar de dor dos animais. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. As medidas foram realizadas previamente (tempo 0) e na 2ª e 24ª hora após o procedimento da anestesia. A anestesia foi induzida por halotano e o grupo controle foi constituído por animais não submetidos à anestesia inalatória, sendo apenas manipulados. Os resultados estão expressos como média ± epm de 5 animais por grupo.

4.2 Caracterização do efeito da crotoxina sobre a hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático de ratos

Inicialmente foram utilizados 3 esquemas de tratamento com a crotoxina: a) aplicação local (crotoxina 0,01 mM) associada a uma aplicação diária (18 μg/animal) por via subcutânea, durante os 7 dias subseqüentes à cirurgia (Fig 10A); b) aplicação local (crotoxina 0,01 mM) associada a uma aplicação semanal (18 μg/animal) por via subcutânea, durante 3 semanas (Fig 10 B e C) aplicação local e única de crotoxina 0,01 mM nos cotos proximais e distais durante a transecção do nervo ciático (Fig 10 C e D).

Todos os tratamentos utilizados reverteram a hiperalgesia acarretada pela transecção do nervo ciático (10 A, B, C e D). Adicionalmente ao efeito anti-hiperalgésico, a crotoxina acarretou o aumento do limiar de dor dos animais, em relação à medida basal.

Uma vez que todos os tratamentos utilizados foram eficazes em causar analgesia, optou-se para os estudos subseqüentes pela aplicação única de crotoxina local. De acordo com os dados apresentados na figura 10 C e D, o efeito antinociceptivo da crotoxina, para este tratamento, foi detectado 2 h após a cirurgia e permanecendo por todo o período de obervação.



Figuras 10A, 10B, 10C e 10D - Efeito da crotoxina sobre a hiperalgesia induzida pela transecção do nervo ciático. O limiar de dor foi determinado pelo teste de pressão de pata e está representado como a força (em gramas) necessária para a indução da retirada da pata (Fig 10 A, 10 B, 10 C e 10 D). As medidas foram realizadas previamente (tempo 0) à cirurgia e subseqüentemente à partir da 2ª hora após a cirurgia (Fig 10 C), no 7º, 14º, 21º dia após a cirurgia (Fig 10 A, 10 B), e por todo o período do experimento 1º, 7º, 14º, 28º, 42º, e 64º dia após a cirurgia (10 D). A crotoxina 0,01 mM foi aplicada uma única vez nos cotos proximais e distais imediatamente após a transecção do nervo (10 C, 10 D). Aplicações de crotoxina no coto transeccionado associada à doses diárias (7 dias) e doses semanais (7 semanas) estão representadas nas figuras 10 A e 10 B respectivamente. Os animais controle foram tratados com salina 0,9 % nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 8 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (tempo 0) e **p<0,05 por comparação com o grupo controle.

4.3 Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da crotoxina

Para avaliar a possível toxicidade da crotoxina, foram analisadas a atividade motora dos animais no teste de campo aberto, a indução de efeito miotóxico por meio da determinação da liberação da enzima creatinoquinase e foram realizadas análises histopatológicas de alguns órgãos dos animais submetidos ao tratamento com a crotoxina.

Para estas análises, à exceção da determinação da enzima creatinoquinase, foi escolhido um dos esquemas de tratamento prolongado com a crotoxina, caracterizado pela instilação da toxina nos cotos, imediatamente após a transecção do nervo, associada à administração de crotoxina subcutânea, uma vez ao dia, durante os 7 dias subseqüentes à cirurgia.

4.3.1 Efeito da crotoxina sobre a atividade geral dos ratos submetidos à transecção do nervo ciático

Neste teste, os animais foram avaliados 2 h após a última dose de crotoxina. O tratamento com a crotoxina não alterou as freqüências de levantar e de locomoção dos animais, quando comparado aos animais tratados com salina (grupo controle) nas mesmas condições experimentais (Fig 11).

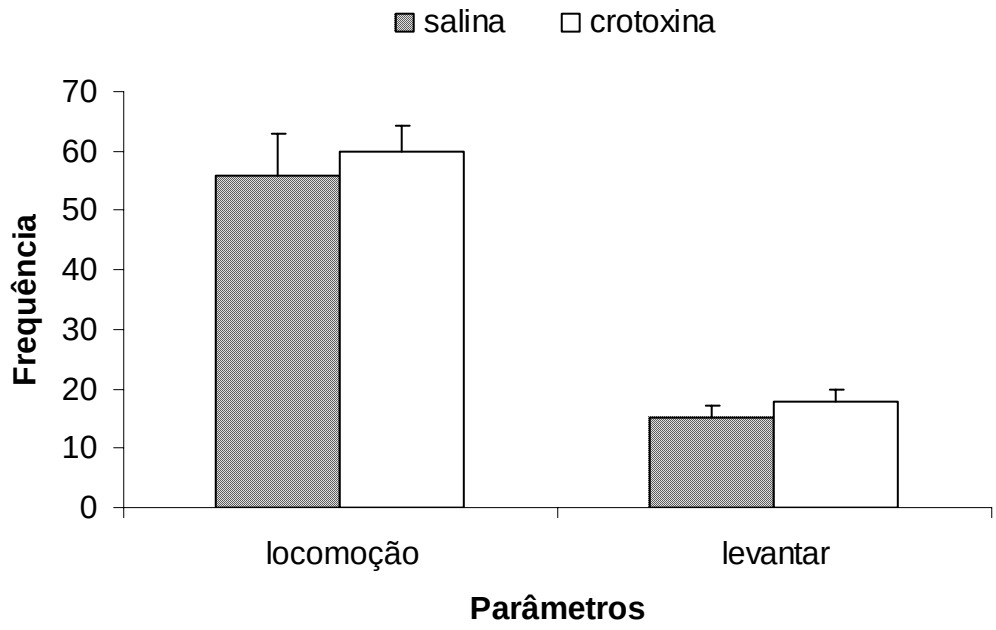


Figura 11 – Efeito da crotoxina sobre a atividade motora dos ratos. As freqüências de locomoção e levantar foram determinadas no teste do Campo Aberto por um período de 10 minutos. A crotoxina 0,01 mM foi administrada localmente no momento da cirurgia, seguido de 7 aplicações subseqüentes por via subcutânea (18 µg/animal). O grupo controle recebeu salina 0,9 % nas mesmas condições experimentais. O teste foi realizado 2 h após a administração da ultima dose de crotoxina ou salina. Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.3.2 Efeito da crotoxina sobre os níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK)

Os resultados mostram que a crotoxina na dose utilizada, não interfere com os níveis de CK, quando comparado aos animais tratados com salina (Fig 12).

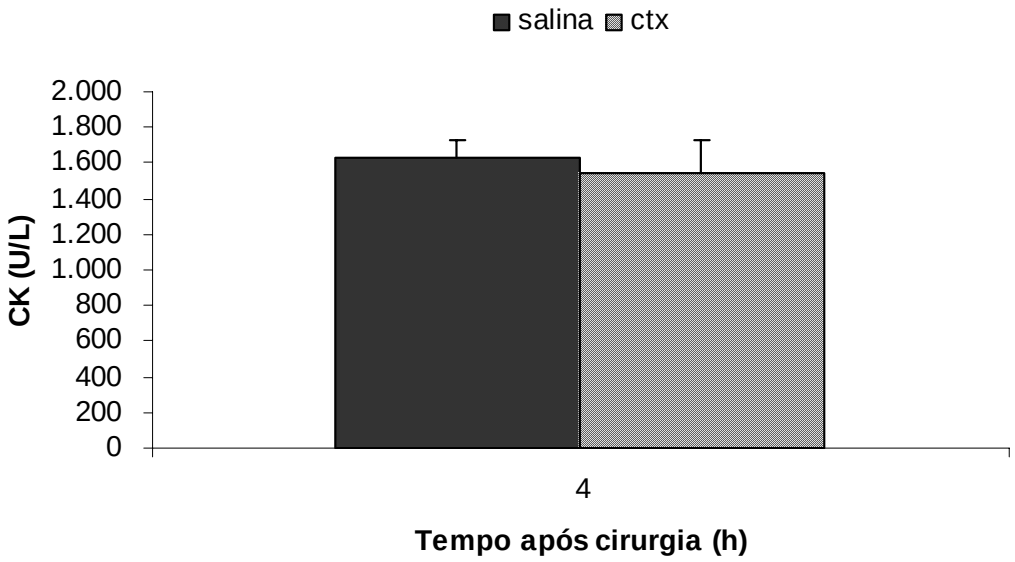


Figura 12 – Efeito da crotoxina nos níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK). A crotoxina 0,01 mM foi administrada localmente no momento da cirurgia, O grupo controle recebeu salina 0,9 % nas mesmas condições experimentais. O teste foi realizado 4 h após a administração da crotoxina ou salina. Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.4 Análise histopatológica dos órgãos

Neste estudo, foram avaliados o cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rim. A coleta dos órgãos foi realizada 12 h após a última dose de crotoxina (tratamento b, item 3.9). As análises indicam que a toxina não acarretou alterações teciduais significativas nos órgãos analisados, quando comparado ao grupo controle.

4.4.1 Análise histopatológica dos cotos do nervo ciático submetidos à transecção

Para a caracterização do desenvolvimento do neuroma, amostras do coto proximal do nervo ciático submetido à transecção foram coletadas e submetidas à avaliação histopatológica à partir do 1º dia do pós-cirúrgico. As análises foram realizadas nos cotos obtidos de animais tratados com salina (controle) ou crotoxina 0,01 mM (Fig 13 a 21).

A transecção do nervo ciático acarretou em necrose axonal, que no grupo tratado com salina foi detectado até o 3º dia do pós-operatório (Fig 13 e 14), enquanto no grupo tratado com crotoxina esta alteração permaneceu além do 7º dia (Fig 19).

A fase inicial da regeneração axonal (brotamentos) foi observada no grupo salina a partir do 3º dia (Fig 14).

O inicio da formação do neuroma ocorreu à partir do 7º dia do pós-operatório para grupo salina (Fig 15) e no 14º dia para o grupo crotoxina (Fig 20), sendo que no grupo salina observou-se 50% a mais de neuromas nas amostras quando comparado com o grupo crotoxina no dia 14º dia do pós operatório.

Os resultados obtidos indicam a ocorrência de um retardo na formação do neuroma no grupo tratado com a crotoxina em relação ao grupo salina. Contudo, 64 dias após a cirurgia, não houve diferença no percentual de animais com neuroma entre o grupo tratado com crotoxina (77%) e o grupo salina (80%) (Fig 17 e 21).

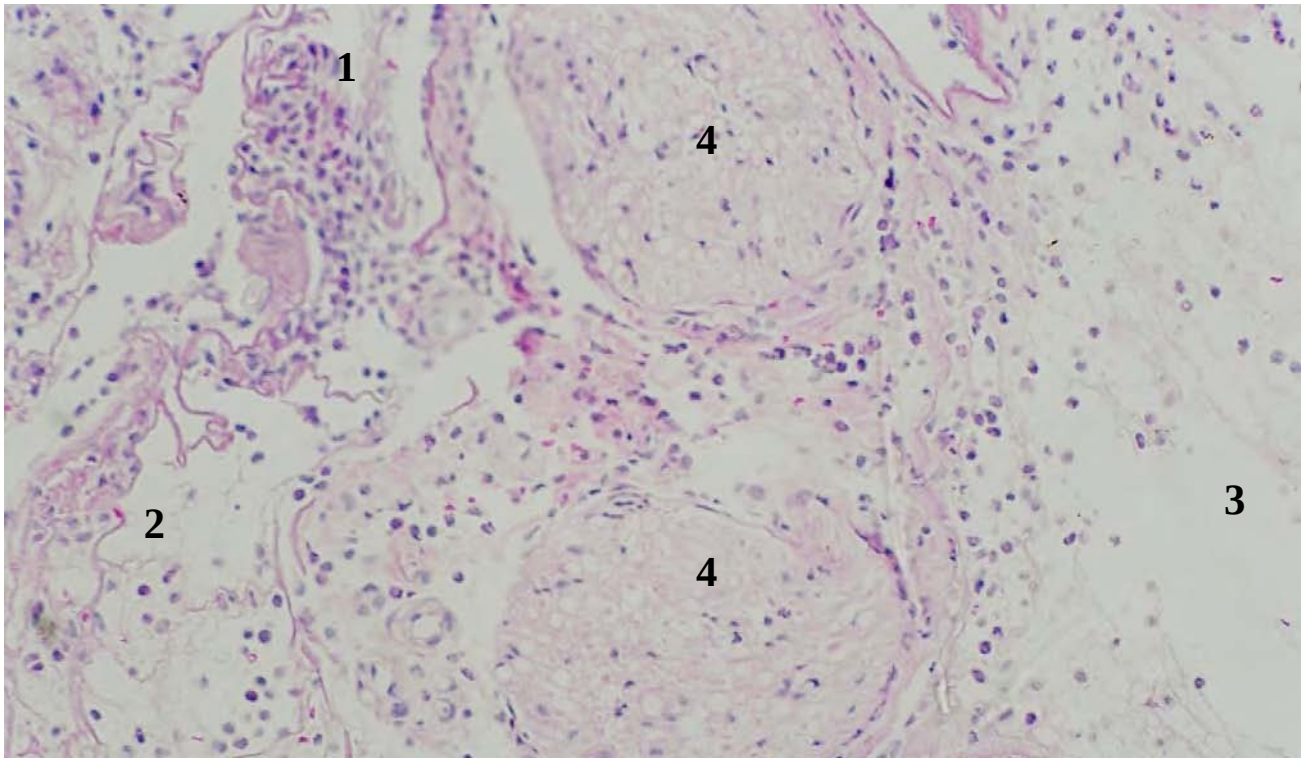


Figura 13 : Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 1º dia após a cirurgia. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório com predominância de células polimorfonucleares (1), necrose axonal (2) e edema focal (3). Nota-se também nervo (4) no campo de estudo. HE 20x

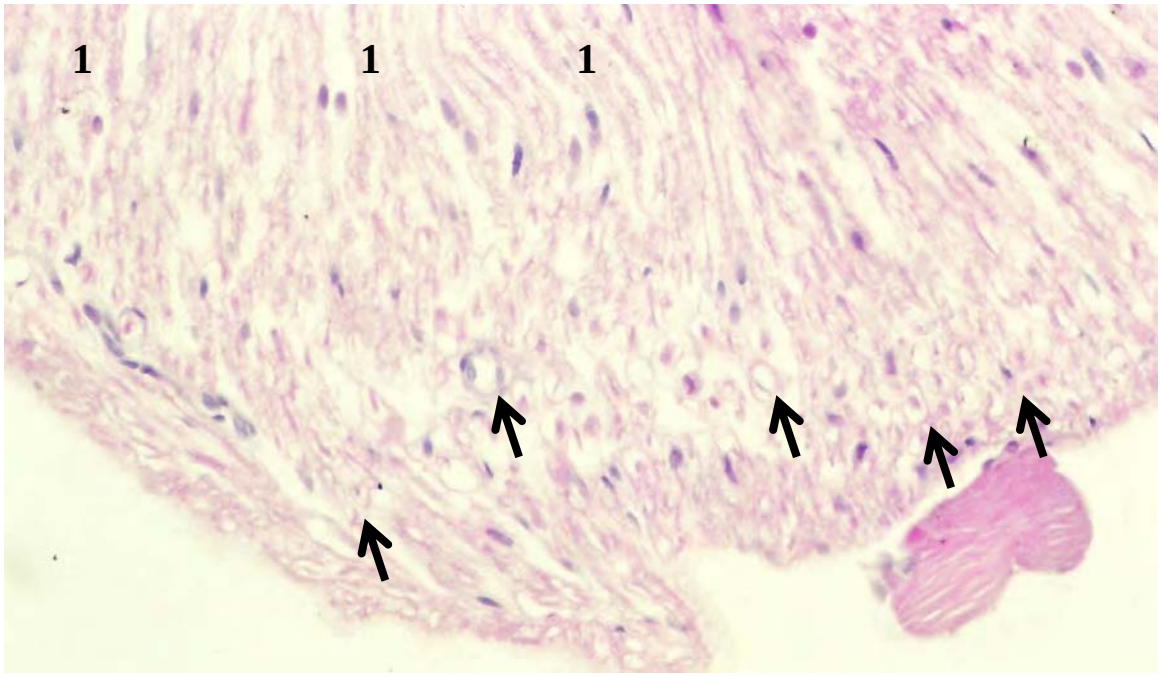


Figura 14 : Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 3º dia após a cirurgia. Observa-se a presença de axônios normais (1) em comparação com áreas de degeneração Walleriana (formação de vacúolos no coto do nervo ciático neurectomizado) (setas). HE 25x.

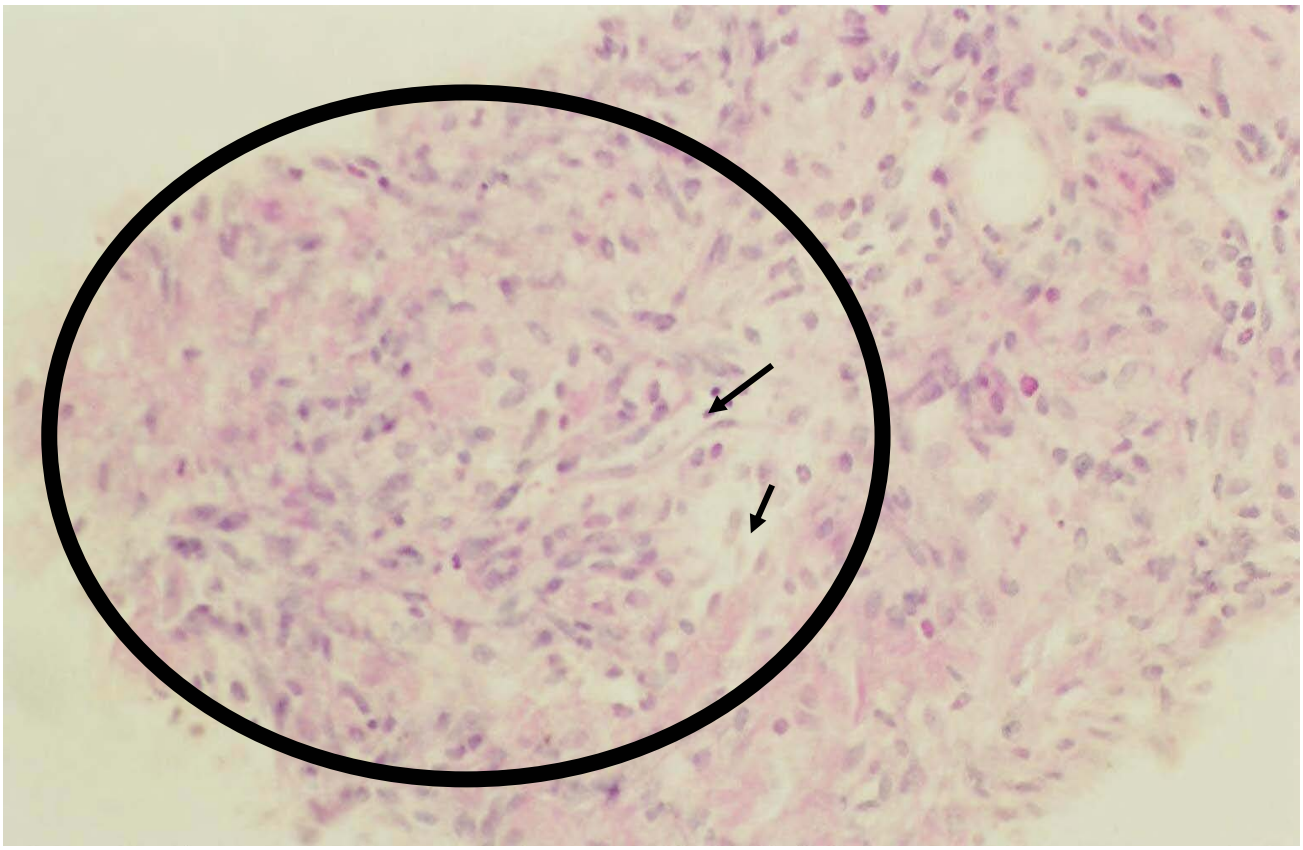


Figura 15: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 7º dia após a cirurgia. Área de regeneração. Observa-se a formação do neuroma, com regeneração axonal desorganizada (setas) e proliferação de células de Schwann (círculo). HE, 20x.

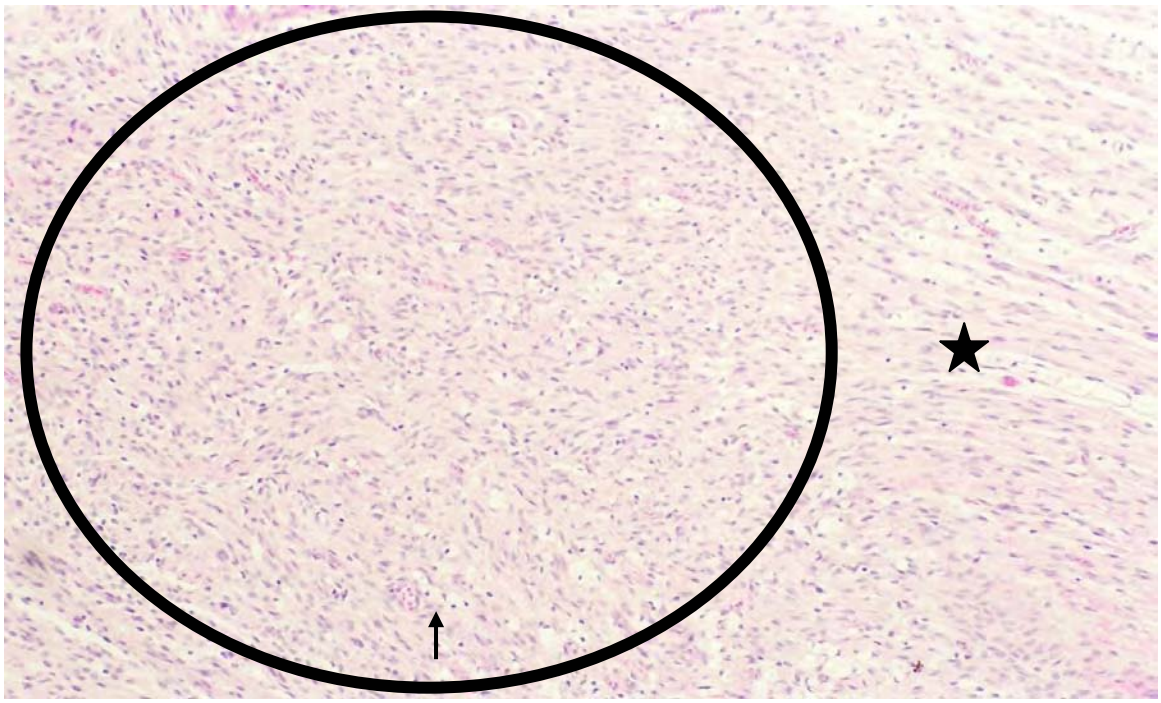


Figura 16: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 14º dia após a cirurgia. Observa-se a formação de neuroma e proliferação celular organizada (círculo), com axônio mielinizado presente (seta) e área com axônios organizados (★).HE, 10x.

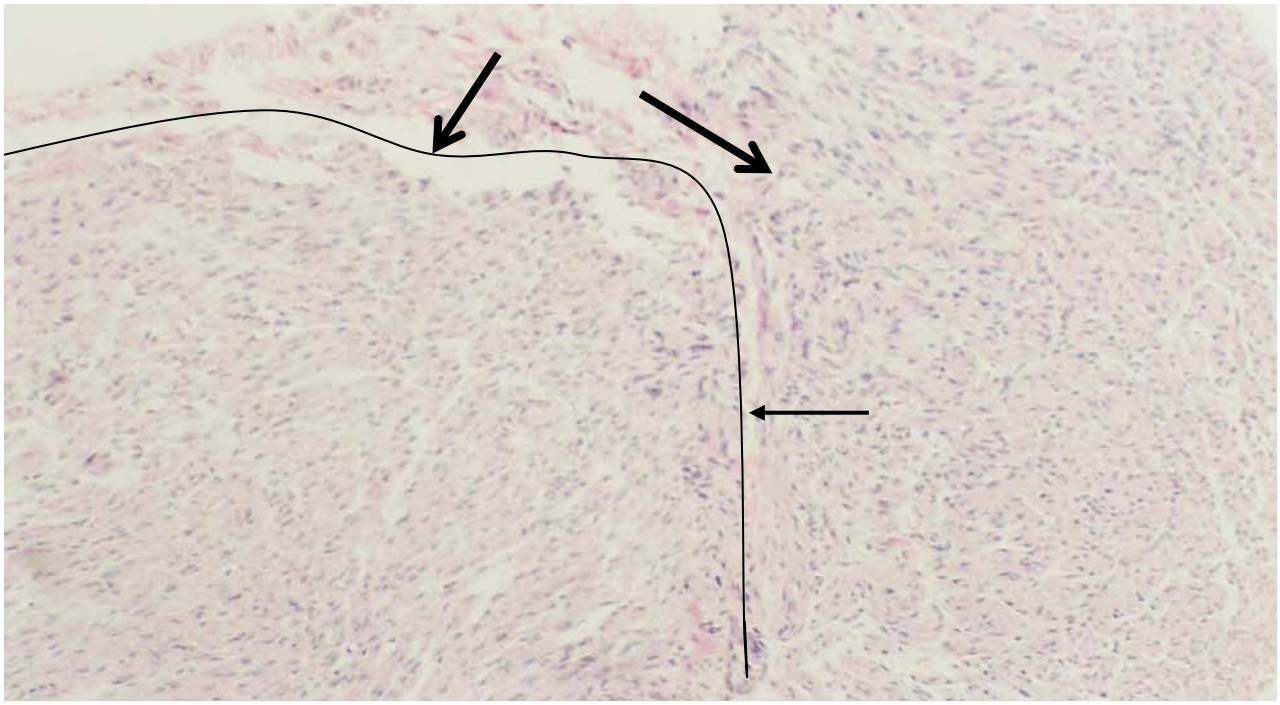


Figura 17: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com salina no 64º dia após a cirurgia. Observa-se a formação de neuroma (área delimitada). Observa-se a delimitação do perineuro, com neuroma organizado e formação de fascículos (setas). HE 10x.

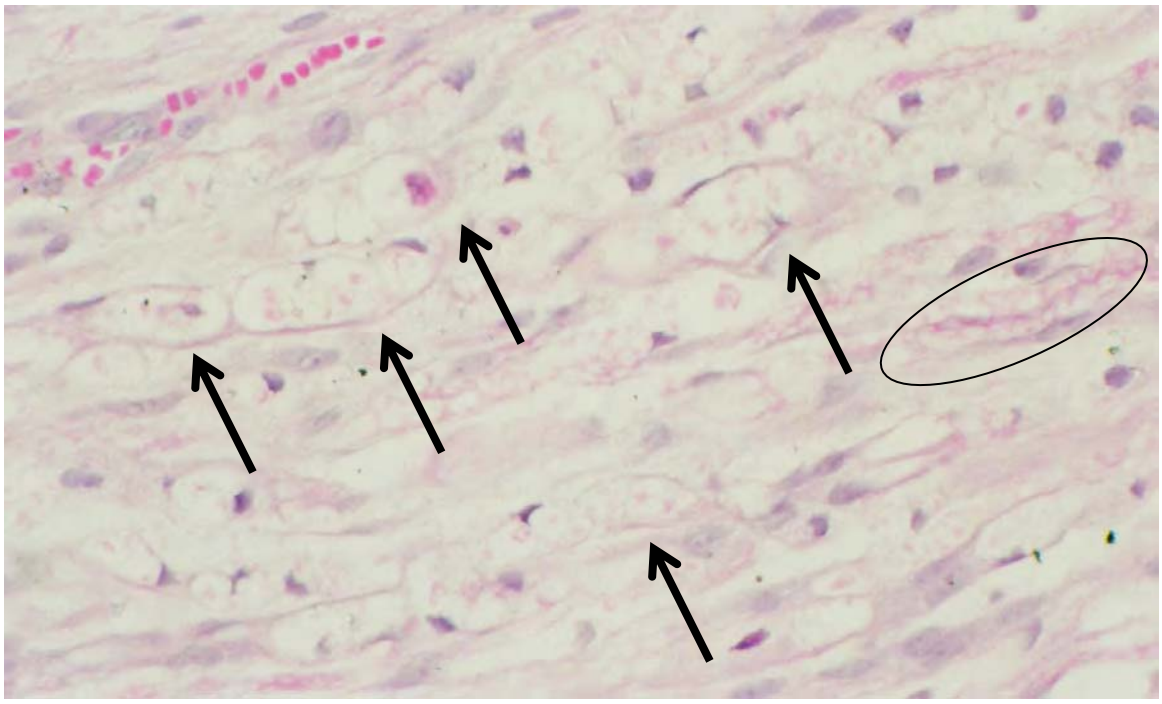


Figura 18 : Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 3º dia após a cirurgia. Presença de degeneração Walleriana, onde se observa a formação de vacúolos com fragmentos de mielina em seu interior, também denominados “digestive chambers” (seta), em comparação com axônio íntegro (círculo).HE, 40x.

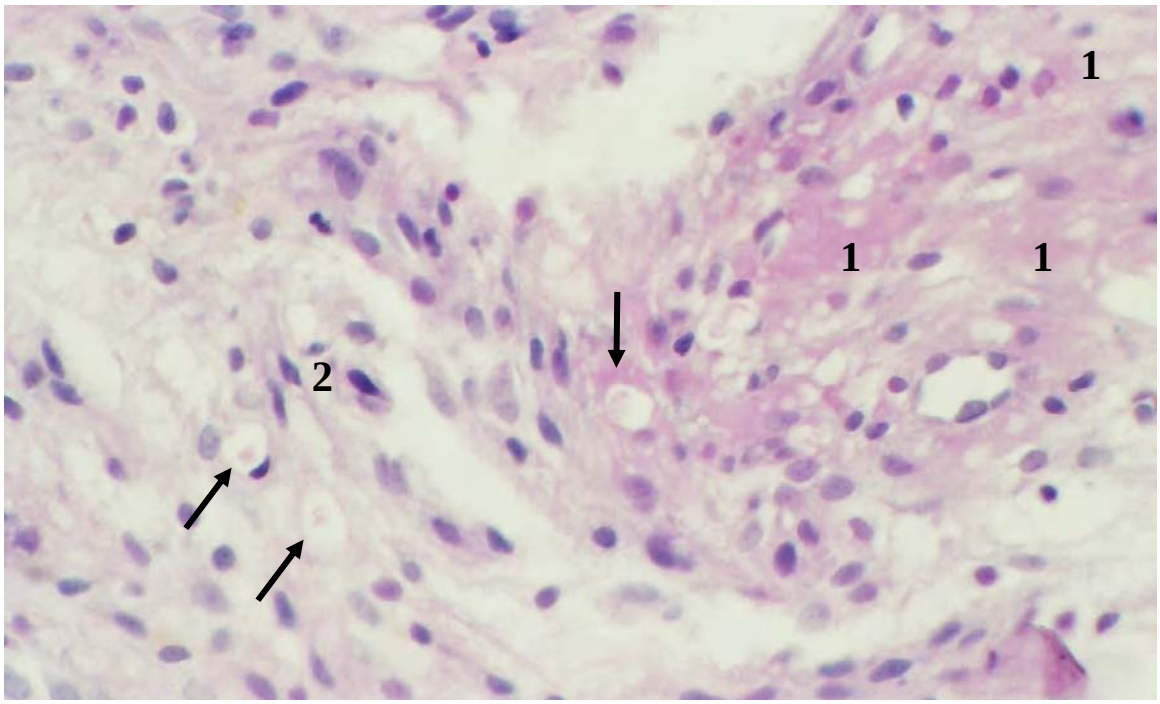


Figura 19: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 7º dia após a cirurgia. Observa-se a presença de necrose focal (região 1), degeneração Walleriana (setas) e discreto infiltrado inflamatório (região 2). HE, 40x.

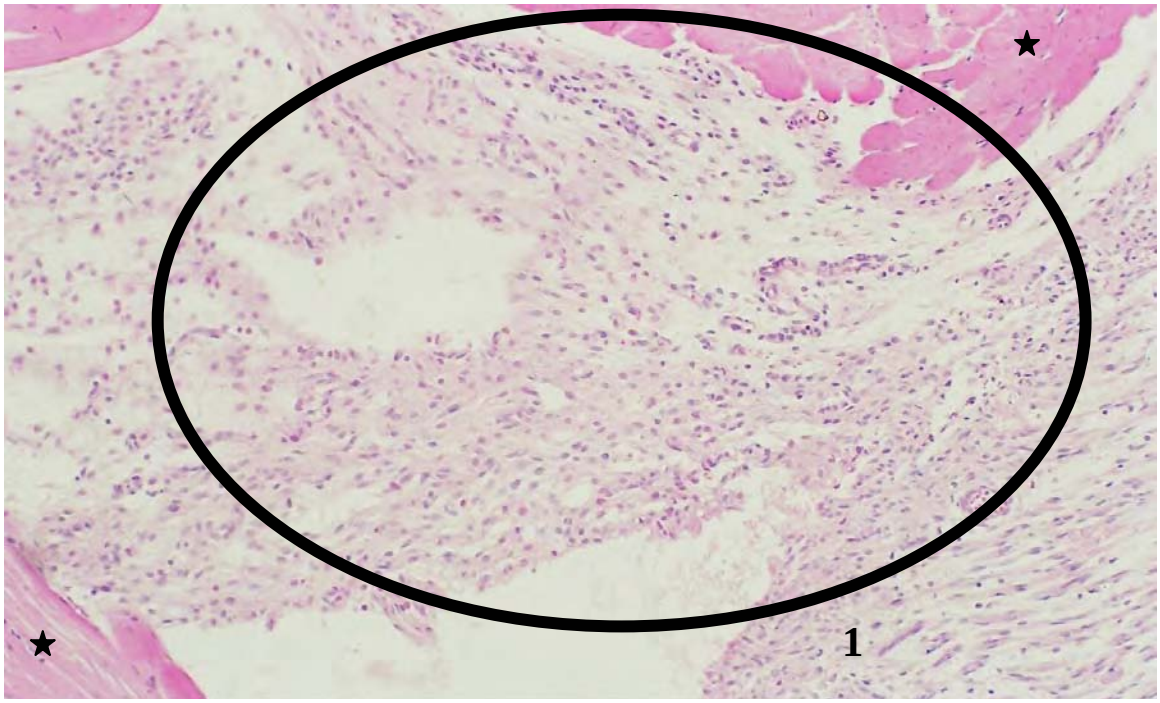


Figura 20: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 14º dia após a cirurgia. Observa-se a presença de regeneração axonal e proliferação celular desorganizada (círculo) na porção distal do coto proximal do nervo ciático (seta), e fibras musculares (★). Notam-se axônios íntegros em área não lesada (região 1). HE, 10x.

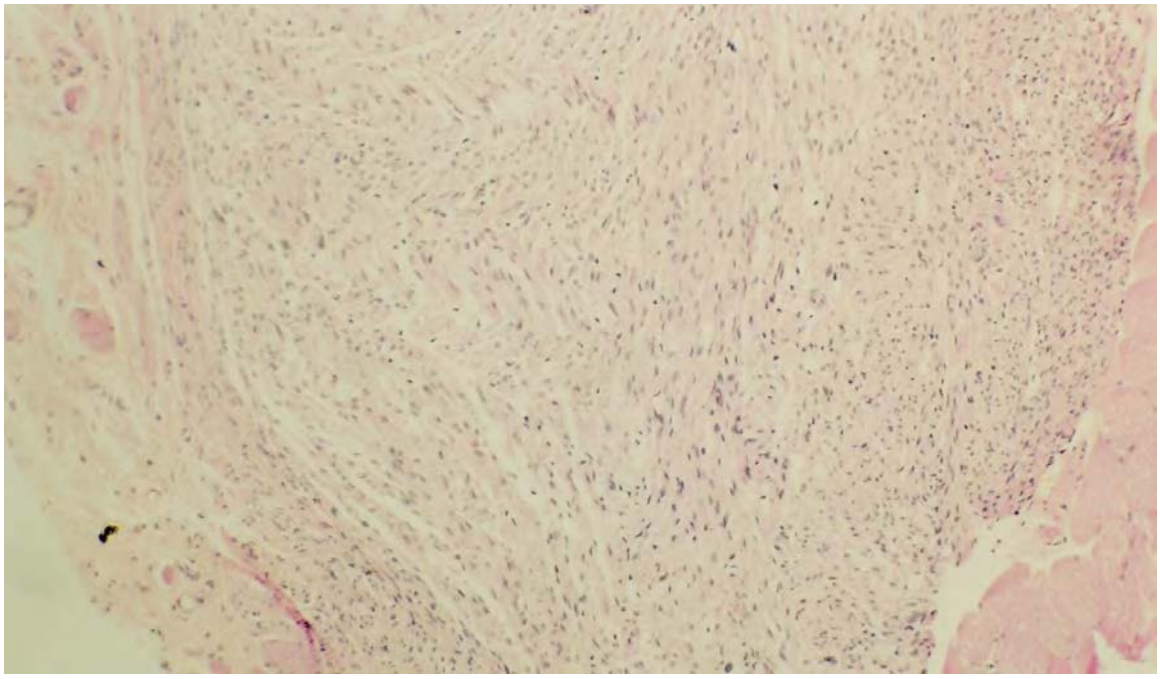


Figura 21: Análise histopatológica do coto proximal de nervo ciático tratado com crotoxina no 64º dia após a cirurgia. Observa-se a formação de neuroma (área delimitada por setas). HE, 10x.

4.5 Caracterização dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina

Nestes estudos, o efeito dos antagonistas de receptores e inibidores enzimáticos sobre a antinocicepção promovida pela crotoxina foi avaliado no tempo de 2 h e 24 h após o tratamento com a crotoxina.

4.5.1 Avaliação do envolvimento de receptores serotoninérgicos

A metisergida, um antagonista de receptor serotoninérgico administrada 30 minutos antes da cirurgia reverteu parcialmente (46%) a ação antinociceptiva na 2ª hora após o tratamento com a crotoxina. A metisergida ¨per se¨ não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo. O tratamento com salina (controle) não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotoxina (Fig 22).

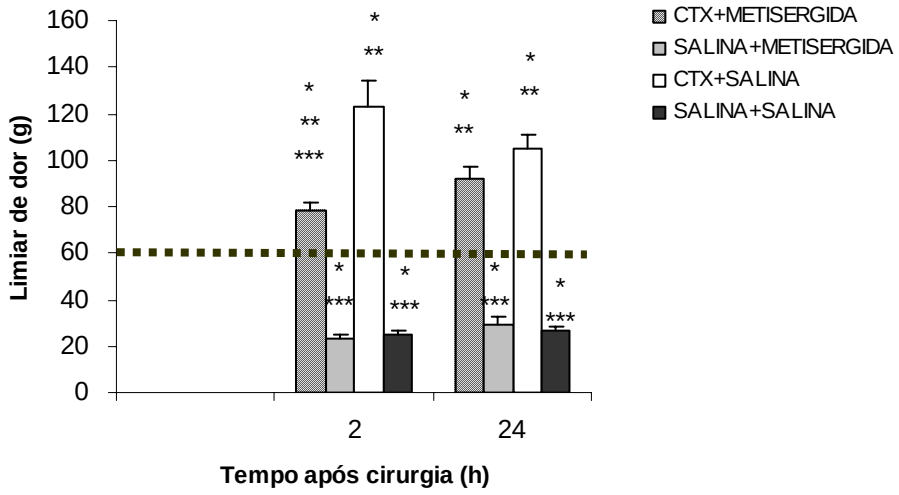


Figura 22 – Efeito da metisergida na antinocicepção produzida pela crotoxina. O limiar de dor está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. A metisergida foi injetada na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal, 30 minutos antes da cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial, ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina) e *** p<0,05 por comparação com o grupo (ctx+salina).

4.5.2 Avaliação do envolvimento de receptores opióides

O tratamento com naloxona, um antagonista inespecífico de receptor opióide não interferiu significativamente com o efeito antinociceptivo da crotoxina em nenhum dos tempos analisados. A naloxona "per se" não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo. A administração de salina (controle) por via i.p. não interferiu com o efeito da crotoxina (Fig 23).

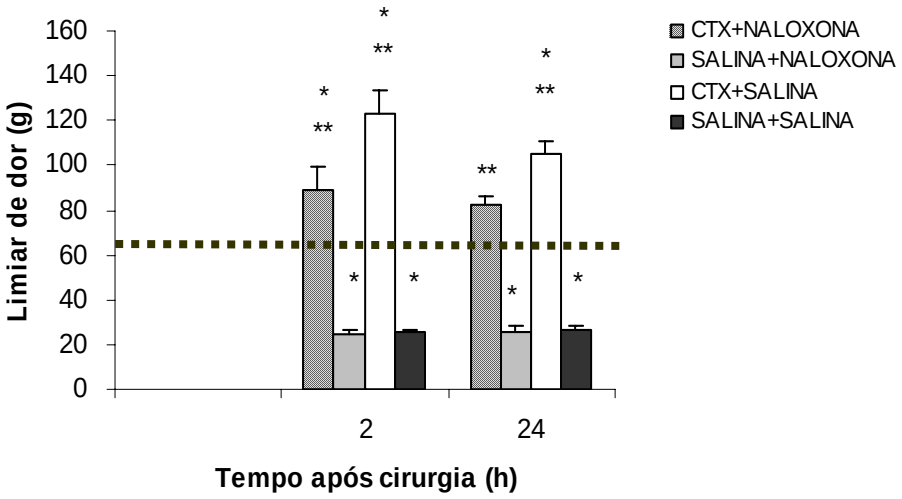


Figura 23 – Efeito da naloxona na antinocicepção promovida pela crotoxina. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. A naloxona foi injetada na dose de 1 mg/kg por via intraperitoneal, 105 minutos após a cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial e ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina).

4.5.3 Avaliação do envolvimento de receptores adrenérgicos

4.5.3.1 Estudo da participação de receptores α-adrenérgicos.

A ioimbina, um antagonista de receptor α-adrenérgico, administrado 15 minutos antes da cirurgia, inibiu parcialmente (51%) o efeito antinociceptivo na 2ª hora após o tratamento com a crotoxina A ioimbina "per se" não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O tratamento com salina i.p. (controle) não alterou o efeito antinociceptivo da crotoxina (Fig 24).

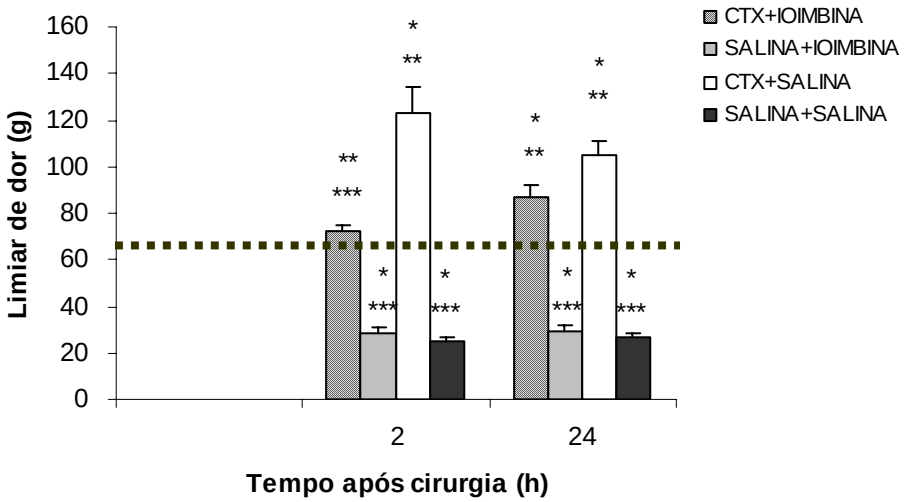


Figura 24 – Efeito da ioimbina na antinocicepção promovida pela crotoxina. O limiar de dor representativo do fenômeno da hiperalgesia está demonstrado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. O antagonista (ioimbina) foi injetado na dose de 2 mg/kg por via intraperitoneal, 15 minutos antes da cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina sob as mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial, ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina) e *** p<0,05 por comparação com o grupo (ctx+salina).

4.5.3.2 Avaliação do envolvimento de receptores β-adrenérgicos

O tratamento com atenolol, um antagonista de receptor β-adrenérgico não interferiu significativamente com o efeito antinociceptivo da crotoxina em nenhum dos momentos avaliados. O antagonista "per se" não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O tratamento com salina i.p. (controle) não alterou o efeito analgésico da crotoxina (Fig 25)

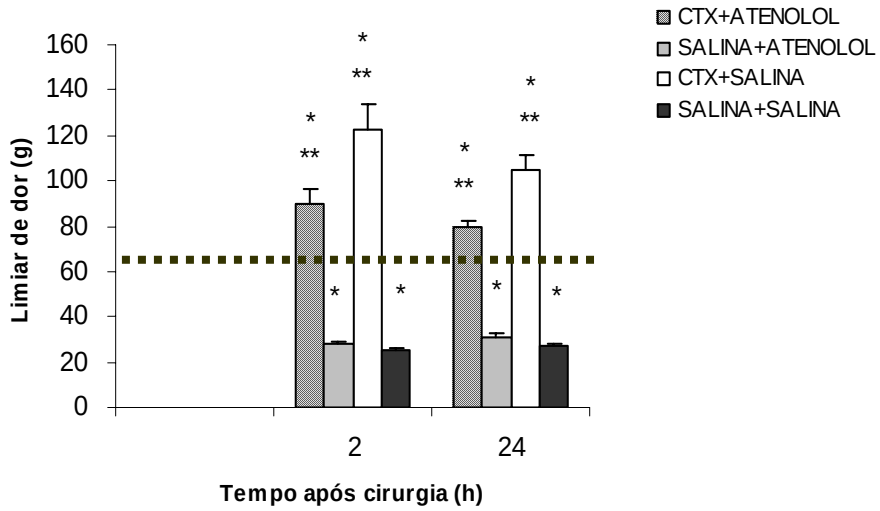


Figura 25 – Efeito do atenolol na antinocicepção produzida pela crotoxina. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. O atenolol foi injetado via intraperitoneal na dose de 1 mg/kg, 30 minutos antes da cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial, ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina).

4.5.4 Avaliação do envolvimento de receptores muscarínicos

O tratamento com sulfato de atropina, um antagonista de receptores muscarínicos, administrado 30 minutos antes da cirurgia, reverteu o efeito antinociceptivo na 2ª hora após o tratamento com a crotoxina. O antagonista "per se" interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O tratamento com salina i.p. (controle) não alterou o efeito analgésico da crotoxina (Fig 26).

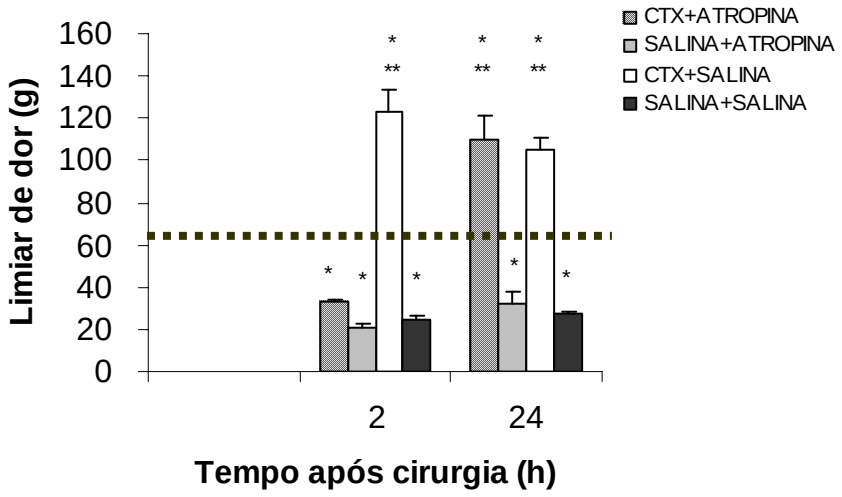


Figura 26 – Efeito do sulfato de atropina sobre a analgesia produzida pela crotoxina. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. O sulfato de atropina foi injetado na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, 30 minutos antes da cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial e ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina).

Uma vez que a atropina reverteu totalmente o efeito analgésico da crotoxina na 2ª hora após a administração da toxina, este antagonista foi novamente administrado 24 h após a aplicação da crotoxina e o limiar de dor dos animais avaliado novamente 150 minutos após. Os resultados mostram que o antagonista reverteu novamente o efeito antinociceptivo da crotoxina (Fig 27).

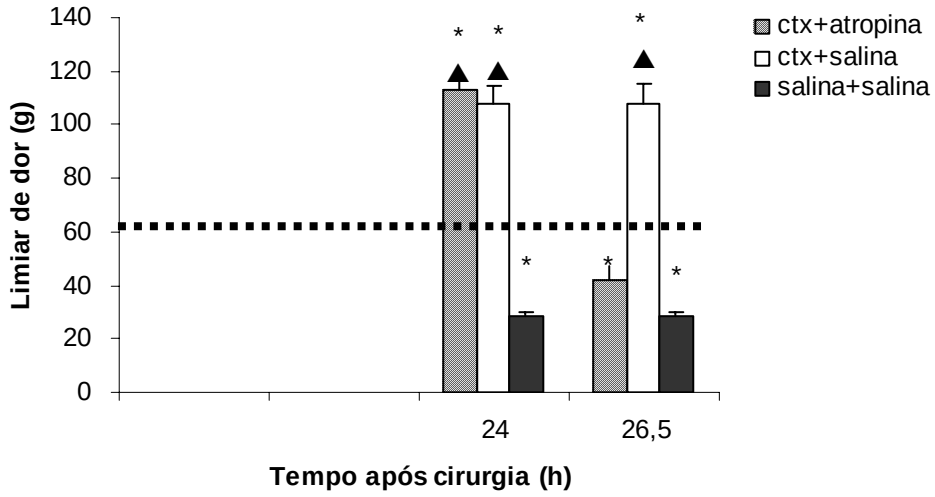


Figura 27 - **Efeito do sulfato de atropina administrado 24 h após a cirurgia sobre a analgesia produzida pela crotoxina.** O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 24 e 26,5 h após a cirurgia. O sulfato de atropina foi injetado na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, 24 h após a cirurgia. Na 24 h, o teste de pressão de pata foi aplicado imediatamente antes da administração do antagonista. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial e ▲ p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina).

Com o intuito de melhor caracterizar o envolvimento de receptores muscarínicos na antinocicepção promovida pela crotoxina, foi nosso objetivo utilizar a N-metil-atropina, um antagonista de receptores muscarínicos periféricos.

Os resultados mostram que a N-metil-atropina não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotoxina. O antagonista "per se" não modificou a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O tratamento com salina i.p. (controle) não alterou o efeito analgésico da crotoxina (Fig 28). Estes dados em conjunto indicam que receptores muscarínicos centrais estão envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina.

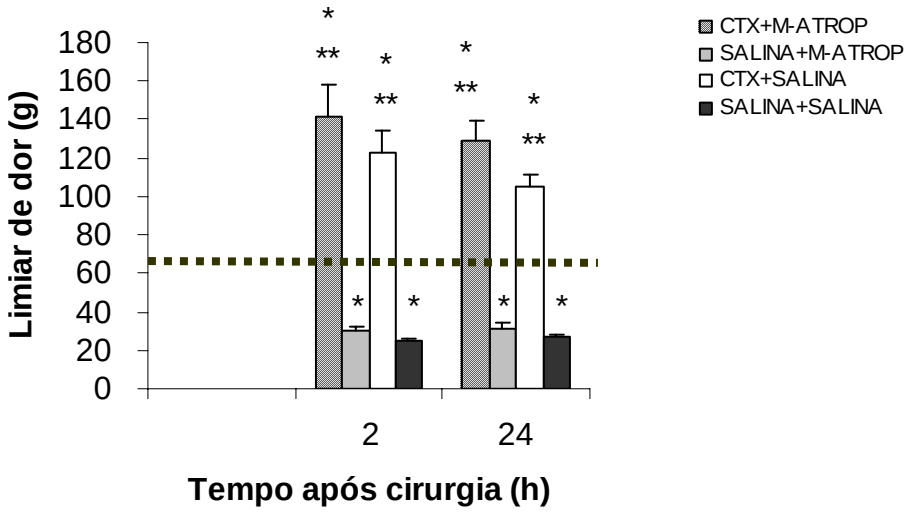


Figura 28 – Efeito da N-metil-atropina sobre a analgesia produzida pela crotoxina. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. A N-metil-atropina foi injetada na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal, 20 minutos antes da cirurgia. O grupo controle foi constituído por animais tratados com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial, ** p<0,05 por comparação com o grupo (salina+salina).

4.5.5 Avaliação do envolvimento de mediadores derivados da via da 5-lipoxigenase

O zileuton, um inibidor da via da 5-lipoxigenase inibiu o efeito antinociceptivo da crotoxina na 2ª hora após o tratamento (Fig 29). O zileuton "per se" não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O veículo administrado por via oral, não modificou o efeito antinociceptivo da crotoxina

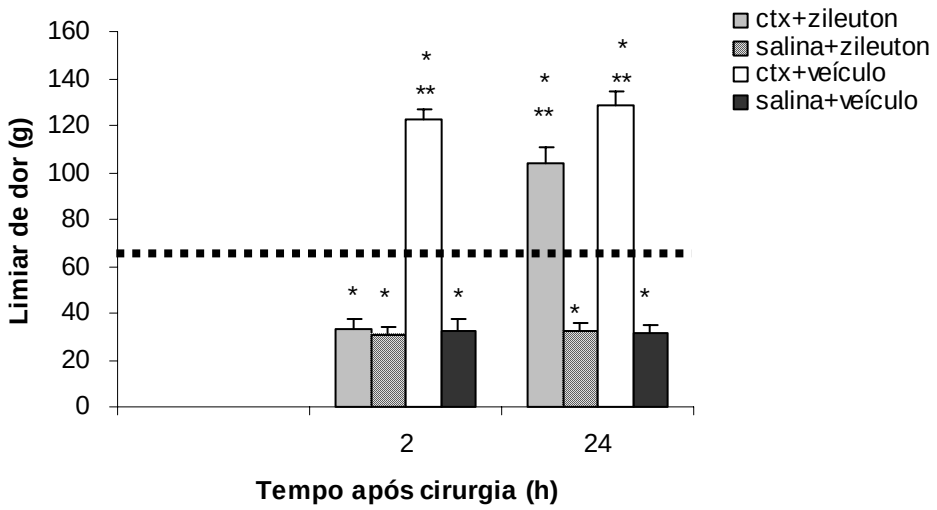


Figura 29 – Efeito do zileuton sobre a antinocicepção produzida pela crotoxina. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. O zileuton foi administrado na dose de 100 mg/kg por via oral 60 minutos antes da cirurgia. O grupos controles estão representados pelos animais tratados com o veículo utilizado para a diluição da droga (solução hidralcoólica 10 %). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (tempo 0) e **p<0,05 por comparação com o grupo salina tratado com veículo.

4.5.6 Avaliação do envolvimento de mediadores derivados da via da cicloxigenase

O tratamento com indometacina, um inibidor da via da cicloxigenase, não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotoxina durante o período de observação. O inibidor "per se" não interferiu com a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático. O veículo administrado por via endovenosa não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotoxina (fig 30).

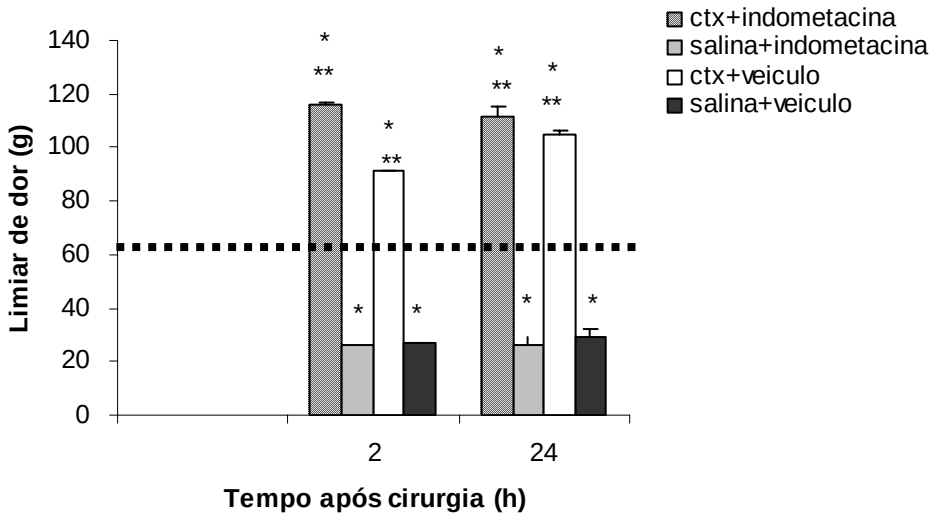


Figura 30 - Avaliação do envolvimento de medidores da via da cicloxigenase. O limiar de dor está representado como a força (em gramas) necessária para a retirada da pata. A crotoxina (CTX 0,01 mM) foi aplicada diretamente nos cotos proximal e distal, imediatamente após a transecção do nervo ciático. Os resultados expressam as medidas obtidas 2 e 24 h após a cirurgia. A indometacina foi administrada na dose de 4 mg/kg por via endovenosa 60 minutos antes da cirurgia. Os grupos controles estão representados pelos animais tratados com o veículo (Tris 1M pH 8,0) utilizado para a diluição da droga. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. de 7 animais por grupo. A linha tracejada representa a média das medidas iniciais obtidas antes da cirurgia. *p<0,05 por comparação com a medida inicial (tempo 0) e **p<0,05 por comparação com o grupo salina tratado com veículo.

5 DISCUSSÃO

A injúria de nervos periféricos em humanos, resulta, muitas vezes, em dor neuropática crônica, caracterizada por hiperalgesia (exacerbação da dor em resposta a estímulos lesivos), dor espontânea em queimação e alodinia (dor em resposta a estímulos não lesivos) (DWORKIN et al., 2003; PAYNE e NORFLEET, 1986), com significativo impacto na qualidade de vida destes pacientes.

A dor neuropática, definida pela IASP (International Association for the Study of Pain) como uma dor originada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso, pode ser considerada um dos maiores desafios no complexo e intrigante universo das dores de natureza crônica, uma vez que mais de um terço dos pacientes não respondem de forma eficaz às drogas disponíveis no mercado (MCMAHON e KOLTZENBURG, 2006; OSSIPOV e PORRECA, 2005).

A lesão nervosa resulta muitas vezes na formação do neuroma, o qual é conseqüência do grau de injúria nervosa associada à condição e ambiente oferecidos para a regeneração do tecido lesado. Neuromas podem ser fontes de descargas aferentes noradrenérgicas (WALL et al., 1979) e descargas de natureza ectópicas. Um grande número de tratamentos e técnicas vêm sendo propostos na prevenção do desenvolvimento do neuroma (VERNADAKIS et al., 2003). Tratamentos químicos, estímulos elétricos transcutâneos, materiais sintéticos e/ou autólogos no sítio de reparo cirúrgico e diferentes técnicas cirúrgicas têm sido empregados para minimizar a possível formação do neuroma ou mesmo para o tratamento de um neuroma já instalado (MACKINNON, 1989; MACKINNON et al., 1992; MATHEWS e OSTERHOLM,

1972; OMER, 1981; PAYDARFAR e PANIELLO, 2001; VERNADAKIS et al., 2003; WU e CHIU, 1999).

Dados de literatura são sugestivos de que a crotoxina, uma neurotoxina derivada do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeito antinociceptivo, antiinflamatório e imunorregulatório (CARDOSO et al., 2001; CARDOSO e MOTA, 1997; GIORGI et al., 1993; SAMPAIO et al., 2001; SOUSA-E-SILVA, 1996). Em relação às ações antinociceptivas, estudos têm mostrado que esta toxina administrada por via s.c., i.p. ou diretamente no SNC, inibe a resposta nociceptiva dos animais em modelos experimentais de dor fásica e tônica (BRIGATTE, 2005; ZHANG et al., 2006). Apesar destes dados, não havia sido determinado ainda o efeito da crotoxina sobre a dor neuropática. Assim, foi nosso objetivo investigar o efeito desta toxina sobre a dor neuropática induzida experimentalmente pela transecção do nervo ciático de ratos.

Para tanto, foi necessário inicialmente, padronizar este modelo, determinando, por meio de análises histopatológicas, as alterações morfológicas do nervo lesado e, por meio de estudos comportamentais, o aparecimento de hiperalgesia, um dos fenômenos que caracterizam a dor neuropática.

Assim, no presente estudo, para a caracterização da lesão nervosa foi avaliada a instalação e formação do neuroma no coto proximal do nervo seccionado.

Usualmente após a ocorrência de lesão periférica, o processo regenerativo das fibras lesadas pode apresentar diferentes respostas em função da própria fisiopatologia da injúria (GOLDBERG, 2003; MAGGI et al.,

2003; SUNDERLAND, 1951). Uma das alterações possíveis é a emissão desordenada de brotamentos axonais a partir do coto proximal em busca de seu alvo distal, objetivando o processo regenerativo final (CARLTON et al., 1991; LINDENLAUB e SOMMER, 2000; MAGGI et al., 2003; MATHEWS e OSTERHOLM, 1972; SAID et al., 1984).

No presente estudo, a transecção do nervo ciático acarretou alterações histopatológicas condizentes com o processo de uma injúria nervosa periférica, com a presença de infiltrado inflamatório, edema e necrose, seguida da presença de degeneração Walleriana e de vacúolos com mielina “digestive chambers”. A partir do 7º dia, a presença de regeneração axonal desorganizada associada à presença de células de Schawnn, erosão do perineuro, fibrose e perda de arquitetura em 50% das amostras indicam a formação do neuroma. A presença destas alterações no 7º dia para amostras do grupo controle (salina) indicam o período inicial da formação do neuroma neste modelo, estando as alterações histopatológicas aqui observadas de acordo com os dados apresentados por Kryger e colaboradores (2001). No 64º dia do pós-operatório, 80% das amostras apresentaram neuromas organizados, valores estes que também correspondem aos encontrados por Kryger e colaboradores (2001) em seus estudos.

Para a caracterização da dor neuropática foi investigada a presença de hiperalgesia prolongada, um dos fenômenos que caracterizam este tipo de dor (CAVIEDES e HERRANZ, 2002; DWORKIN et al., 2003; LINDENLAUB e SOMMER, 2000). A hiperalgesia foi determinada pelo método de pressão de pata de ratos que emprega um estímulo mecânico (pressão em gramas),

aplicado sobre o dorso da pata dos animais. Neste teste, o limiar de dor dos animais é definido como a força necessária para induzir a retirada da pata.

A hiperalgesia, definida como aumento da sensibilidade à dor, foi detectada neste modelo, pela diminuição do limiar de dor dos animais após a transecção do nervo ciático dos ratos. O fenômeno de hiperalgesia foi detectado 2 horas após a cirurgia e persistiu por todo o período de observação (64 dias). Não foi detectada alteração do limiar de dor na pata contralateral (dados não mostrados).

A hiperalgesia é um fenômeno observado também em outros modelos de lesão nervosa. Assim, Lindenlaub and Sommer (2000) em modelo de transecção parcial, Eliav et al. (1999) em modelos de neurite, Bennett (1993) em modelo de transecção nervosa, Seltzer et al. (1990) em modelos de ligaduras firmes do nervo ciático, e Bennett and Xie (1988) em modelo de constricção crônica do nervo ciático de ratos, observaram o desenvolvimento de hiperalgesia prolongada.

As alterações do limiar de dor dos animais, detectadas 2 h após a cirurgia, não foram originadas de possíveis alterações motoras ou comportamentais decorrentes da anestesia por halotano, uma vez que nos experimentos controle em que os animais normais foram submetidos à anestesia inalatória pelo halotano, não foram detectadas alterações deste limiar quando comparado com os valores obtidos antes da anestesia.

Uma vez caracterizado o modelo de neuropatia, iniciamos o estudo da ação da crotoxina, analisando o possível efeito da toxina sobre o desenvolvimento do neuroma e a hiperalgesia.

Para avaliação destas ações, a crotoxina foi administrada por diferentes vias e periodicidade. Foram realizadas aplicações locais e únicas no coto transeccionado (crotoxina 0,01 mM) ou então, a administração local associada a aplicações subcutâneas diárias (durante 7 dias) ou semanais (uma vez por semana, durante 3 semanas) na dose de 18 μg/animal.

Os resultados obtidos mostram que não houve diferença entre os três tratamentos utilizados quanto ao efeito da crotoxina sobre a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático, uma vez que tanto a aplicação única direta da toxina sobre os cotos proximal e distal, quanto as injeções subcutâneas diárias ou semanais da toxina em associação à instilação direta da crotoxina nos cotos do nervo, foram capazes de reverter, de maneira similar, esta hiperalgesia.

É importante salientar que além do efeito antihiperalgésico, a crotoxina acarretou também o aumento do limiar de dor dos animais em relação às medidas basais obtidas antes da cirurgia. Ainda, o efeito analgésico da crotoxina é de longa duração uma vez que foi detectado por pelo menos 64 dias após o tratamento.

Os resultados mostrando que a crotoxina inibe a hiperalgesia em modelo de dor neuropática indicam que esta toxina apresenta efeito antinociceptivo, o que está de acordo com os dados recentes de Zhang e colaboradores (2006), evidenciando o efeito antinociceptivo desta toxina, administrada por via intraperitoneal (ratos e camundongos), intra-cerebro-ventricular (camundongos) e por microinjeções na substância cinzenta periaquedutal (ratos), em modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, um modelo de dor inflamatória e nos modelos de placa quente em camundongos e tail flick em

ratos, modelos de dor fásica. Adicionalmente, Brigatte (2005) demonstrou o efeito antinociceptivo da crotoxina em modelo de dor de câncer produzido em ratos.

Uma vez que a crotoxina apresenta propriedades neurotóxicas e miotóxicas e o modelo utilizado para avaliação de nocicepção emprega resposta motora, foi nosso objetivo avaliar se o tratamento com a crotoxina estaria causando alterações que pudessem interferir com a resposta dos animais ao teste de pressão de pata. Para esta avaliação utilizamos o teste do campo aberto, no qual não foram observadas alterações nos parâmetros de locomoção e levantar dos ratos submetidos à neurectomia total do nervo ciático e tratados localmente com crotoxina 0,01 mM. Estes resultados demonstram que o efeito antinociceptivo da crotoxina não é decorrente de alterações da atividade motora dos animais. Estes resultados corroboram aos dados obtidos por Zhang e colaboradores (2006), os quais não observaram alterações na atividade dos animais avaliados no “Animex test”, após a administração sistêmica da crotoxina.

Foram também avaliados outros parâmetros indicativos de possível toxicidade da crotoxina. A ingestão de água e comida não foram alterados pelo tratamento, quando comparado o período pré (dias que antecedem a cirurgia) e pós-operatório (semana subseqüente à mesma) destes animais, com um consumo médio de 135 ml de água e 16,5 pellets de ração por grupo (5 animais/período de 24 h).

Ainda, em relação ao ganho de peso individual destes grupos não foram detectadas diferenças entre o grupo crotoxina e o grupo controle (salina), uma

vez que os animais de ambos os grupos apresentaram uma média de peso em torno de 452 gramas/animal ao final do experimento (64 dias).

Baseado em estudos de que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeito miotoxico (BRAZIL, 1972; DE SOUSA-E-SILVA et al., 2003; SALVINI et al., 2001) que as principais fibras musculares acometidas são as fibras oxidativas do tipo I e IIa (SALVINI et al., 2001), avaliamos se a crotoxina, a qual apresenta efeito neurotóxico e miotóxico, estaria induzindo miotoxicidade nos ratos submetidos à neurectomia. Para tanto, foram dosados os níveis de CK nos animais tratados com crotoxina 0,01 mM local. Os resultados obtidos indicam que a crotoxina nestas condições experimentais, não induz efeitos miotóxicos uma vez que não foram detectados diferenças significativas nos níveis plasmáticos da enzima, em comparação com os animais controles.

Na seqüência dos estudos foi nosso objetivo avaliar possíveis alterações em órgãos como o cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rim de animais submetidos à série de tratamentos com crotoxina (local associada a 7 aplicações subcutâneas). Os resultados indicam que nessas mesmas condições experimentais, a toxina não causou alterações histológicas nestes órgãos.

Cabe ressaltar que a neurectomia em ratos acarreta usualmente o fenômeno de autotomia (CHUDLER e DONG, 1983; WALL et al., 1979; ZELTSER et al., 2000). Em nossas condições experimentais, foi observado que 70 % dos animais tratados com salina apresentaram autotomia, sendo os maiores percentuais entre a 1ª (12 %), 2ª (18 %) e 3ª (14 %) semanas, com declínio destes valores até o final do experimento. Estes percentuais estão de

acordo com os relatos apresentados por Zeltser et al (2000), indicando a segunda semana do pós-cirúrgico como o período de maior ocorrência de autotomia. Dos animais tratados com crotoxina, 53 % apresentaram autotomia, uma redução de 17% em relação ao grupo controle (dados não mostrados), contudo não houve diferença no início deste fenômeno entre ambos os grupos.

As análises histopatológicas demonstraram que a crotoxina foi capaz de retardar o processo inicial de formação do neuroma por 7 dias, uma vez que neste período o grupo tratado com a toxina apresentou áreas de necrose, infiltrado inflamatório e proliferação celular. Apenas no 14º dia do experimento, as amostras do grupo crotoxina passaram a apresentar áreas de proliferação celular e regeneração axonal desorganizada. No 64º dia do experimento, os grupos salina e crotoxina apresentaram percentuais semelhantes de amostras com neuroma (80 % e 77 %, respectivamente). Não temos até o momento, dados que possam explicar os mecanismos envolvidos no retardo da formação do neuroma causado pela crotoxina.

Usualmente, para que haja a formação do neuroma, é necessário que após a injúria nervosa ocorra a instalação de resposta inflamatória (ZOCHODNE et al., 1994). Adicionalmente, o envolvimento de macrófagos e linfócitos na gênese da alterações nervosas observadas após lesão é sugerida por dados experimentais mostrando, em modelo de transecção do nervo ciático em ratos, que a inibição do infiltrado de macrófagos e linfócitos T no local da injúria previne sinais e sintomas induzidos pela transecção do nervo (OKUDA et al., 2006). Vários dados de literatura têm demonstrado que a crotoxina é capaz de interferir com o componente vascular e celular das respostas imune e inflamatória, inibindo a função de macrófagos, como espraiamento e fagocitose

e de linfócitos, como proliferação e síntese de anticorpos (SAMPAIO et al., 2003). A crotoxina é ainda capaz de interferir com a resposta imune mediada por linfócitos Th2 (RANGEL-SANTOS et al., 2004; ZAMBELLI, 2006). Adicionalmente, Castro e colaboradores (2007) mostraram recentemente que a crotapotina, uma das subunidades da crotoxina, inibe o infiltrado inflamatório mononuclear no nervo ciático de animais submetidos à neurite autoimune. Pelos dados apresentados, podemos sugerir que o retardo no aparecimento do neuroma após o tratamento com a crotoxina pode ser decorrente da inibição da função de linfócitos e macrófagos presentes no microambiente da injúria nervosa, aumentando o tempo da resposta inflamatória aguda e retardando a regeneração.

O efeito da crotoxina foi detectado 2 h após o tratamento e mostrou ser de longa duração, persistindo por um período de 64 dias.

Além de retardar a formação do neuroma, a crotoxina, como discutido anteriormente, inibiu a hiperalgesia causada pela transecção do nervo ciático de ratos. Assim, na continuidade destes estudos investigamos alguns dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da toxina.

Dados de literatura têm mostrado que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* induz analgesia em seres humanos e também quando avaliado em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRAZIL, 1934; BRIGATTE, 2005; BRIGATTE et al., 2001; GIORGI et al., 1993; GUTIERREZ, 2005; PICOLO et al., 2003; PICOLO et al., 2000a). Nestes modelos experimentais, o efeito analgésico do veneno, administrado por via oral, é mediado pela ativação de receptores opióides do tipo κ e δ (BRIGATTE, 2005; GIORGI et al., 1993; GUTIERREZ, 2005; PICOLO et al., 2003; PICOLO et al., 2000b).

Em decorrência destes dados, investigamos a participação de receptores opióides na antinocicepção induzida pela crotoxina.

Nesta avaliação utilizamos a naloxona, um antagonista inespecífico de receptores opióides. Nossos dados indicam que estes receptores não estão envolvidos na analgesia produzida pela crotoxina, uma vez que a naloxona não foi capaz de interferir com o efeito anti-hiperalgésico da toxina. Estes resultados corroboram com os dados de Zhang e colaboradores (2006) os quais mostraram que receptores opióides não estão envolvidos no efeito antinociceptivo da crotoxina em modelos de dor aguda e estão de acordo também com os dados apresentados por Brigatte (2005) demonstrando que receptores opióides não estão envolvidos na antinocicepção promovida pela crotoxina em modelo de dor de câncer.

Dados de literatura demonstram que a crotoxina, uma β-neurotoxina, promove o bloqueio pré-sináptico da transmissão neuromuscular, por interferir com a liberação da acetilcolina dos terminais nervosos, por meio de um mecanismo em três etapas (depressão, facilitação e bloqueio definitivo) (BON, 1989; RADVANYI e BON, 1984; VITAL- BRAZIL, 1972).

Neurotransmissores tais como acetilcolina, histamina, GABA, glicina e opióides estão relacionados no SNC, com a modulação das vias descendentes inibitórias da dor. No corno dorsal da medula espinhal, o sistema colinérgico apresenta seu corpo celular nas lâminas III, V e X, sendo os efeitos da acetilcolina mediados por receptores muscarínicos e nicotínicos presentes neste sítio medular. Receptores muscarínicos ativados promovem a inibição de neurônios de projeção submetidos à estímulos nociceptivos (MCMAHON e KOLTZENBURG, 2006; WESS et al., 2003).

Baseado nestes dados, a próxima etapa deste trabalho foi avaliar a participação de receptores muscarínicos centrais e periféricos na antinocicepção induzida pela crotoxina, utilizando como antagonistas de receptores muscarínicos o sulfato de atropina e a N-metil atropina. Os resultados obtidos neste estudo indicam que receptores muscarínicos centrais estão envolvidos na antinocicepção induzida pela crotoxina, uma vez que o sulfato de atropina, mas não a N-metil-atropina, foi capaz de reverter o efeito analgésico da toxina.

Estes resultados se contrapõem aos estudos apresentados por Zhang e colaboradores (2006) os quais mostram que o sulfato de atropina na dose de 10 mg/kg i.p., não interferiu com o efeito analgésico da crotoxina (i.p.) nos testes de placa quente e contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos. Diferenças na espécie animal e nos testes empregados para avaliação da sensibilidade dolorosa podem ter contribuido para as diferenças observadas.

É importante salientar que duas toxinas isoladas de venenos de serpentes Elapidae, a cobrotoxina, uma α-neurotoxina de cadeia curta isolada do veneno de *Naja naja atra* e a cobratoxina, uma α-neurotoxina de cadeia longa isolada do veneno de *Naja kaouthia* induzem efeito analgésico em modelos experimentais de dor, mediado pela ativação de receptores muscarínicos centrais (CHEN e LIU, 2006; CHEN e ROBINSON, 1990). Ambas as toxinas são caracterizadas como neurotoxinas, com ação na junção neuromuscular, bloqueando a ação da acetilcolina no terminal pós-sináptico (CHEN e LIU, 2006).

Cabe mencionar ainda que Meiri (1979) demonstrou aumento no número de receptores colinérgicos nas fibras nervosas após a ocorrência de um dano axonal, fato que pode favorecer na presente condição experimental, a ação da crotoxina.

A modulação dos estímulos nociceptivos está relacionada com a influência de tratos descendentes inibitórios ou excitatórios que atuam no SNC.

Uma vez que os resultados apresentados apontam para uma possível ação central da crotoxina e que a estimulação das vias colinérgicas centrais pode favorecer a estimulação de vias inibitórias descendentes (BERNARDINI et al., 2001; HABERBERGER et al., 1999; WESS et al., 2003), investigamos os envolvimento de receptores noradrenérgicos na antinocicepção produzida pela crotoxina. Para tanto utilizamos a ioimbina, um antagonista de receptor α-adrenérgico e o atenolol, um antagonista de receptor β-adrenérgico. Os resultados obtidos sugerem o envolvimento de receptores α-adrenérgicos, uma vez que a ioimbina, mas não o atenolol, promoveu a inibição parcial (51%) do efeito da toxina.

Apesar de não termos avaliado especificamente o envolvimento de receptores α-adrenérgicos centrais no efeito da crotoxina, vários dados de literatura têm indicado que neurônios noradrenérgicos de projeção, presentes no tegumento pontino, apresentam influência significativa na modulação da dor, sendo o locus cerúleos uma importante região destes neurônios com projeções para o corno dorsal da medula espinhal (BEAR et al., 2002; MCMAHON e KOLTZENBURG, 2006). Estudos têm evidenciado ainda, a importante participação de receptores adrenérgicos na antinocicepção, uma vez que a via adrenérgica inibitória descendente é mobilizada nas injúrias nervosas no intuito

de limitar a hiperalgesia decorrente da injúria (XU et al., 1999). Esta via trafega pelo funículo dorso lateral da medula, projetando-se nas lâminas superficiais do corno posterior da medula espinhal. A ativação da substância cinzenta periaquedutal e/ou da medula rostral ventromedial mobiliza neurônios adrenérgicos (TEIXEIRA, 2003). É importante ressaltar ainda que Xu e colaboradores (2000) evidenciam a eficácia analgésica da clonidina, um agonista de receptor α2-adrenérgicos, em animais submetidos a dor neuropática.

Dados de literatura têm mostrado ainda a existência de uma via serotoninérgica descendente na modulação da dor. Neurônios serotoninérgicos fazem parte de 20% da população de células da medula ventromedial rostral, sendo que estímulos inibitórios sobre a nocicepção podem originar-se desta região (MCMAHON e KOLTZENBURG, 2006; TEIXEIRA, 2003).

Assim nosso próximo passo foi avaliar a participação de receptores serotoninérgicos na antinocicepção induzida pelo tratamento com a crotoxina.

Nestes estudos foi utilizada a metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos. Este fármaco promoveu inibição parcial (46%) da ação analgésica da crotoxina, indicando a participação de receptores serotoninérgicos no efeito desta toxina.

Vários dados de literatura mostram que a crotoxina apresenta efeito imunorregulatório e antiinflamatório, afetando o componente vascular e celular das respostas imune e inflamatória. Dados de literatura indicam ainda que tanto a fosfolipase A_2 como a crotapotina, subunidades da crotoxina, podem interferir com a atividade de leucócitos, inibindo algumas funções de linfócitos e a atividade de espraiamento e de fagocitose por macrófagos (GARCIA et al.,

2003; SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005; ZAMBELLI, 2006). Recentemente, Sampaio e colaboradores (2006) e Zambelli (2006) demostraram que o efeito inibitório da crotoxina sobre macrófagos e linfócitos, tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro,* é decorrente da ação de mediadores lipídicos derivados da via das lipoxigenases. Adicionalmente, foi demonstrado que esta toxina ou suas sub-unidades induzem a liberação de prostaglandina E_2 (PGE_2) e lipoxina A_4 (LXA4) pelos macrófagos (GARCIA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006b).

Em função dos dados de literatura acima citados, o próximo passo deste trabalho foi avaliar a participação de mediadores lipídicos no efeito antinociceptivo da crotoxina. Os dados obtidos indicam o envolvimento de eicosanóides derivados da via da lipoxigenase na antinocicepção da crotoxina, uma vez que o zileuton, mas não a indometacina bloqueou este efeito. Apesar destes dados, não foi avaliado no presente estudo, o tipo de eicosanóide envolvido no efeito analgésico da toxina.

Os resultados apresentados até o momento indicam que o modelo de transecção do nervo ciático de ratos induz o aparecimento de um dos fenômenos da dor neuropática, a hiperalgesia. Este fenômeno é detectado a partir da 2ª hora após a cirurgia permanecendo por pelo menos 64 dias após a cirurgia. A transecção do nervo acarreta também a formação do neuroma, a partir do 7º dia da cirurgia. O tratamento com a crotoxina acarreta retardo na formação do neuroma, além de induzir antinocicepção prolongada neste modelo. Os resultados indicam que o efeito analgésico da crotoxina é mediado por ativação de receptores muscarínicos centrais e parcialmente, por receptores α-adrenérgicos e serotoninérgicos. Mediadores lipídicos derivados

da via da 5-lipoxigenase, participam da modulação destes efeitos. Cabe ressaltar que apesar da mediação química, o efeito analgésico prolongado da crotoxina pode ser decorrente também do retardo na formação do neuroma.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que:

- A transecção do nervo ciático de ratos acarreta a formação de neuroma, detectado a partir do 7º dia do pós-operatório, sendo observado em 80 % dos animais, 64 dias após a cirurgia.
- A transecção do nervo ciático de ratos acarreta o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica à partir da 2a hora após a cirurgia, mantendo-se por pelo menos 64 dias.
- A crotoxina retarda a formação do neuroma em 7 dias quando comparado ao grupo controle.
- A crotoxina promove antinocicepção de longa duração neste modelo de dor neuropática.
- O efeito analgésico da crotoxina é mediado por receptores muscarínicos centrais e parcialmente, por receptores α-adrenérgicos e serotoninérgicos. Mediadores lipídicos derivados da via da 5-lipoxigenase, participam da modulação destes efeitos.

7 BIBLIOGRAFIA

AANONSEN, L.M.; LEI, S.;WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*, v. 41, n. 3, p. 309-321, 1990.

AGULLO, L.; BALTRONS, M.A.;GARCIA, A. Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Res*, v. 686, n. 2, p. 160-168, 1995.

AIRD, S.D.; YATES, J.R., 3RD; MARTINO, P.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.;KAISER, II. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim Biophys Acta*, v. 1040, n. 2, p. 217-224, 1990.

ALEXANDER, G.; GROTHUNSEN, J.; ZEPEDA, H.;SCHWARTZMAN, R. Giroxin, a toxin from the venom of Crotalus durissus terrificus, is a trombin-like enzime. *Toxicon*, v. 26, n. p. 953-960, 1988.

ALOE, L.; COZZARI, C.; CALISSANO, P.;LEVI-MONTALCINI, R. Somatic and behavioral postnatal effects of fetal injections of nerve growth factor antibodies in the rat. *Nature*, v. 291, n. 5814, p. 413-415, 1981.

AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; HERZEG, G.;DONNERER, J. Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold. *Pain*, v. 64, n. 2, p. 323-329, 1996.

AMORIN, M.; FRANCO DE MELO, R.;SALIBA, F. *Envenenamento botrópico e crotálico.*In: *Mem. Inst. Butantan* São Paulo: 1951. 63-108

ATTAL, N.; JAZAT, F.; KAYSER, V.;GUILBAUD, G. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain*, v. 41, n. 2, p. 235-251, 1990.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.;AMARAL, C.F.S. *Rattlesnake bites. Clinical Features and Complementary tests.*1990.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.;LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in Brazil. *Toxicon*, v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.;HERING, S.E. *Acidente crotálico.*In: *Plantas venenosas e animais peçonhentos.* São Paulo: 1992. 161-167.

BACKONJA, M.; ARNDT, G.; GOMBAR, K.A.; CHECK, B.;ZIMMERMANN, M. Response of chronic neuropathic pain syndromes to ketamine: a preliminary study. *Pain*, v. 56, n. 1, p. 51-57, 1994.

BARRAVIERA, B. *Curso sobre acidentes por animais peçonhentos; acidentes por serpentes do gênero Crotalus.*1990. 14-20

BARRES, B.A. New roles for glia. *J Neurosci*, v. 11, n. 12, p. 3685-3694, 1991.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.;PARADISO, M.A. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso.*2ª Art Med, 2002.

BENNETT, G. An animal model of neuropathic pain: a review. *Muscle& Nerve*, v. 16, n. p. 1040-1048, 1993.

BENNETT, G.J.;XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERNARDINI, N.; SAUER, S.K.; HABERBERGER, R.; FISCHER, M.J.;REEH, P.W. Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *J Neurosci*, v. 21, n. 9, p. 3295-3302, 2001.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BEVAN, S. *Nociceptive peripheral neurons: cellular properties*.In: *Text Book of Pain* Edinburgh: Chuchill-Livingstone, 1999. 85-103

BON, C. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, v. 39, n. p. 439-448, 1989.

BOSWELL, F.J.; ANDREWS, J.M.;WISE, R. Pharmacodynamic properties of faropenem demonstrated by studies of time-kill kinetics and postantibiotic effect. *J Antimicrob Chemother*, v. 39, n. 3, p. 415-418, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, n. p. 248-254, 1976.

BRAZIL, V. *Do emprego da peçonha em terapêutica*.São Paulo: An. Paul. Med. Cir., 1950. 398-408

BRAZIL, V. *Do emprego da peçonha na terapêutica*.São Paulo: 1934.

BRAZIL, V.-. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J. Formosan.Med. Assoc.*, v. 71, n. p. 394-396, 1972.

BRIGATE, P.; SAMPAIO, S.; GUTIERREZ, V.; CURI, R.; DOS- SANTOS, E.; RANGEL-SANTOS, A.; GUERRA, J.;CURY, Y. *Whole Crotalus durissus terrificus snake venom induces antinociception in a rat model of cancer pain*

*and crotoxin inhibits tumor growth.*2004. *Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation*. pp. 127. Rio de Janeiro.

BRIGATTE, P. *Efeito antinociceptivo do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre a dor de câncer em ratos: inibição do crescimento tumoral pela crotoxina.*2005. Tese de Doutorado- *Departamento de Patologia Experimental*. São Paulo: Universidade de São Paulo.

BRIGATTE, P.; HOFFMANN, F.A.; BERNARDI, M.M.; GIORGI, R.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H.A.; BARROS, S.B.; ALMEIDA, M.G.;CURY, Y. Tolerance to the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. *Toxicon*, v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.

BROADHURST, P.L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. *Fortschr Psychosom Med*, v. 1, n. p. 63-69, 1960.

BROMM, B.; SCHAREIN, E.;VAHLE-HINZ, C. Cortex areas involved in the processing of normal and altered pain. *Prog Brain Res*, v. 129, n. p. 289-302, 2000.

BURCHIEL, K.J.;RUSSELL, L.C. Glycerol neurolysis: neurophysiological effects of topical glycerol application on rat saphenous nerve. *J Neurosurg*, v. 63, n. 5, p. 784-788, 1985.

CARDOSO, D.F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E.L.; MACEDO, M.S.;FARSKY, S.H. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm*, v. 10, n. 3, p. 125-133, 2001.

CARDOSO, D.F.;MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, v. 35, n. 4, p. 607-612, 1997.

CARDOSO, J.L.C.; FRANCA, F.O.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S.;HADDAD, V. *As cascavéis.*2003. *Animais peçonhentos no Brasil, biologia, clínica e terapêutica dos acidente.* pp. 52-53. São Paulo.

CARLTON, S.M.; DOUGHERTY, P.M.; POVER, C.M.;COGGESHALL, R.E. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, v. 131, n. 1, p. 88-92, 1991.

CASTRO, F.R.; FARIAS, A.S.; PROENCA, P.L.; DE LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.;SANTOS, L.M. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicon*, v. 49, n. 3, p. 299-305, 2007.

CATHELINE, G.; KAYSER, V.;GUILBAUD, G. Further evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of systemic morphine in

mononeuropathic rats: involvement of kappa-, but not delta-opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, v. 315, n. 2, p. 135-143, 1996.

CAVIEDES, B.E.;HERRANZ, J.L. [Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain]. *Rev Neurol*, v. 35, n. 11, p. 1037-1048, 2002.

CERVERO, F.;LAIRD, J.M. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, v. 68, n. 1, p. 13-23, 1996.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J.L.; TEIXEIRA, C.F.;CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, n. 6, p. 667-678, 2003.

CHANG, C.C.;LEE, J.D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like ß-bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 296, n. 2, p. 159-168, 1977.

CHAO, M.; CASACCIA-BONNEFIL, P.; CARTER, B.; CHITTKA, A.; KONG, H.;YOON, S.O. Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 26, n. 2-3, p. 295-301, 1998.

CHEN, C.C.;LIU, I.M. Release of acetylcholine by Hon-Chi to raise insulin secretion in Wistar rats. *Neurosci Lett*, v. 404, n. 1-2, p. 117-121, 2006.

CHEN, L.;HUANG, L.Y. Protein kinase C reduces Mg2+ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*, v. 356, n. 6369, p. 521-523, 1992.

CHEN, R.Z.;ROBINSON, S.E. The effect of cholinergic manipulations on the analgesic response to cobrotoxin in mice. *Life Sci*, v. 47, n. 21, p. 1949-1954, 1990.

CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; DELOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.;BON, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv Exp Med Biol*, v. 391, n. p. 197-202, 1996.

CHUDLER, E.H.;DONG, W.K. Neuroma pain model: correlation of motor behavior and body weight with autotomy in rats. *Pain*, v. 17, n. 4, p. 341-351, 1983.

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.;FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

CURY, Y.;PICOLO, G. Animal toxins as analgesics--an overview. *Drug News Perspect*, v. 19, n. 7, p. 381-392, 2006.

DAI, Y.; IWATA, K.; FUKUOKA, T.; KONDO, E.; TOKUNAGA, A.; YAMANAKA, H.; TACHIBANA, T.; LIU, Y.;NOGUCHI, K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci*, v. 22, n. 17, p. 7737-7745, 2002.

DE SOUSA-E-SILVA, M.C.; TOMY, S.C.; TAVARES, F.L.; NAVAJAS, L.; LARSSON, M.H.; LUCAS, S.R.; KOGIKA, M.M.;SANO-MARTINS, I.S. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by Crotalus durissus terrificus snake venom in dogs. *Hum Exp Toxicol*, v. 22, n. 9, p. 491-500, 2003.

DELOT, E.;BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry*, v. 32, n. 40, p. 10708-10713, 1993.

DEVOR, M. *The pathophysiology of damaged peripheral nerves*.In: *Text Book of Pain* Edinburgh: churchill-Livingstone, 1994. 79-100

DEVOR, M.; KELLER, C.H.; DEERINCK, T.J.; LEVINSON, S.R.;ELLISMAN, M.H. Na+ channel accumulation on axolemma of afferent endings in nerve end neuromas in Apteronotus. *Neurosci Lett*, v. 102, n. 2-3, p. 149-154, 1989.

DEVOR, M.; WANG, A.; RENVALL, M.; FEIGAL, D.;RAMSDELL, J. Compliance with social and safety recommendations in an outpatient comprehensive geriatric assessment program. *J Gerontol*, v. 49, n. 4, p. M168-173, 1994.

DOUBELL, T.P.; MANNION, R.J.;WOOLF, C.J. *Nociceptive peripheral neurons: celular properties.*In: *Textbook of Pain* London: Churchill Livingstone, 1999. 85-103

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

DUGGAN, A.W.; HENDRY, I.A.; MORTON, C.R.; HUTCHISON, W.D.;ZHAO, Z.Q. Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat. *Brain Res*, v. 451, n. 1-2, p. 261-273, 1988.

DUGGAN, A.W.; HOPE, P.J.; JARROTT, B.; SCHAIBLE, H.G.;FLEETWOOD-WALKER, S.M. Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 195-202, 1990.

DWORKIN, R.H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M.C.; ALLEN, R.R.; ARGOFF, C.R.; BENNETT, G.J.; BUSHNELL, M.C.; FARRAR, J.T.; GALER,

B.S.; HAYTHORNTHWAITE, J.A.; HEWITT, D.J.; LOESER, J.D.; MAX, M.B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K.E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D.C.; WALLACE, M.S.; WATKINS, L.R.;WEINSTEIN, S.M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

EIDE, P.K.; JORUM, E.; STUBHAUG, A.; BREMNES, J.;BREIVIK, H. Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain*, v. 58, n. 3, p. 347-354, 1994.

ELIAV, E.; HERZBERG, U.; RUDA, M.A.;BENNETT, G.J. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain*, v. 83, n. p. 169-182, 1999.

ENGLAND, S.; BEVIAN, S.;DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol. (Lond)*, v. 495, n. Pt 2, p. 429-440, 1996.

FAURE, G.;BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus. *Toxicon*, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FELSBY, S.; NIELSEN, J.; ARENDT-NIELSEN, L.;JENSEN, T.S. NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. *Pain*, v. 64, n. 2, p. 283-291, 1996.

FELSENTHAL, G. Pharmacology of phenol in peripheral nerve blocks: a review. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 55, n. 1, p. 13-16, 1974.

FERREIRA, S.H. *Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores*.Cantabria: Serviço de Publicaciones de la Universidad de Cantabria,, 1994. 149-162

FERREIRA, S.H.;LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*, v. 33, n. p. 1479, 1995.

FERRER-BRECHNER, T. Anesthetic techniques for the management of cancer pain. *Cancer*, v. 63, n. 11 Suppl, p. 2343-2347, 1989.

FLOR, H.; MUHLNICKEL, W.; KARL, A.; DENKE, C.; GRUSSER, S.; KURTH, R.;TAUB, E. A neural substrate for nonpainful phantom limb phenomena. *Neuroreport*, v. 11, n. 7, p. 1407-1411, 2000.

FONSECA, F. *Animais Peçonhentos.*1949. pp. 35-40. São Paulo.

FRAENKEL-CONRAT, H.;SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Arch Biochem Biophys*, v. 60, n. 1, p. 64-73, 1956.

FROMM, G.H. Baclofen as an adjuvant analgesic. *J Pain Symptom Manage*, v. 9, n. 8, p. 500-509, 1994.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs*, v. 15, n. 1, p. 29-58, 2001.

FURTADO, M.F.D.; SANTOS, M.C.;KAMIGUTI, A.S. Age-related biological activity of south american rattlesnake (crotalus durissus terrificus) venom. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases.*, v. 9, n. 2, p. 3-12, 2003.

GARCIA, F.; TOYAMA, M.H.; CASTRO, F.R.; PROENCA, P.L.; MARANGONI, S.;SANTOS, L.M. Crotapotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon*, v. 42, n. 4, p. 433-437, 2003.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician*, v. 8, n. 3, p. 277-290, 2005.

GIORGI, R.; BERNARDI, M.M.;CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from Crotalus durissus terrificus venom. *Toxicon*, v. 31, n. 10, p. 1257-1265, 1993.

GOLDBERG, J.L. How does an axon grow? *Genes Dev*, v. 17, n. 8, p. 941-958, 2003.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.;ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicon*, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984.

GRACELY, R.H.; LYNCH, S.A.;BENNETT, G.J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain*, v. 51, n. 2, p. 175-194, 1992.

GUTIERREZ, V.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S.; PICOLO, G.;CURY, Y. *Efeito do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre a dor neuropática.*2003. *XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia*. pp. 144. Águas de Lindóia- SP.

GUTIERREZ, V.P. *Efeito do veneno de Crotalus durificus terrificus sobre a dor neuropática e Resposta Imune.*2005. Dissertação de Mestrado- *Departamento de Farmacologia*. São Paulo: Universidade de São Paulo.

GUYTON, A.C. *Fisiologia Humana.*5ª Guanabara Koogan, 1993.

HAAD, J.L. *Accidentes humanos por las serpientes de los gêneros Bothrops y Lachesis.*1980. 403-423

HABERBERGER, R.; HENRICH, M.; COURAUD, J.Y.;KUMMER, W. Muscarinic M2-receptors in rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci Lett*, v. 266, n. 3, p. 177-180, 1999.

HABERMEHL, G.G. *Therapeutic use of animals venoms. Venomous Animals and their Toxins*.Berlin: GGE, 1981. 184-185

HABLER, H.J.; BOCZEK-FUNCKE, A.; MICHAELIS, M.;JANIG, W. Responses of distinct types of sympathetic neuron to stimulation of the superior laryngeal nerve in the cat. *J Auton Nerv Syst*, v. 66, n. 1-2, p. 97-104, 1997.

HARATI, Y.; GOOCH, C.; SWENSON, M.; EDELMAN, S.; GREENE, D.; RASKIN, P.; DONOFRIO, P.; CORNBLATH, D.; SACHDEO, R.; SIU, C.O.;KAMIN, M. Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. *Neurology*, v. 50, n. 6, p. 1842-1846, 1998.

HARTUNG, H.P.; HEININGER, K.; SCHAFER, B.;TOYKA, K.V. Substance P and astrocytes: stimulation of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Faseb J*, v. 2, n. 1, p. 48-51, 1988.

HAWGOOD, B.J.;SANTANA DE SA, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*, v. 4, n. 2, p. 293-303, 1979.

HAWGOOD, B.J.;SMITH, J.W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. *Br J Pharmacol*, v. 61, n. 4, p. 597-606, 1977.

HOLLMANN, M.;HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, v. 17, n. p. 31-108, 1994.

JI, R.R.;WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

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

JUNQUEIRA, L.C.U. *Sistema Imunitário e Órgãos Linfáticos*.In: *Histologia básica : texto e atlas / L. C. Junqueira, José Carneiro ; colaboradores Telma Maria Tenório Zorn, Marinilce Fagundes dos Santos* 10 Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

KEITA, H.; KAYSER, V.;GUILBAUD, G. Antinociceptive effect of a kappa-opioid receptor agonist that minimally crosses the blood-brain barrier (ICI 204448) in a rat model of mononeuropathy. *Eur J Pharmacol*, v. 277, n. 2-3, p. 275-280, 1995.

KEMPERMANN, G.;GAGE, F.H. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus*, v. 9, n. 3, p. 321-332, 1999a.

KEMPERMANN, G.;GAGE, F.H. New nerve cells for the adult brain. *Sci Am*, v. 280, n. 5, p. 48-53, 1999b.

KIDD, B.L.;URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIM, S.H.;CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KINGERY, W.S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain*, v. 73, n. 2, p. 123-139, 1997.

KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CAMARGO, A.C.M.;CURY, Y. Crotalphine, a novel and potent opioid peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Life Sciences, submetido*, v. n., 2007.

KRYGER, G.S.; KRYGER, Z.; ZHANG, F.; SHELTON, D.L.; LINEAWEAVER, W.C.;BUNCKE, H.J. Nerve growth factor inhibition prevents traumatic neuroma formation in the rat. *J Hand Surg [Am]*, v. 26, n. 4, p. 635-644, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 15, n. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, Y.; LEE, C.H.;OH, U. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells*, v. 20, n. 3, p. 315-324, 2005.

LENT, R. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência.*Atheneu, 2004.

LETOURNEAU, P.C.;WESSELLS, N.K. Migratory cell locomotion versus nerve axon elongation: differences based on the effects of lanthanum ion. *J Cell Biol*, v. 61, n. 1, p. 56-69, 1974.

LEVINE, J.D.; FIELD, H.L.;BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci.*, v. 13, n. p. 2273-2286, 1993.

LINDENLAUB, T.;SOMMER, C. Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain*, v. 89, n. 1, p. 97-106, 2000.

LOESER, J.D. The future. Will pain be abolished or just pain specialists? *Minn Med*, v. 84, n. 7, p. 20-21, 2001.

LORENZETTI, B.B.;FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res*, v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996.

MACKINNON, S.E. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*, v. 22, n. 3, p. 257-273, 1989.

MACKINNON, S.E.; GLICKMAN, L.T.;DAGUM, A. A technique for the treatment of neuroma in-continuity. *J Reconstr Microsurg*, v. 8, n. 5, p. 379-383, 1992.

MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.;GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol*, v. 13, n. 1, p. 23-93, 1993.

MAGGI, S.P.; LOWE, J.B., 3RD;MACKINNON, S.E. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg*, v. 30, n. 2, p. 109-126, 2003.

MANCIN, A.C.; SOARES, A.M.; ANDRIAO-ESCARSO, S.H.; FACA, V.M.; GREENE, L.J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELA, I.R.;GIGLIO, J.R. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1927-1937, 1998.

MAO, J.; PRICE, D.D.; PHILLIPS, L.L.; LU, J.;MAYER, D.J. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res*, v. 677, n. 2, p. 257-267, 1995.

MÁRQUEZ, J.O. Bases de anatomia e fisiopatologia. *Dor diagnóstico e tratamento*, v. 1, n. 1, 2004.

MARRIOTT, D.R.; WILKIN, G.P.;WOOD, J.N. Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes: regional specialisation and correlation with phosphoinositol metabolism. *J Neurochem*, v. 56, n. 1, p. 259-265, 1991.

MATHEWS, G.J.;OSTERHOLM, J.L. Painful traumatic neuromas. *Surg Clin North Am*, v. 52, n. 5, p. 1313-1324, 1972.

MCCARTHY, R.J.; KERNS, J.M.; NATH, H.A.; SHULMAN, M.;IVANKOVICH, A.D. The antinociceptive and histologic effect of sciatic nerve blocks with 5%

butamben suspension in rats. *Anesth Analg*, v. 94, n. 3, p. 711-716; table of contents, 2002.

MCMAHON, S.B.;KOLTZENBURG, M. *Textbook of Pain*.5ª Philadelphia: Elsevier, 2006.

MEIRI, H.; SPIRA, M.E.;PARNAS, I. Membrane properties of regenerating axon. *Soc neurosci*, v. 5, n. p. 680, 1979.

MELLICK, G.A.;MELLICK, L.B. Reflex sympathetic dystrophy treated with gabapentin. *Arch Phys Med Rehabil*, v. 78, n. 1, p. 98-105, 1997.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLIGAN, E.D.; TWINING, C.; CHACUR, M.; BIEDENKAPP, J.; O'CONNOR, K.; POOLE, S.; TRACEY, K.; MARTIN, D.; MAIER, S.F.;WATKINS, L.R. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 1026-1040, 2003.

MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.;COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 29, n. p. 365-402, 1989.

MORRIS, J.H.; HUDSON, A.R.;WEDDELL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. IV. Changes in fascicular microtopography, perineurium and endoneurial fibroblasts. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 124, n. 2, p. 165-203, 1972.

NAHAS, L.; DENSON, K.W.E.;MACFARLANE, R.G. A atudy of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, v. 12, n. p. 355-367, 1964.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OSAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.;FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca. Biochemintry*, v. 33, n. p. 1843-1849, 1994.

OKADA, M.; TEIXEIRA, M.J.; TENGAN, S.K.;MORAES, L.O. Desenvolvimento do sistema nociceptivo e supressor da dor. *Revista de Medicina (USP).* v. 80, n. p. 78-93, 2001.

OKUDA, T.; ISHIDA, O.; FUJIMOTO, Y.; TANAKA, N.; INOUE, A.; NAKATA, Y.;OCHI, M. The autotomy relief effect of a silicone tube covering the proximal nerve stump. *J Orthop Res*, v. 24, n. 7, p. 1427-1437, 2006.

OMER, G.E., JR. Nerve, neuroma, and pain problems related to upper limb amputations. *Orthop Clin North Am*, v. 12, n. 4, p. 751-762, 1981.

OSSIPOV, M.H.;PORRECA, F. Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. *NeuroRx*, v. 2, n. 4, p. 650-661, 2005.

PAYDARFAR, J.A.;PANIELLO, R.C. Functional study of four neurotoxins as inhibitors of post-traumatic nerve regeneration. *Laryngoscope*, v. 111, n. 5, p. 844-850, 2001.

PAYNE, B.;NORFLEET, M.A. Chronic pain and the family: a review. *Pain*, v. 26, n. 1, p. 1-22, 1986.

PICARD, P.; BOUCHER, S.; REGOLI, D.; GITTER, B.D.; HOWBERT, J.J.;COUTURE, R. Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK1 and NK2 receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur J Pharmacol*, v. 232, n. 2-3, p. 255-261, 1993.

PICOLO, G.; CASSOLA, A.C.;CURY, Y. Activation of peripheral ATP-sensitive K+ channels mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom. *Eur J Pharmacol*, v. 469, n. 1-3, p. 57-64, 2003.

PICOLO, G.;CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. *Life Sci*, v. 75, n. 5, p. 559-573, 2004.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; BERNARDI, M.M.;CURY, Y. The antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. *Toxicon*, v. 36, n. 1, p. 223-227, 1998.

PICOLO, G.; GIORGI, R.;CURY, Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of Crotalus durissus terrificus snake venom. *Eur J Pharmacol*, v. 391, n. 1-2, p. 55-62, 2000a.

PICOLO, G.; GIORGI, R.;CURY, Y. Delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snale venom. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 391, n. p. 55-62, 2000b.

PORRECA, F.; LAI, J.; BIAN, D.; WEGERT, S.; OSSIPOV, M.H.; EGLEN, R.M.; KASSOTAKIS, L.; NOVAKOVIC, S.; RABERT, D.K.; SANGAMESWARAN, L.;HUNTER, J.C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 14, p. 7640-7644, 1999.

PORTENOY, R.K. Chronic opioid therapy in nonmalignant pain. *J Pain Symptom Manage*, v. 5, n. 1 Suppl, p. S46-62, 1990.

PRZEWLOCKI, R.; LABUZ, D.; MIKA, J.; PRZEWLOCKA, B.; TOMBOLY, C.;TOTH, G. Pain inhibition by endomorphins. *Ann N Y Acad Sci*, v. 897, n. p. 154-164, 1999.

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

RADVANYI, F.;BON, C. Investigations on the mechanism of action of crotoxin. *J Physiol (Paris)*, v. 79, n. 4, p. 327-333, 1984.

RANDALL, L.O.;SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch. Inst. Pharmacodyn.*, v. 111, n. p. 209-219, 1957.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.;CARDOSO, D.F. Immunosuppresive role of principal toxin (crotoxin) of Crotalus durissus terrificus venom. *Toxicon*, v. 44, n. 6, p. 609-616, 2004.

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.;KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of Crotalus durissus terrificus. *Braz J Med Biol Res*, v. 19, n. 3, p. 333-338, 1986.

RIEDEL, W.;NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RO, L.S.; CHEN, S.T.; TANG, L.M.;JACOBS, J.M. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*, v. 79, n. 2-3, p. 265-274, 1999.

ROSENFELD, G. *Symptomathology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America.*In: *Venomous Animals and Their Venoms, Bücherl, W and Buckley, E.* New York: 1971.

SAID, A.H.; KHAMIS, Y.; MAHFOUZ, M.F.;HEGAZY, A. Clinicopathological studies on neurectomy in equids. *Equine Vet J*, v. 16, n. 5, p. 442-446, 1984.

SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H.; TURRI, J.A.; DANELLA, P.M.;SELISTRE DE ARAUJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, v. 39, n. 8, p. 1141-1149, 2001.

SAMPAIO, S.C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; DOS SANTOS, E.C.; CURI, R.;CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*, v. 47, n. 3, p. 313-321, 2006a.

SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; DOS-SANTOS, E.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CURI, R.;CURY, Y. Contribution of crotoxin for the

inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom on macrophage function. *Toxicon*, v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, R.;CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from Crotalus durissus terrificus venom on macrophage function. *Toxicon*, v. 45, n. 5, p. 671-676, 2005.

SAMPAIO, S.C.; SANTOS, M.F.; COSTA, E.P.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CARNEIRO, S.M.; CURI, R.;CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. *Toxicon*, v. 47, n. 8, p. 909-919, 2006b.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; BORELLI, P.; CURI, R.;CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol*, v. 70, n. 4, p. 551-558, 2001.

SANDKUHLER, J.; BENRATH, J.; BRECHTEL, C.; RUSCHEWEYH, R.;HEINKE, B. Synaptic mechanisms of hyperalgesia. *Prog Brain Res*, v. 129, n. p. 81-100, 2000.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; GONCALVES, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.;SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus, C. durissus cascavella and C. durissus collilineatus). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999.

SAÚDE, M.D. Manual de diagnóstico e tratamento de Acidentes por Animais Peconhentos. *Fundacão Nacional de Saúde*, v. n., 1998.

SCHAIBLE, H.G.;RICHTER, F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHAIBLE, H.G.;SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E2. *J. Physiology*, v. 403, n. p. 91-104, 1988.

SCHEMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H.O.;TOREBJORK, H.E. Senstitizaion of intensive branches of C nociceptors in human skin. *J. Physiology*, v. 480, n. p. 389-394, 1994.

SCHWOB, J.E.; YOUNGENTOB, S.L.;MEIRI, K.F. On the formation of neuromata in the primary olfactory projection. *J Comp Neurol*, v. 340, n. 3, p. 361-380, 1994.

SELTZER, Z.; COHN, S.; GINZBURG, R.;BEILIN, B. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain*, v. 45, n. 1, p. 69-75, 1991.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.;SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SEYBOLD, V.S.; JIA, Y.P.;ABRAHAMS, L.G. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain*, v. 105, n. 1-2, p. 47-55, 2003.

SHER, G.D.;MITCHELL, D. N-methyl-D-aspartate receptors mediate responses of rat dorsal horn neurones to hindlimb ischemia. *Brain Res*, v. 522, n. 1, p. 55-62, 1990.

SIDDALL, P.J.;COUSINS, M.J. Neurobiology of pain. *Int Anesthesiol Clin*, v. 35, n. 2, p. 1-26, 1997a.

SIDDALL, P.J.;COUSINS, M.J. Spinal pain mechanisms. *Spine*, v. 22, n. 1, p. 98-104, 1997b.

SINDRUP, S.H.; BROSEN, K.; BJERRING, P.; ARENDT-NIELSEN, L.; LARSEN, U.; ANGELO, H.R.;GRAM, L.F. Codeine increases pain thresholds to copper vapor laser stimuli in extensive but not poor metabolizers of sparteine. *Clin Pharmacol Ther*, v. 48, n. 6, p. 686-693, 1990.

SLOTTA, K.H.F.-C., H. *Estudos químicos sobre venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel.*1938. *Memorias do Instituto Butantan*. pp. 505-512.

SMALL, J.R.; SCADDING, J.W.;LANDON, D.N. Ultrastructural localization of sympathetic axons in experimental rat sciatic nerve neuromas. *J Neurocytol*, v. 25, n. 10, p. 573-582, 1996.

SNEDECOR, G.W.; SOKAL, R.R.;ROHLF, F.J. *Statistical methods Biometry*. New York: Owa State University Press, 1946. p.859

SOKAL, R.R.;ROHLF, F.J. *Biometry*. New York: 1981. 859

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.G., LRC; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators of Inflammation*, v. 5, n. p. 18-23, 1996.

STELLA, N.; TENCE, M.; GLOWINSKI, J.;PREMONT, J. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci*, v. 14, n. 2, p. 568-575, 1994.

STILLER, C.O.; BERGQUIST, J.; BECK, O.; EKMAN, R.;BRODIN, E. Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neurosci Lett*, v. 209, n. 3, p. 165-168, 1996.

STOCKER, K. *Composion of snake venoms.*In: *Stocker K.F. Medical Use of Snake Venom Proteins* Boston: CRC: 1990. 33-56

STREIT, W.J.;KINCAID-COLTON, C.A. The brain's immune system. *Sci Am*, v. 273, n. 5, p. 54-55, 58-61, 1995.

SUNDERLAND, S. Advances in diagnosis and treatment of root and peripheral nerve injury. *Adv Neurol*, v. 22, n. p. 271-305, 1979.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

TASKER, R.R.; DOORLY, T.;YAMASHIRO, K. Thalamotomy in generalized dystonia. *Adv Neurol*, v. 50, n. p. 615-631, 1988.

TEIXEIRA, C.F.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.;GUTIERREZ, J.M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve*, v. 28, n. 4, p. 449-459, 2003a.

TEIXEIRA, C.F.P.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.;CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A2. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003b.

TEIXEIRA, M.J. Dor fantasma e no coto de amputação. *Revista de Medicina (USP).* v. 78, n. p. 192-196, 1999a.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor. Dor, um estudo multidisciplinar. *Revista de Medicina (USP).* v. n., 1999b.

TEIXEIRA, M.J. Mecanismos da nocicepção. *Jounal Multidisciplinar da Dor Crâniofascial.*, v. 3, n. 11, p. 195-226, 2003.

TEIXEIRA, M.J.;FIGUEIRÓ, J.A.B. *Dor no contexto multidisciplinar*.In: *Dor: anatomia e fisiopatologia de condições álgicas* 2003. 1-27

TERZIS, J.K.;SMITH, K.J. Repair of severed peripheral nerves: comparison of the "de Medinaceli" and standard microsuture methods. *Exp Neurol*, v. 96, n. 3, p. 672-680, 1987.

TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.;CAMPBELL, J.N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol*, v. 38, n. 4, p. 397-421, 1992.

VALE, F.M. *Dor novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas.*2000. pp. 291-304.

VERNADAKIS, A.J.; KOCH, H.;MACKINNON, S.E. Management of neuromas. *Clin Plast Surg*, v. 30, n. 2, p. 247-268, vii, 2003.

VITAL- BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J Formosan Med Assoc*, v. 71, n. p. 394-396, 1972.

WALL, P.D.; DEVOR, M.; INBAL, R.; SCADDING, J.W.; SCHONFELD, D.; SELTZER, Z.;TOMKIEWICZ, M.M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, v. 7, n. 2, p. 103-111, 1979.

WALL, P.D.;GUTNICK, M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature*, v. 248, n. 5451, p. 740-743, 1974.

WANG, L.X.;WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 55, n. 8, p. 949-965, 2003.

WATKINS, L.R.;MAIER, S.F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*, v. 2, n. 12, p. 973-985, 2003.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.;MAIER, S.F. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain*, v. 93, n. 3, p. 201-205, 2001.

WATSON, C.P.; VERNICH, L.; CHIPMAN, M.;REED, K. Nortriptyline versus amitriptyline in postherpetic neuralgia: a randomized trial. *Neurology*, v. 51, n. 4, p. 1166-1171, 1998.

WESS, J.; DUTTAROY, A.; GOMEZA, J.; ZHANG, W.; YAMADA, M.; FELDER, C.C.; BERNARDINI, N.;REEH, P.W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. *Life Sci*, v. 72, n. 18-19, p. 2047-2054, 2003.

WESTERLUND, T.; VUORINEN, V.;ROYTTA, M. Same axonal regeneration rate after different endoneurial response to intraneural glycerol and phenol injection. *Acta Neuropathol*, v. 102, n. 1, p. 41-54, 2001.

WILLIS, W.D. Mechanical Allodynia. *APS Journal*, v. 2, n. 1, p. 23-33, 1993.

WILSON, F. Neurolytic and other locally-acting drugs in the management of pain. *Pharmacol Ther*, v. 12, n. 3, p. 599-611, 1981.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, v. 306, n. 5944, p. 686-688, 1983.

WOOLF, C.J.;SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.;COGGESHALL, R.E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, v. 355, n. 6355, p. 75-78, 1992.

WOOLF, C.J.;WALL, P.D. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci*, v. 6, n. 5, p. 1433-1442, 1986.

WU, J.;CHIU, D.T. Painful neuromas: a review of treatment modalities. *Ann Plast Surg*, v. 43, n. 6, p. 661-667, 1999.

XU, Y.; DAY, T.A.;BULLER, K.M. The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration. *Neuroscience*, v. 94, n. 1, p. 175-183, 1999.

XU, Z.; CHEN, S.R.; EISENACH, J.;PAN, H.L. Role of spinal muscarinic and nicotinic receptors in clonidine-induced nitric oxide release in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res*, v. 861, n. 2, p. 390-398, 2000.

YU, X.M.; ASKALAN, R.; KEIL, G.J., 2ND;SALTER, M.W. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science*, v. 275, n. 5300, p. 674-678, 1997.

ZAMBELLI, V.O. *Efeito da crotoxina sobre linfócitos e órgãos linfóides.*2006. Dissertação de Mestrado- *Departamento de Farmacologia*. São Paulo: Universidade de São Paulo.

ZELTSER, R.; BEILIN, B.; ZASLANSKY, R.;SELTZER, Z. Comparison of autotomy behavior induced in rats by various clinically-used neurectomy methods. *Pain*, v. 89, n. 1, p. 19-24, 2000.

ZHANG, C.;GOPALAKRISHNAKONE, P. Histopathological studies of the acute inflammation in synovial tissue of rat knee joint following intra-articular injection of PLA2 from Chinese Cobra (Naja naja atra) venom. ***Toxicon***, v. **37**, n. **(5)**, p. 783-799, 1999.

ZHANG, H.L.; HAN, R.; CHEN, Z.X.; CHEN, B.W.; GU, Z.L.; REID, P.F.; RAYMOND, L.N.;QIN, Z.H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from crotalus durissus terrificus venom. *Toxicon*, v. 48, n. 2, p. 175-182, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZOCHODNE, D.W.; NGUYEN, C.;SHARKEY, K.A. Accumulation and degranulation of mast cells in experimental neuromas. *Neurosci Lett*, v. 182, n. 1, p. 3-6, 1994.

8 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Pharmacology Biochemistry and Behavior.