

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**EDUARDO YUICHI YOSHIOKA**

**ESTUDOS DA ATIVIDADE GERAL,  
ANTINOCICEPTIVA/NOCICEPTIVA, ANTI-  
INFLAMATÓRIA/INFLAMATÓRIA DA  $\beta$ -  
FENILETILAMINA (FEA), UMA SUBSTÂNCIA  
ISOLADA DO VENENO DE VESPA *POLYBIA*  
*PAULISTA***

EDUARDO YUICHI YOSHIOKA

ESTUDOS DA ATIVIDADE GERAL, ANTINOCICEPTIVA/NOCICEPTIVA,  
ANTI-INFLAMATÓRIA/INFLAMATÓRIA DA  $\beta$ -FENILETILAMINA  
(FEA), UMA SUBSTÂNCIA ISOLADA DO VENENO DE VESPA *Polybia*  
*paulista*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio  
Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Rio Claro  
2015

615 Yoshioka, Eduardo Yuichi  
Y65e Estudos da atividade geral, antinociceptiva/nociceptiva,  
anti-inflamatória/inflamatória da 2-feniletilamina (FEA), uma  
substância isolada do veneno de vespa *Polybia paulista* /  
Eduardo Yuichi Yoshioka. - Rio Claro, 2015  
35 f. : il., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Rio Claro  
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Farmacologia. 2. Dor. 3. Bioprospecção. 4. Venenos. 5.  
Toxinas. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

*Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e seus funcionários pelo espaço e ajuda.*

*Ao Laboratório de Bioquímica Estrutural e Zooquímica e ao CNPq, pela disponibilização do espaço e financiamento, respectivamente, para o desenvolvimento desse trabalho. A orientação do Prof. Dr. Mario Sergio Palma e a co-orientação (na época) da Dra. Patrícia Brigatte. Aos alunos de estágio (na época) Heloíza, Natália e Letícia por ajudarem nos experimentos.*

*Aos Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dra. Maria Andréia Delbin e Profa. Dra. Fabíola Zakia Taufic Mônica, do Departamento de Farmacologia – FCM da Universidade Estadual de Campinas, pelo espaço, tempo e dedicação cedidos aos experimentos de reatividade da artéria femoral nos camundongos.*

*Aos Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima e a pesquisadora Dra. Adriana Lino, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo espaço, tempo e dedicação cedidos aos experimentos de reatividade da traqueia nos camundongos.*

*Um agradecimento especial à Dra. Patrícia Brigatte, a Pat. Agradeço a paciência e a força de vontade para me ensinar desde o zero sobre essa nossa área de manipulação animal e Farmacologia. Pelas conversas, lições e incentivos que foram passadas, por acreditar em mim.*

*Aos amigos feitos nesse período de estágio, Diego e Fernando. Obrigado pelas boas conversas (sérias ou não) e ajudas pontuais... Café?*

*À namorada mais corajosa, compreensível, companheira e incentivadora, Fernanda Veck dos Santos! Fer, obrigado por toda a ajuda nesse período e por sempre ser um exemplo e inspiração para mim. Certamente desenvolver esse trabalho seria mil vezes mais difícil sem você por perto.*

*À minha família... Simplesmente por tudo.*

**Obrigado.**

## RESUMO

A utilização de substâncias naturais com propriedades terapêuticas tem sido realizada desde as antigas civilizações. As substâncias existentes em muitas das secreções tóxicas de insetos, particularmente de vespas, são candidatas naturais à bioprospecção de compostos líderes para o desenvolvimento de substâncias com propriedades terapêuticas. Porém, apesar do grande número de espécies de vespas sociais com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, pouco se conhece a respeito da composição e da farmacologia dos venenos destes insetos. O veneno da vespa *Polybia paulista* é composta por várias substâncias biologicamente ativas. Dentre essas substâncias isolamos a  $\beta$ -feniletilamina (2-FEA). Esta substância é similar às anfetaminas, que estão entre as drogas de abuso mais comuns. Este tipo de droga promove uma sensação de “poder” ao usuário, que passa da euforia à depressão instantaneamente após o efeito da droga acabar. Este projeto visa estudar e caracterizar o possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da 2-FEA, uma substância similar a anfetaminas, presente no veneno da vespa *Polybia paulista* na experimentação animal. Além disso, uma vez que esta substância é similar a drogas de abuso comuns, será verificado se a mesma interfere com a atividade geral dos animais. Uma vez que o teste de avaliação da sensibilidade dolorosa elícita uma resposta motora dos animais (retirada da pata), será avaliado se a 2-FEA interfere com a contração muscular de vias aéreas (traqueia) e das artérias femorais. Observou-se que a 2-FEA, nas doses de 10 até 100 mg/kg, reduziu a atividade de locomoção dos camundongos. Já nas doses de 0,1 até 10mg/kg, houve uma redução mais branda na locomoção dos animais. O comportamento de levantamento desses mesmos animais aparentemente não sofreu aumento nem redução nessas mesmas doses. No que se refere à atividade hiperalgésica, foi observado que a 2-FEA *per se*, nas doses de 50 e 100mg/kg, não induziu uma resposta inflamatória e não reverteu um quadro de inflamação induzido por carragenina. Como consequência de uma possível atividade inflamatória e/ou anti-inflamatória, a atividade edematogênica nas doses de 50 e 100 mg/kg da 2-FEA *per se* avaliada, não induzindo um processo inflamatório, não promoveu o aumento do volume da pata desses camundongos. Ainda, frente ao processo inflamatório desencadeado pela carragenina, as mesmas doses não reverteram essa inflamação. Por fim, a dose de 50mg/kg não interferiu com a reatividade da traqueia e concentrações de  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$ M de 2-FEA induziram fracas contrações da artéria femoral. Entretanto, uma vez que essas doses e concentrações são muito altas, torna-se inviável que na natureza, ao sofrermos uma ferroadada da vespa *Polybia paulista*, essas respostas comportamentais sejam comumente observadas.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1. <i>Filo Artrópodes – Ordem Hymenoptera</i> .....	5
1.2. <i>Características e composição do veneno de Hymenopteras</i> .....	5
1.3. <i>Dor: Considerações gerais</i> .....	6
1.4. <i>Estudos experimentais com venenos de insetos</i> .....	9
1.5. <i><math>\beta</math>-feniletilamina (2-FEA)</i> .....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. <i>Obtenção e extração dos venenos</i> .....	14
3.2. <i>Purificação da 2-FEA</i> .....	14
3.3 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	14
3.3.1 <i>Animais</i> .....	14
3.3.2 <i>Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo do Campo Aberto</i> .....	15
3.3.3 <i>Avaliação da sensibilidade dolorosa</i> .....	15
3.3.4 <i>Avaliação do efeito inflamatório ou edematogênico</i> .....	16
3.3.5 <i>Análise da atividade contrátil de tecido isolado - reatividade da traqueia</i> .....	16
3.3.6 <i>Análise da atividade contrátil de tecido isolado – artéria femoral</i> .....	17
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5.1 <i>Atividade Geral - Campo aberto</i> .....	19
5.2 <i>Dor e edema – von Frey eletrônico e paquímetro digital</i> .....	21
5.3 <i>Reatividade da traqueia e artéria femoral</i> .....	24
6 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. *Filo Artrópodes – Ordem Hymenoptera*

Os artrópodes representam o maior grupo animal com espécies que abrangem aproximados 85% de todas as já descritas (MALASPINA et al., 2009) com estimativas de que existam para cada ser humano vivo, um equivalente a 200 milhões de insetos (MEINWALD; EISNER, 1995). Em decorrência da grande diversidade de espécies e de toxinas que compõem os venenos destes animais, estas toxinas são candidatas naturais à bioprospecção de compostos-líderes para o desenvolvimento de drogas de uso terapêutico (PALMA et al., 1997; MANZOLI et al., 2003; PINTO et al., 2002). Nos últimos anos muito se tem estudado sobre as atividades biológicas e a bioquímica das secreções dos Artrópodes. Esses animais produzem substâncias utilizadas para paralisar e/ou matar, bem como, apenas afastar seus inimigos (MEINWALD; EISNER, 1995).

Dentro da ordem Hymenoptera, as vespas sociais pertencentes à família Vespidae, são conhecidas por possuírem ferrões e são divididas em duas subfamílias: a Vespinae, típica de áreas temperadas, e a Polistinae, de áreas tropicais (RICHARDS, 1978). Dentre todos os tipos de venenos animais já descritos, aqueles pertencentes aos insetos da Ordem Hymenoptera são conhecidos há mais de 4,5 mil anos, pois existem relatos do antigo Egito, onde o Faraó Menes, foi vítima fatal de ferroadas de vespas. Além disso, os insetos dessa ordem eram muito conhecidos entre os hebreus (SPRADBERY, 1973).

Apesar do grande número de espécies de vespas sociais com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, pouco se conhece a respeito da composição dos venenos desses insetos, especialmente de regiões neotropicais (MENDES et al., 2005).

### 1.2. *Características e composição do veneno de Hymenopteras*

Ferroadas por abelhas e vespas, incluindo as espécies brasileiras, representam um problema de saúde pública. Pessoas (20 a 50) morrem todos os anos nos Estados Unidos como resultado de reações sistêmicas severas por picadas de abelhas, vespas e formigas (PARISH, 1963; HOFFMAN et al., 1983). Infelizmente, no Brasil e na América do Sul não há estatísticas em relação a este problema, porém o que pesquisadores da área relatam é que o problema é similar ou maior do que na América do Norte (CASTRO, 2009). As várias funções decorrentes de substâncias químicas originárias dos himenópteros – afastar ou matar presas, feromônios para comunicação (Mc CORMIC; MEINWALD, 1993) – foram respostas evolutivas estratégicas de seus venenos, e aparelhos urticantes de acordo com sua biologia e

comportamento, principalmente, visando atingir o sistema nervoso de suas presas (PALMA, 2006).

O veneno de himenópteros é relatado como responsável por 9.3-28.5% dos casos de sensibilização no mundo (ANTONICELLI et al., 2002). Suas ferroadas provocam dor severa, inflamação local, alterações locais e sistêmicas, e morte em pacientes alérgicos ao veneno (ANTONICELLI et al., 2002; STEEN et al., 2005) devido aos choques anafiláticos e reações tóxicas sistêmicas em altas doses (CHEN et al., 2004; ELLIS;DAY, 2005).

O veneno de himenópteros consiste de uma combinação complexa de toxinas de baixas massas moleculares (PALMA, 2006), uma série de peptídeos policatiônicos (DE SOUZA et al., 2009) e proteínas com importante função alérgica (PANTERA et al., 2003).

Foi demonstrado que o veneno das vespas contém uma diversidade de componentes protéicos, tais como as fosfolipases A e B, hialuronidasas, fosfatases ácidas, proteases e nucleases. É possível ainda encontrar muitos peptídeos apresentando atividades biológicas relacionadas à desgranulação de mastócitos, quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleados (PMNL), citólise e leve contração muscular (NAKAJIMA et al., 1986).

A fração de baixa massa molecular (BMM) do veneno de vespas contém uma série de aminas biológicas tais como histamina, serotonina, adrenalina, noradrenalina, espermina e espermidina; alguns aminoácidos como o ácido aspártico e glutâmico; nucleotídeo trifosfatos, nucleosídeos e açúcares livres (OWEN, 1979; NAKAJIMA 1986). Posto que grande parte desses componentes possua ação neurotransmissora, com a outra parte participando no bloqueio de canais iônicos a nível neuronal (HISADA et al., 2005), considera-se o veneno de vespas uma rica fonte de compostos BMM atuantes em diversos sistemas biológicos, principalmente no sistema nervoso e apresentam um amplo alcance de efeitos farmacológicos na transmissão sináptica (MORTARI et al., 2005).

Trabalho anterior deste laboratório relata que o veneno da vespa *Polybia paulista* é composta por várias substâncias biologicamente ativas. Dentre essas substâncias citamos a  $\beta$ -feniletilamina (2-FEA) (SAIDEMBERG, 2009). Esta substância, alvo do presente trabalho, será devidamente abordada no item subsequente 1.5.

### *1.3. Dor: Considerações gerais*

A dor é considerada um problema de saúde pública, uma vez que interfere com a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, dados da Organização Mundial de Saúde relatam que cerca de 40% dos pacientes que sofrem de dor não dispõem de tratamento



adequado (HANKS et al., 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996; JACOX et al., 1994).

A dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tais lesões. A dor, portanto, é um processo cognitivo e dependente da memória, aspectos culturais e psíquicos.

Os nociceptores (receptores para a dor) são terminações nervosas livres desprovidas de estruturas receptoras específicas sendo, portanto, uma continuação da própria fibra nervosa. Os neurônios aferentes primários detectam o estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução), conduzem o impulso da periferia para a medula espinhal e transferem esses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; WOOLF, 2004).

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório tais como prótons extracelulares, mediadores lipídicos, bradicinina, prostaglandina, entre outros, podem interferir com a atividade dos neurônios nociceptivos primários (JULIUS; BASBAUM, 2001; SCHAIBLE et al., 2004). Os mediadores periféricos da hipernocicepção atuam via receptores ligados a intermediários celulares regulatórios (proteína G, segundos mensageiros), que regulam a permeabilidade da membrana e a concentração iônica celular (BEVAN, 1999; REICHLING; LEVINE, 1999). A sensibilização dos neurônios nociceptivos primários é decorrente, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínquinases, como PKA, acarretando a fosforilação de canais iônicos e o aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular. A consequência destes efeitos metabólicos é a despolarização parcial da membrana neuronal facilitando a geração e a transmissão de impulsos nervosos (CUNHA et al., 1999; ENGLAND et al., 1996; FERREIRA; LORENZETTI, 1994).

O corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação da informação nociceptiva da periferia para o SNC (AIMONE; YAKSH, 1989; COLBURN; DELEO, 1999). O principal neurotransmissor excitatório envolvido na sensação nociceptiva é o glutamato, enquanto neuropeptídeos como a substância P, a neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina parecem atuar como neuromoduladores da transmissão nociceptiva, favorecendo esta transmissão (KIDD; URBAN, 2001; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Vários agentes indutores de hipernocicepção inflamatória têm sido utilizados experimentalmente, dentre eles, a carragenina, um agente inflamatório e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um mediador inflamatório. O aumento da sensibilidade à dor causado pela carragenina é caracterizado por um componente periférico, resultante da sensibilização dos nociceptores e por um componente central, com a participação de circuitos centrais de dor (FERREIRA et al., 1978). A mediação química desta hipernocicepção envolve a liberação sequencial de mediadores nociceptivos, tais como bradicinina (FERREIRA et al., 1993), fator de necrose tumoral ( $\alpha$ -TNF) (CUNHA et al., 1992), interleucina-6 e interleucina-1 $\beta$  (FERREIRA et al., 1988) que estimulam a formação de produtos da ciclo-oxigenase, resultando principalmente na produção de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (NAKAMURA; FERREIRA, 1987). Prostanóides e aminas simpatomiméticas representam os mediadores finais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro hipernociceptivo. Cabe ressaltar que em camundongos, não só o TNF- $\alpha$ , mas também a quimiocina derivada de queratinócitos KC/CXCL1 são as primeiras citocinas liberadas pela carragenina, sendo sucedidas pela IL-1 $\beta$ . Porém, diferentemente do TNF- $\alpha$ , o KC/CXCL1 age também via liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005).

Diferentemente da carragenina, a prostaglandina E<sub>2</sub> não induz resposta inflamatória, mas age sensibilizando diretamente o neurônio sensitivo primário por atuar em receptores EP presentes na membrana dos neurônios (SOUTHALL; VASKO, 2001). Estes receptores, acoplados a segundos-mensageiros (DRAY, 1995), causam diminuição do limiar de dor (DRAY, 1995; FERREIRA; NAKAMURA, 1979). Esta hipernocicepção é decorrente da ativação de receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gs), resultando na estimulação da adenilato ciclase e aumento de AMPc intracelular (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO; LEVINE, 1991). Estes mensageiros secundários ativam as vias PKA dependente de AMPc (CUNHA et al., 1999) e PKC dependente de fosfolipase C (PARADA et al., 2003), resultando na despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nociceptivo (FERREIRA; LORENZETTI, 1994). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a PGE<sub>2</sub> aumenta a excitabilidade neuronal por suprimir as correntes de potássio (EVANS; SUMMERS, 1999) e/ou aumentando a atividade de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1996).

Como mencionado anteriormente, a caracterização dos múltiplos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da dor tem contribuído para o avanço no conhecimento

da fisiopatologia dos processos nociceptivos e de seu controle, bem como para a descoberta de novos fármacos analgésicos.

Neste sentido, os objetivos atuais da pesquisa de novos fármacos visam o desenvolvimento de opióides e analgésicos não esteroidais que possuam menos efeitos adversos, inibidores dos transmissores centrais que medeiam a dor, bloqueadores seletivos de canais para sódio  $Na_v$  1.8 e  $Na_v$  1.9 e drogas que promovam a abertura de canais para potássio presentes nas fibras nociceptivas (CURY;PICCOLO, 2006).

#### *1.4. Estudos experimentais com venenos de insetos*

Diversos fatores justificam o sucesso biológico dos insetos, entretanto um aspecto geralmente pouco discutido é sua extraordinária versatilidade química (MEINWALD; EISNER, 1995). Neste sentido, estudos experimentais apontam para diversos efeitos tóxicos indesejáveis provocados pelas toxinas destes animais, tais como, nocicepção e inflamação, bem como atividades hemolíticas (MENDES;PALMA, 2006; MURATA et al., 2006).

Por outro lado, diversas moléculas isoladas das secreções dos insetos, assim como de muitos outros Artrópodes, apresentam propriedades de importância terapêutica tais como, efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antimicrobiano (MORTARI et al., 2007; MORTARI et al., 2007; KONNO et al., 2006).

Dentre os insetos, algumas espécies de vespas possuem um papel especial no processo evolutivo, sendo mais evoluídas socialmente (HUGHES et al., 2008). Apesar do grande número de espécies de vespas sociais com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, pouco se conhece a respeito da composição dos venenos desses insetos, especialmente de regiões neotropicais (MENDES et al., 2005).

Os primeiros estudos datam de 1954, quando diversos peptídeos relacionados à bradicinina, foram identificados em venenos de diferentes espécies de vespas. O processo inflamatório e doloroso, decorrente da picada desses insetos deve-se, pelo menos em parte, a ação desses peptídeos alternando a permeabilidade vascular e à sua ação ativando neurônios nociceptivos (GRIESBACHER et al., 1998). Entretanto, além das bradicininas, um grande número de outras substâncias também participa da sintomatologia observada. Os venenos de vespas são também constituídos de aminas biogênicas (histamina, serotonina, dopamina e noradrenalina), de peptídeos policatiônicos biologicamente ativos (mastoparanos e peptídeos quimiotáticos) e de enzimas como a hialuronidase e fosfolipases (GRIESBACHER et al., 1998; DE SOUZA et al., 2005; CHEN et al., 2006).

Peptídeos policatiônicos geralmente contêm de 12 a 50 resíduos de aminoácidos e uma rede de cargas positivas de +2 à +7 devido ao excesso de resíduos de aminoácidos; os resíduos hidrofóbicos representam mais que 50% da sua sequência de aminoácidos (DE SOUZA et al., 2005). Peptídeos desgranuladores de mastócitos (MCD) ou mastoparanos e peptídeos quimiotáticos estão entre os componentes majoritários encontrados em venenos de vespas (HO et al., 2001).

Os mastoparanos são tetradecapeptídeos aminados capazes de liberar histamina do interior de mastócitos, serotonina de plaquetas, catecolaminas e ácido adenílico de células cromafins das adrenais, além de causar exocitose em células pituitárias e células  $\beta$  pancreáticas (NAKAJIMA et al., 1985).

O segundo grupo mais importante de peptídeos biologicamente ativos em venenos de insetos são os peptídeos quimiotáticos. São tridecapeptídeos que apresentam muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e geralmente um único resíduo básico. Estes peptídeos atraem macrófagos e leucócitos polimorfonucleares ao redor da região da picada. Dependendo da sua sequência primária, esses peptídeos podem causar hemólise e exibir fraca atividade na desgranulação de mastócitos (DE SOUZA et al., 2005).

Hanson et al. (1974), observaram pela primeira vez o efeito anti-inflamatório de peptídeos desgranuladores de mastócitos (MCD). A inibição de edema de pata induzido por carragenina por um MCD isolado do veneno de abelhas foi 100 vezes mais efetiva que o corticosteróide hidrocortisona. Outro peptídeo desgranulador de mastócitos, na dose de 1mg/kg foi capaz de inibir o extravasamento de azul de Evans (BANKS et al., 1976) e inibir 87% do edema de pata induzido por carragenina (MARTIN; HARTTER, 1980), sendo considerado um inibidor da síntese de prostaglandinas. Esses peptídeos quando administrados em pequenas doses, demonstraram efeitos inflamatórios por induzir a liberação de histamina (BANKS et al., 1976; BUKU, 1999).

Três novos peptídeos do tipo mastoparanos foram identificados do veneno de *Protopolybia exigua*, caracterizados como moduladores da desgranulação de mastócitos por interação com receptores ligados à proteína G (MENDES et al., 2005). Foram identificados também um novo mastoparano e peptídeos quimiotáticos em *Agelaia pallipes pallipes* (MENDES et al., 2004). Novos peptídeos inflamatórios foram descritos do veneno de *Polybia paulista*, apresentando acetilação na porção N-terminal, responsável pela modulação da quimiotaxia de células polimorfonucleares, desgranulação de mastócitos, liberação de histamina, citólise de eritrócitos e atividade antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005).

Além dos estudos com venenos de vespas, substâncias isoladas dos venenos de abelhas e formigas induzem nocicepção, antinocicepção e inflamação (CUI et al., 2008; KWON et al., 2001; MATUSZEK et al., 1992; SCHMIDT et al., 1986).

Neste sentido, Li & Chen (2004) demonstraram que a melitina, a substância tóxica majoritária do veneno de *Apis mellifera*, injetado em uma das patas dos ratos, induz hiperalgesia (aumento da sensibilidade dolorosa) e alodinia (dor em resposta a um estímulo tátil) nesses animais. Ainda, esta substância induziu extravasamento plasmático e sudorese na pata dos ratos. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a melitina, injetada na região subcutânea, promoveu aumento de disparos espontâneos de neurônios da medula espinhal (LI; CHEN, 2004).

Nesse sentido, diversos trabalhos de Kwon e colaboradores (2006) apontam para o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do veneno bruto de espécies de abelha em diversos modelos de sensibilidade dolorosa, tais como teste da formalina e dor visceral induzida por injeções de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos.

Ainda, Mortari et al., 2007, demonstraram que um peptídeo neuroativo isolado do veneno da vespa social da espécie *Polybia occidentalis*, injetado por via intracerebroventricular, apresenta efeito antinociceptivo, avaliado em dois testes de sensibilidade dolorosa, o modelo da placa quente e retirada da cauda (tail-flick). Este efeito foi duas vezes mais potente que a morfina, droga analgésica usualmente utilizada na clínica médica.

O melhor entendimento nos efeitos e/ou mecanismos envolvidos nas atividades de substâncias isoladas dos venenos de insetos, pode vir a contribuir para a utilização destas substâncias como ferramentas para a compreensão da inflamação e dor e/ou para o desenvolvimento de novas drogas para utilização na clínica médica.

### 1.5. $\beta$ -feniletilamina (2-FEA)

A 2-FEA é um vestígio de amina endógena identificada no cérebro de mamíferos, tais como roedores (BOULTON et al., 1990; PATERSON et al., 1990), ovelhas (REYNOLDS et al., 1980) e humanos (PHILIPS et al., 1978). Foi revelado através de estudos bioquímicos, que as regiões mais abundantes em 2-FEA são nas estruturas putânicas mesolímbicas e caudais do cérebro (PATERSON et al., 1990; PHILIPS et al., 1978; REYNOLDS et al., 1980). A facilidade com que a 2-FEA, um neuromodulador solúvel em lipídio (SZABO et al., 2001), atravessa a barreira hemato-encefálica, faz com que esta substância seja acumulada

rapidamente no cérebro (TOCCO et al., 1985). Boulton (1978) e Niddam (1985) designaram a  $\beta$ -feniletilamina e outros resíduos de amina de neuromoduladores que atuam como co-transmissores na neurotransmissão catecolaminérgica.

Dados experimentais *in vivo* e *in vitro* mostraram que a 2-FEA interage com sistemas monoaminérgicos (BUNZOW et al., 2001) e atua fortemente na liberação de norepinefrina no sistema nervoso central (BRAESTRUP;RANDRUP, 1978). É farmacologicamente ativa na indução de um comportamento característico, em regimes que visam à perda de peso e no aumento da atividade motora geral (MOSNAIM et al., 2014; NYAKAS et al., 1992). Além disso, possui impacto em doenças como déficit de atenção, na depressão e na esquizofrenia (IRSFELD et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, o veneno da vespa *Polybia paulista* é composta por várias substâncias biologicamente ativas, e dentre essas substâncias citamos a 2-FEA. Esse composto é encontrado no veneno da *Polybia paulista* é similar às anfetaminas, que estão entre as drogas de abuso mais comuns. Este tipo de droga promove uma sensação de “poder” ao usuário que passa da euforia à depressão instantaneamente após o efeito da droga acabar (POGORELOV et al., 2007)

São poucos os trabalhos da literatura que mostram que as anfetaminas produzem efeito antinociceptivo. Matsuoka e colaboradores (1993) relataram que este efeito antinociceptivo é mediado por receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos. Além disso, foi demonstrado pelos mesmos autores que o efeito antinociceptivo envolve a participação de serotonina endógena, norepinefrina e opióides endógenos (MATSUOKA et al., 1988).

Apesar da existência destes trabalhos, não foi, até o momento, estudado e caracterizado o efeito e a função da 2-FEA presente no veneno da vespa *Polybia paulista* em animais de laboratório.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito sobre a atividade geral, analgésica/ hiperalgésica, anti-inflamatória ou inflamatória da substância  $\beta$ -feniletilamina (2-FEA) isolada do veneno de vespa *Polybia paulista*, com o intuito de selecionar uma molécula com atividade farmacológica. Espera-se também, através desta caracterização da 2-FEA presente no veneno, realizada pela primeira vez nesta dimensão de proposta, contribuir para o melhor entendimento da composição do veneno e dos mecanismos envolvidos no envenenamento.

### 2.1. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito hiperalgésico, analgésico ou inflamatório/anti-inflamatório da 2-FEA em modelo de avaliação da sensibilidade dolorosa;
- Avaliar a atividade geral dos animais administrados com a 2-FEA;
- Avaliar se a 2-FEA interfere com a reatividade da traqueia e da artéria femoral.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção e extração dos venenos

O veneno foi extraído de vespas da espécie *Polybia paulista*, cujos ninhos foram coletados na região de Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil.

Os reservatórios de veneno foram extraídos manualmente com auxílio de pinças de ponta fina. Depois de extraídos, os reservatórios foram comprimidos com auxílio de um bastão de vidro com ponta arredondada. Em seguida, este material foi centrifugado em uma micro centrífuga de alta rotação MSE (SANYO) a 8000 rpm por 10 minutos, em presença de solução de Acetonitrila (MALLINCKRODT) 60% e 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) (CARLO ERBA REAGENTI); o sedimento foi descartado. O sobrenadante foi filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (ADVANTEC) e em seguida, liofilizado em liofilizador MLW (LGA 05) (HETO) acoplado a um concentrador de amostras a vácuo (HETO) e mantido à  $-20^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado,

#### 3.2. Purificação da 2-FEA

Para a purificação da  $\beta$ -feniletilamina proveniente da síntese manual realizado pela empresa SIGMA-ALDRICH, foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com “loop” de 0,5 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo CBM-10A) e coluna semipreparativa C-18 10x250mm (SHISEIDO). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, A (acetonitrila 100% (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v)) e B (água, contendo 0,1% TFA (v/v)).

#### 3.3 Atividades farmacológicas

##### 3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 18-21g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP-Campus Botucatu. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro (12:12 h). O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal



da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-Unesp-Rio Claro (Protocolo 2732) e obedeceu às normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP).

### *3.3.2 Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo do Campo Aberto*

Este teste foi realizado utilizando diversas doses de 2-FEA (0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10, 25, 40, 50, 75 e 100 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal, comparando os resultados obtidos com o grupo controle constituídos por animais que receberam salina (controles). Desta maneira, foi determinada a dose, tempo e via de administração que não induzia alteração na atividade geral dos animais para os estudos subsequentes sobre as atividades antinociceptiva ou anti-inflamatória.

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto. O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 40 cm de altura e base circular de 40 cm de diâmetro, pintada de branco.

O chão da arena é subdividido em 25 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 levantamento (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.

### *3.3.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa*

Foi utilizado o teste do Von Frey eletrônico, bem como o paquímetro para determinar o efeito anti-inflamatório (descrito no item a seguir). Os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica foi mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1

g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA). O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro foi retirado. O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem maiores que 1 g. Os animais foram submetidos ao von Frey em diversos tempos após a administração, por via intraplantar, dos peptídeos e carragenina (controle positivo). Os animais foram submetidos ao von Frey após a administração de 2-FEA, carragenina e salina.

#### *3.3.4 Avaliação do efeito inflamatório ou edematogênico*

Foi avaliado o efeito edematogênico da 2-FEA. Os animais receberam uma aplicação intraplantar (em uma das patas) de 2-FEA, carragenina 1%, ou veículos (controles). O volume da pata foram realizadas nos tempos zero (imediatamente após as injeções do 2-FEA ou carragenina) e em diversos tempos, utilizando um Paquímetro digital marca Mitutoyo<sup>R</sup> (Código 500-196-20B) de especificação 0-150X0,01 mm paquímetro (modelo CD-6''CSX-B, Mitutoyo Sul Americana Ltda).

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$$A (\%) = (V_f - V_i) \times 100 / V_i$$

Onde: A (%) = aumento percentual do volume da pata;

$V_i$  = volume inicial da pata;

$V_f$  = volume da pata após a injeção do 2-FEA, carragenina ou veículo (controle).

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com veículo) dos valores testes (animais injetados com o 2-FEA).

#### *3.3.5 Análise da atividade contrátil de tecido isolado - reatividade da traqueia*

O objetivo deste teste foi verificar se o 2-FEA era capaz de alterar a resposta contrátil da traqueia frente à realização de curva concentração efeito da metacolina (agonista

colinérgico). Dados da literatura mostram que drogas tipo anfetamina promovem euforia seguida de relaxamento da musculatura (MATSUOKA et al., 1993). Este teste da reatividade da traqueia foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima e a pesquisadora Dra. Adriana Lino, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As traqueias foram devidamente separadas e colocadas individualmente em placas de cultura celular em meio de cultura DMEN (1mL). Foi adicionado 50µg de 2-FEA em cada poço. As placas foram colocadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 1 hora. As porções de traqueia foram colocadas no aparelho POWERLAB sob uma tensão inicial de 500mg. Após esta estabilização foi realizada a curva concentração-efeito obtidas pelo método das doses cumulativas (VAN ROSSUM, 1963).

### *3.3.6 Análise da atividade contrátil de tecido isolado – artéria femoral*

O objetivo deste teste foi realizar curva dose resposta em músculo liso vascular (artéria femoral) e avaliar o efeito do 2-FEA nesta musculatura. Foi avaliada a atividade contrátil através da utilização de agonistas contráteis, dentre os quais citamos a  $\alpha$ -1 fenilefrina, serotonina, e um análogo do tromboxano A<sub>2</sub> (U46619). Foram testados também bloqueadores, dentre eles o  $\beta$  propanolol, a  $\alpha$ -1 prazosina e a  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 fentolamina. Os experimentos foram realizados em colaboração com os docentes e pesquisadores Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dra. Maria Andréia Delbin e Profa. Dra. Fabíola Zakia Taufic Mónica, no Departamento de Farmacologia – FCM da Universidade Estadual de Campinas.

Primeiramente as artérias femorais dos camundongos foram retiradas em anéis, lavadas e isoladas. Em seguida elas foram, individualmente, trespassadas por dois fios de tungstênio de aproximadamente 20µm e inseridas em poços, com solução de Krebs, carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), além de manter o sistema todo a 37°C. Após a estabilização dos tecidos em seus respectivos poços, foram acrescentadas a solução de 2-FEA 10<sup>-1</sup>M (100mg/kg) e dos agonistas sob uma tensão inicial de 4mN, que ao decorrer do tempo, geraram uma curva de contração em resposta à 2-FEA e aos agonistas.

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para os experimentos realizados no Campo Aberto, no von Frey eletrônico e no paquímetro digital, os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Os dados referentes aos tratamentos foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (KLEIBAUM et al, 1998).

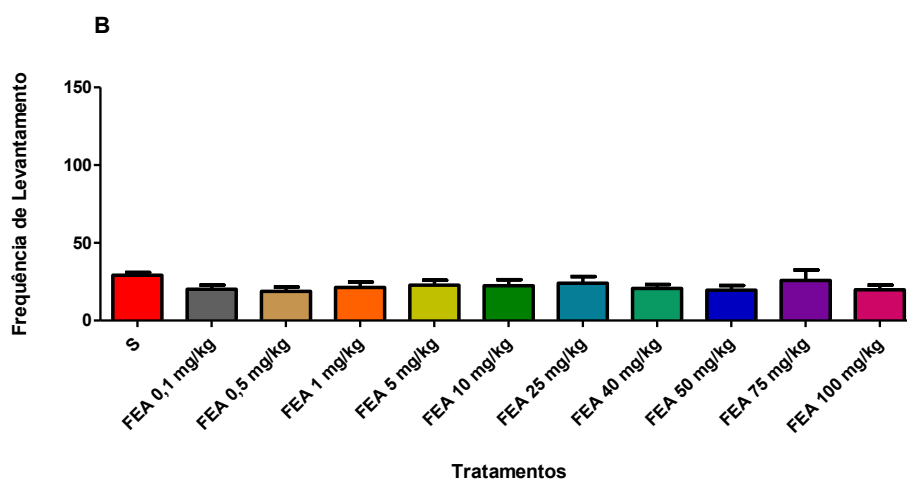
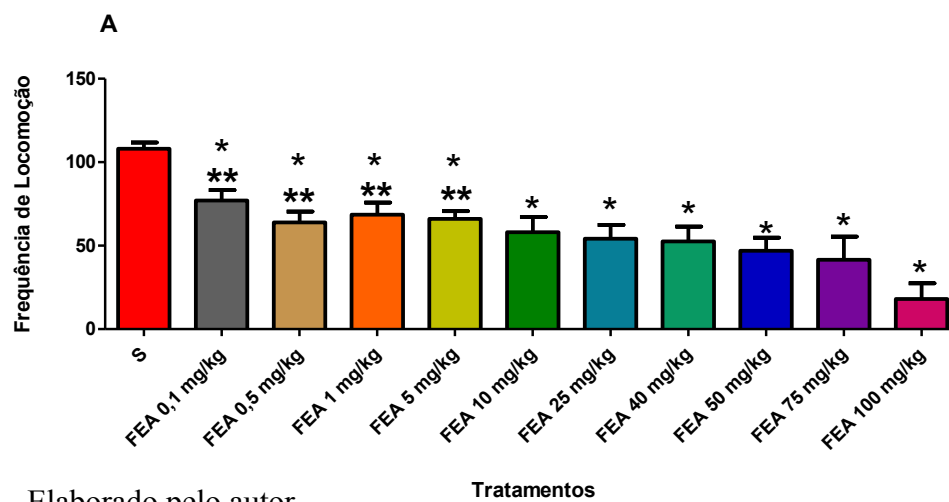
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade Geral - Campo aberto

Nos animais tratados com 2-FEA foi observado que doses elevadas (10, 25, 40, 50 75 e 100 mg/kg) desse composto promovem diminuição significativa da atividade de locomoção dos animais, quando comparados aos animais controles tratados com salina. Os resultados mostraram também que as doses de 0,1, 0,5, 1 e 5 mg/kg de 2-FEA induzem diminuição da atividade de locomoção dos animais quando comparados aos animais controles tratados com salina e dos animais tratados com 100 mg/kg de 2-FEA (Figura 1A). Apesar da ausência de significância entre as doses mais elevadas (a partir de 10 mg/kg até 100 mg/kg), os resultados mostraram que tais doses induzem maior diminuição da locomoção. Não houve diferença significativa da frequência de levantamento dos animais tratados com 2-FEA, independentemente das doses utilizadas, com o grupo salina (Figura 1B).

Dados da literatura mostram que ocorre uma diminuição significativa da atividade geral em ratos quando administrados com 2-FEA na dose de 0,5 mg/kg (NYAKAS, 1991). A redução da atividade geral dos animais foi idade-dependente. Estes resultados foram obtidos utilizando ratos como modelo animal, bem como o campo aberto diferentemente do presente em nosso laboratório, de 45 cm de diâmetro e com aproximadamente 25 quadrantes, era retangular e reduzido (20 x 20 x 30 cm) (NYAKAS, 1991). É importante ressaltar que mesmo com as diferenças de protocolo utilizados pelo nosso trabalho e o de Nyakas e colaboradores, nossos resultados corroboram com os dados da literatura que mostram que doses mais baixas de 0,1, 0,5, 1 e 5 mg/kg de 2-FEA induzem diminuição da atividade de locomoção dos animais quando comparados aos animais controles tratados com salina.

**Figura 1 – Efeito do tratamento com 2-FEA ( $\beta$ -feniletilamina) em diferentes doses e tempo, sobre a atividade motora geral dos camundongos.** O efeito sobre a atividade motora geral foi avaliado através das frequências de locomoção (A) e levantamento (B) dos animais no campo aberto. As medidas nas doses de 50mg/kg e 75 mg/kg foram realizadas 15 minutos após a administração do 2-FEA, já nas doses de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 40 mg/kg e 100 mg/kg, as medidas foram realizadas 10 minutos após a mesma. O grupo experimental foi composto por animais administrados com 2-FEA via intraperitoneal (i.p.). Em todas as doses, o grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina (S). \* representa diferença entre o grupo de animais 2-FEA em relação ao grupo salina. \*\* representa a diferença entre os animais do grupo 2-FEA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM de 10 animais por grupo. \* $p$ <0,001 em relação ao grupo salina (S).



## 5.2 Dor e edema – von Frey eletrônico e paquímetro digital

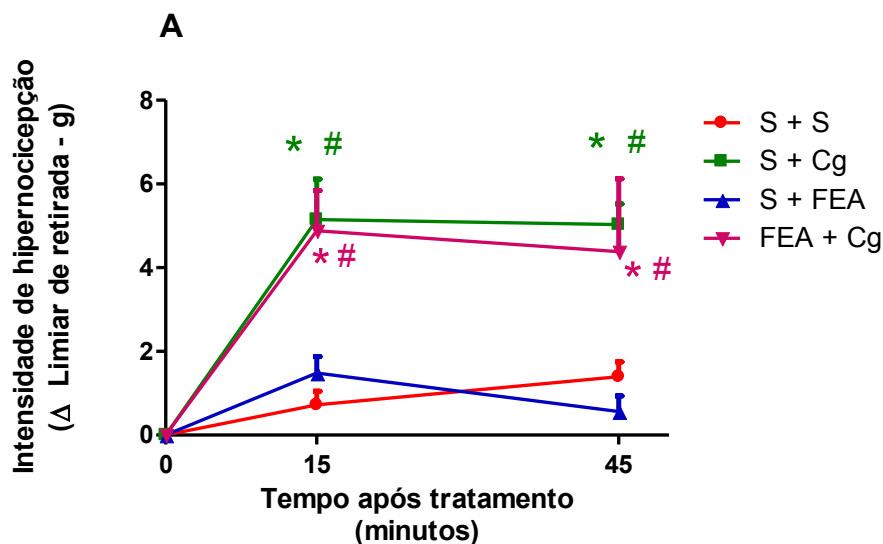
Dados da literatura apontavam para a atividade antinociceptiva da dose de 50mg/kg de 2-FEA (MATSUOKA, 1988). Portanto, esta dose foi a escolhida para a avaliação da possível atividade analgésica do 2-FEA sintetizado a partir do veneno de *Polybia paulista* no teste do von Frey eletrônico. Nossos resultados mostraram que o 2-FEA *per se* não foi capaz de induzir antinocicepção, nem hipernocicepção, uma vez que não houve diferença significativa entre os animais tratados com Salina + 2-FEA e Salina + Salina (controle). Ainda, a 2-FEA (50 mg/kg) na presença de agente flogístico, induzindo um processo inflamatório (carragenina, Cg), não foi capaz de reverter a hipernocicepção induzida pela carragenina (Figura 2A).

Em relação à atividade edematogênica, foi demonstrado que 2-FEA *per se* não foi capaz de induzir inflamação, uma vez que não houve diferença significativa entre os animais tratados com Salina + 2-FEA e Salina + Salina (controle). Ainda, a 2-FEA na dose de 50 mg/kg na presença de agente flogístico induzindo um processo inflamatório (carragenina, Cg) não foi capaz de reverter este fenômeno induzida pela carragenina (Figura 2B).

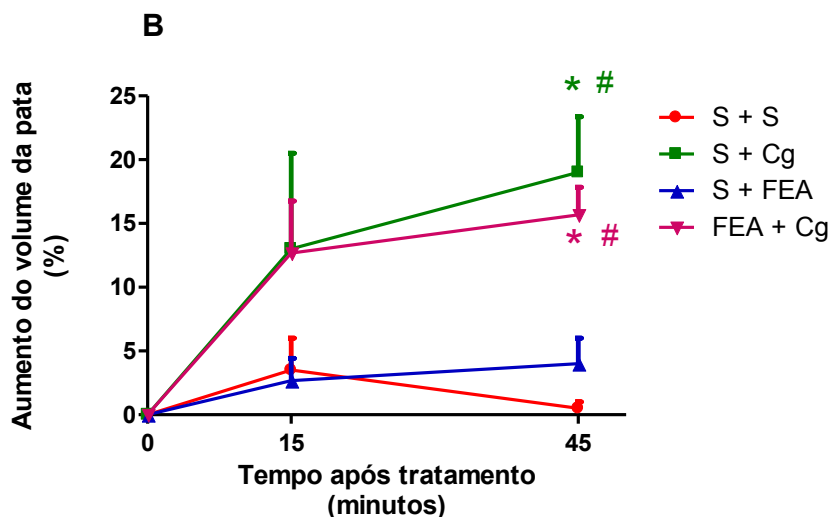
Além da dose de 50m/kg, foi testada a dose de 100mg/kg, uma vez que esta foi a maior dose que promoveu a redução da atividade geral dos animais. Uma vez que o teste do Von Frey eletrônico elicita uma resposta motora tornou-se necessário avaliar se a diminuição na atividade geral dos animais alterava a resposta no teste do Von Frey. Os resultados mostraram que o 2-FEA *per se* não foi capaz de induzir antinocicepção, nem hipernocicepção. Ainda, a 2-FEA (na dose de 100 mg/kg) na presença de agente flogístico induzindo um processo inflamatório (carragenina, Cg) não foi capaz de reverter a hipernocicepção induzida pela carragenina (Figura 3A). Em relação à atividade edematogênica, foi demonstrado que 2-FEA *per se* não foi capaz de induzir inflamação, e não foi capaz de reverter este fenômeno induzida pela carragenina (Figura 3B).

Dados da literatura sugerem que a 2-FEA possui atividade antinociceptiva que envolve a participação de serotonina endógena e peptídeos opióides. Além disso, a 2-FEA induz liberação de norepinefrina no sistema nervoso central (SNC) que pode atuar na nocicepção (MATSUOKA, 1988). Porém, nas nossas condições experimentais ensaiadas, estes efeitos não foram observados.

**Figura 2 – Efeito do tratamento com 2-FEA ( $\beta$ -feniletilamina) em diferentes doses e tempo, sobre o efeito hiperalgésico/analgésico e inflamatório/anti-inflamatório em camundongos.** O efeito sobre o efeito hiperalgésico/analgésico e inflamatório/anti-inflamatório foi avaliado através da intensidade de hipernociceção (A) e aumento do volume da pata (B), respectivamente. As medidas foram realizadas em diferentes tempos (15 e 45 minutos) na dose de 50mg/kg, a carragenina (Cg) foi administrada por via intraplantar (i.pl.), a 2-FEA foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) e via i.pl. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina (S) administrada por via i.p. e i.pl. Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM de 10 animais por grupo. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo salina (S) e #  $p < 0,001$  em relação ao grupo salina + 2-FEA.



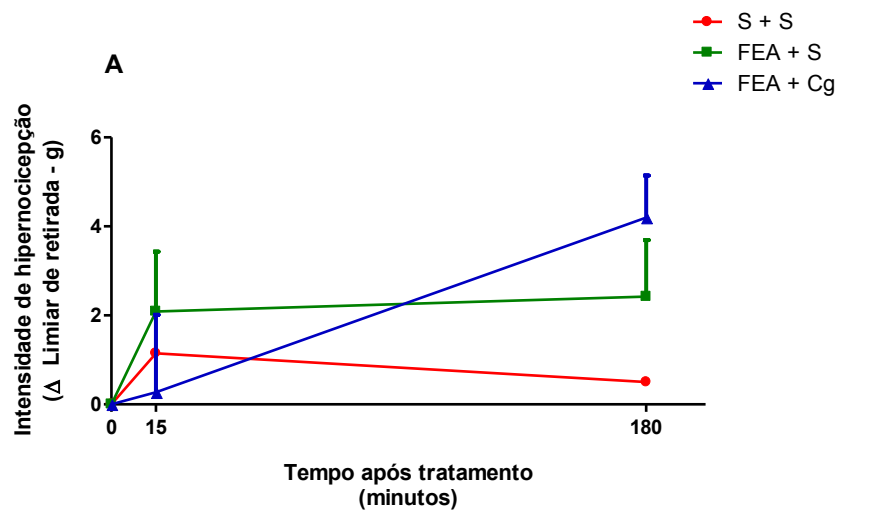
Elaborado pelo autor.



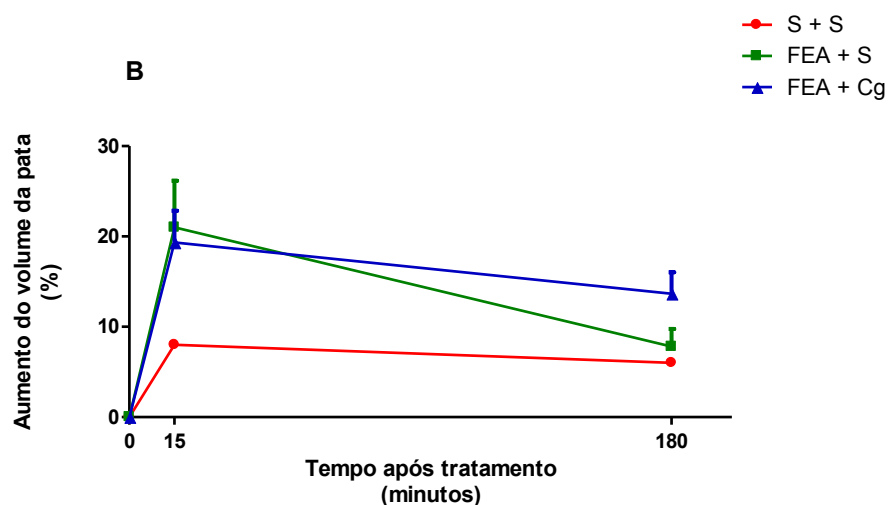
Elaborado pelo autor.



**Figura 3 – Efeito do tratamento com 2-FEA ( $\beta$ -feniletilamina) em diferentes doses e tempo, sobre o efeito hiperalgésico/analgésico e inflamatório/anti-inflamatório em camundongos.** O efeito sobre a atividade hiperalgésica/analgésica e inflamatória/anti-inflamatória foi avaliado através da intensidade de hipernociceção (A) e aumento do volume da pata (B), respectivamente. As medidas foram realizadas em diferentes tempos (15 e 180 minutos) na dose de 100mg/kg, a carragenina (Cg) foi administrada por via intraplantar (i.pl.), a 2-FEA foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) e via i.pl. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina (S) administrada por via i.p. e i.pl. Os resultados foram expressos como média  $\pm$ SEM de 10 animais por grupo. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo salina (S).



Elaborado pelo autor.



Elaborado pelo autor.

### 5.3 Reatividade da traqueia e artéria femoral

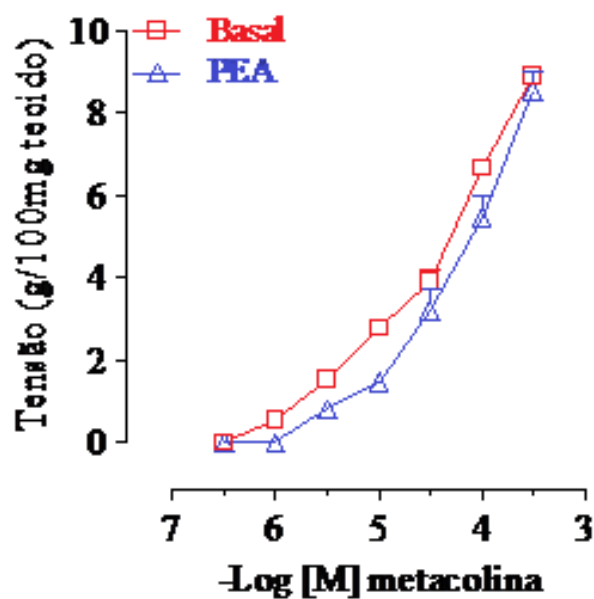
A dose de 50mg/kg de 2-FEA não interferiu com a reatividade da traqueia, uma vez que apresentou curva semelhante à da metacolina (Figura 4).

Uma vez que não houve reatividade observada em musculatura das vias aéreas, investigamos o efeito desta substância em musculatura vascular. Nossos resultados mostraram que o tecido estava viável (Tabela 1). Ainda, a reatividade do 2-FEA quando comparado com diferentes agonistas mostrou que a contração da artéria induzida por este composto iniciou-se entre as concentrações de  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M sendo que a dos agonistas foi na faixa de  $10^{-9}$  até  $10^{-6}$  M; portanto, a 2-FEA não se apresenta como um potente indutor da contração da artéria femoral. O análogo do tromboxano A<sub>2</sub> foi o que apresentou maior efeito contrátil (agonista mais potente). Cabe ressaltar que a contração máxima da 2-FEA foi de  $2,9\text{mN/mm} \pm 0,6$  quando comparado a contração do análogo do tromboxano A<sub>2</sub> que foi de  $4,2\text{mN/mm} \pm 0,8$  (Figura 5A).

Após avaliar o efeito da 2-FEA comparando-o com o de agonistas contráteis, foi avaliado o efeito de diferentes antagonistas de receptores específicos. A 2-FEA em conjunto do propranolol, foi capaz de promover maior contração, da ordem de  $5,1\text{mN/mm}$ , indicando uma possível participação dos receptores  $\beta$  neste efeito contrátil. Ainda, a 2-FEA em conjunto com a prazosina, antagonista de receptor  $\alpha$ -1, foi capaz de causar contração do tecido vascular mostrando a possível participação deste receptor nesta ação. Por outro lado, a fentolamina, um receptor não específico de  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2, foi capaz de causar o menor nível de contração em relação à 2-FEA *per se*, de  $3,1\text{mN/mm}$  para  $1,7\text{mN/mm}$  (Figura 5B).

A ativação dos receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos por catecolaminas desencadeia uma série de respostas funcionais no sistema cardiovascular, que inclui respostas cronotrópicas positivas e controle do tônus vascular (DELBIN, 2012). A vasoconstrição mediada pelos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tem sido estudada com mais profundidade do que a vasodilatação mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (DELBIN, 2012). Essas relações entre os efeitos da 2-FEA com os diferentes subtipos de receptores adrenérgicos tornam-se importantes para uma melhor caracterização dos mecanismos de ação desse composto. Em conjunto com os antagonistas e agonistas de receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, diferentes níveis de contração foram observados, indicando, possivelmente, que a 2-FEA possui ação nos dois receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos. Embora a análise dos perfis das figuras 5A e 5B demonstre que a 2-FEA pode atuar tanto em receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , ainda é precoce concluirmos a exata ação farmacológica que essa anfetamina promove na artéria femoral.

**Figura 4 – Efeito da  $\beta$ -feniletilamina na reatividade da traqueia.** O efeito sobre a reatividade da traqueia foi avaliado através da tensão (g/100mg de tecido) e da concentração de droga (-Log [M] metacolina) com que o anel de traqueia reagiu à 2-FEA. A curva foi realizada na dose de 100mg/kg. Foi feita a comparação da curva da resposta à 2-FEA com a curva basal, em resposta à metacolina.



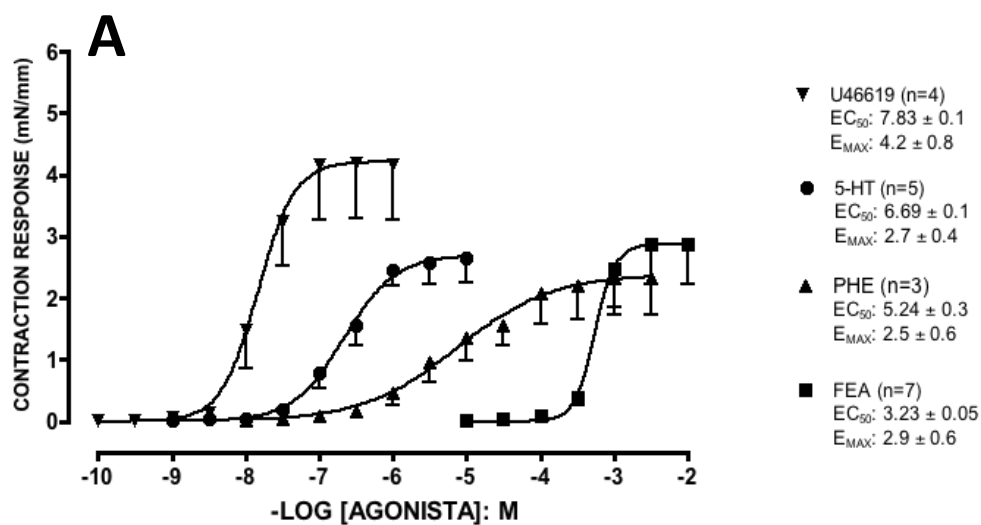
Elaborado por Dra. Adriana Lino.

**Tabela 1 –** Dados gerais da artéria femoral e da tensão inicial do miógrafo, bem como a viabilidade do tecido, representado pelos valores em resposta ao KCl.

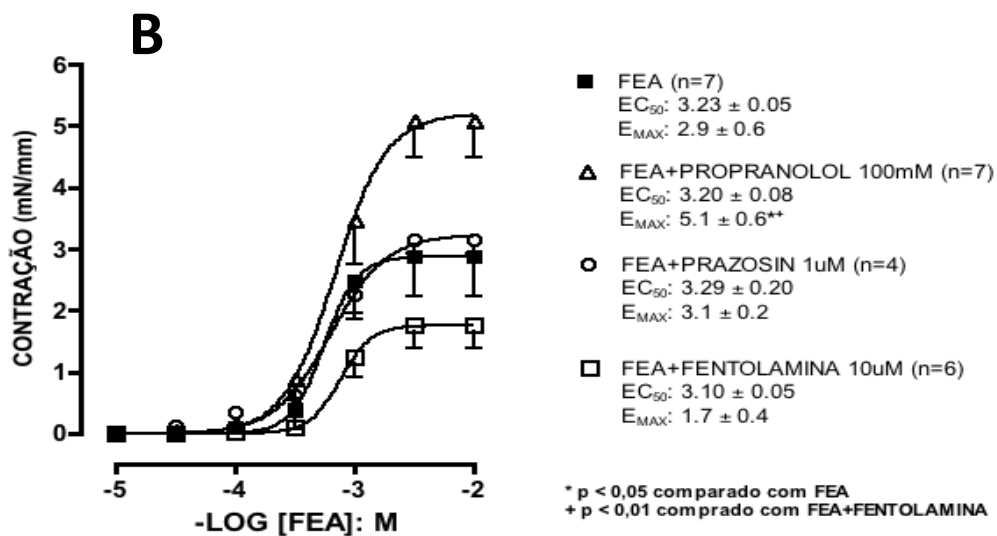
	Controle (n = 7)
Peso (g)	36,0 ± 2,2
Diâmetro artéria femoral	305,0 ± 13,0
Tensão basal (mN)	4,4 ± 0,3
Contração ao KCl 80 mM (mN/mm)	4,5 ± 0,7

Elaborado por Dra. Adriana Lino.

**Figura 5 – Efeito do tratamento com 2-FEA ( $\beta$ -feniletilamina) e diferentes agonistas e bloqueadores na contração da artéria femoral de camundongos.** Cada curva representa um anel de artéria femoral, isolado do camundongo e devidamente preparado no miógrafo. Os valores máximos de contração para cada tratamento estão representados por  $E_{MAX}$ . O efeito sobre a contração da artéria femoral foi avaliado através da comparação das respostas contráteis dos agonistas serotonina, fenilefrina e análogo do tromboxano A2 (U46619) (A) e dos bloqueadores propranolol, prazosina e fentolamina (B), respectivamente. As curvas foram realizadas na dose de 100mg/kg de 2-FEA.



Elaborado por Profa. Dra. Maria Andreia Delbin.



Elaborado por Profa. Dra. Maria Andreia Delbin.

## 6 CONCLUSÃO

Matsuoka e colaboradores demonstraram que a  $\beta$ -feniletilamina (2-FEA) apresenta efeito analgésico em vasos deferentes isolados (MATSUOKA, 1988, 1993). Essa condição de agente analgésico não foi observada no modelo de hiperalgesia pelo método do von Frey eletrônico. Uma possível atividade anti-inflamatória também foi experimentada através da medida de edema na pata dos camundongos, entretanto, a análise dos resultados não corroborou essa possibilidade.

Ainda, segundo a literatura, a 2-FEA interfere na atividade geral de ratos no campo aberto (POGORELOV et al., 2007; NYAKAS et al., 1991). A análise dos resultados referentes à atividade geral dos camundongos mostrou uma relação de dose-dependência. Assim, conforme as doses foram aumentando, principalmente a locomoção dos animais diminuiu, sendo que o levantamento não sofreu grandes aumentos ou reduções.

A literatura ainda relata que compostos da família das anfetaminas como a 2-FEA induzem um comportamento de euforia seguido de um relaxamento da musculatura (MATSUOKA, 1993). A 2-FEA *per se* não induziu alterações na reatividade das vias aéreas, embora tenha provocado contrações em artérias femorais. Além disso, quando combinada a diferentes antagonistas específicos –  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos – a 2-FEA mostrou uma plasticidade no potencial contrátil, apresentando tanto baixos como altos níveis de contração. As incertezas sob qual via farmacológica essas contrações atuam, permitem um estudo mais aprofundado na compreensão dos mecanismos aqui apresentados.

As atividades descritas para este composto sugerem papel na auto-defesa de vespas sociais contra predadores (na maior parte dos casos vertebrados), potencializando o pânico, desorientação, taquicardia, entre outros efeitos. Estas ações somadas ao conjunto de outras ações observadas para as diversas substâncias presentes no veneno bruto de *Polybia paulista* causam um grande desconforto físico às vítimas de ferroadas compondo a chamada “defesa mneumônica”, fazendo com que muitas pessoas e animais desenvolvam uma fobia incontrolável a estes insetos.

Concluindo, apesar dos comportamentos observados em resposta às diferentes doses e concentrações da 2-FEA e em diferentes modelos experimentais, não se pode afirmar que esses resultados são concretos ao observarmos os casos mais comuns por ferroadas na natureza, onde a própria dose de veneno bruto é baixa.

## REFERÊNCIAS

- AIMONE, L.D.; YAKSH, T.L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. **Peptides**, v. 10, n. 6, p. 1127-31, 1989.
- ANTONICELLI, L. et al. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.2, n.4, p. 341-6, 2002.
- BANKS, B.E. et al. The isolation and identification of noradrenaline and dopamine from the venom of the honey bee, *Apis mellifca*. **Toxicon**, v. 14, n. 2, p. 117-25, 1976.
- BEVAN, S. in Text Book of Pain (eds. WALL, P.D. & MELZACK, R.) 85-103 (Churchill-Livingstone, Edinburgh. 1999).
- BOULTON, A.A. et al. Phenylethylamine in the CNS: effects of monoamine oxidase inhibiting drugs, deuterium substitution and lesions and its role in the neuromodulation of catecholaminergic neurotransmission. **J Neural Transm**, v. 29, p. 119-29, 1990.
- BOULTON, A.A. The tyramines: functionally significant biogenic amines or metabolic accidents? **Life Sci**, v. 23, n. 7, p. 659-71, 1978.
- BRAESTRUP, C.; RANDRUP, A. In: Noncatecholic Phenylethylamines, Part 1, p. 245-69, 1978.
- BUKU, A. Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. **Peptides**, v. 20, n. 3, p. 415-20, 1999.
- BUNZOW, J.R. et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 6, p. 1181-8, 2001.
- CASTRO, F.F.M. Alergia a Venenos de Insetos: 25 anos de experiência clínica. In: CASTRO, F.F.M. (Org.); PALMA, M.S. (Org.) **Alergia a Venenos de Insetos**. Barueri: Manole, 2009. p. 1-3. (Série Alergias).
- CAVIEDES, B.E.; HERRANZ, J.L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev Neurol**, v. 35, n. 11, p. 1037-48, 2002.
- CHEN, D.M. et al. Descending aortic thrombosis and cerebral infarction after massive wasp stings. **Am J Med**, v. 116, n. 8, p. 567-9, 2004.
- CHEN, Y.N. et al. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. **Neuroscience**, v. 138, n. 2, p. 631-40, 2006.
- COLBURN, R.W.; DELEO, J.A. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 6, p. 419-27, 1999.

CUI, X.Y. et al. Differential activation of p38 extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. **Mol Pain**, v. 4, p. 1-11, 2008.

CUNHA, F.Q. et al. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 3, p. 671-8, 1999.

CUNHA, F.Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-4, 1992.

CUNHA, T.M. et al.. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, 2005.

CURY, Y.; PICOLO, G. Animal toxins as analgesics--an overview. **Drug News Perspect**, v. 19, n. 7, p. 381-92, 2006.

DE SOUZA, B.M. et al. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 30, n. 8, p. 1387-95, 2009.

DE SOUZA, B.M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p. 2157-64, 2005.

DELBIN, M.A. et al. Interaction between serotonergic-and  $\beta$ -adrenergic receptors signaling pathways in rat femoral artery. **Arg Bras Cardiol**, v. 98, n. 1, p. 29-34, 2012.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, v. 75, n. 2, p. 125-31, 1995.

ELLIS, A.K., DAY, J.H. Clinical reactivity to insect stings. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 5, n. 4, p. 349-54, 2005.

ENGLAND, S. et al. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J Physiol**, v. 495, p. 429-40, 1996.

EVANS, R., SUMMERS, S., In: Levine, M.I., Lockey, R.F. (Eds.), American Academy of Allergy and Immunology. Monography on Insect Allergy. p. 23-8, 1986.

FERREIRA, S.H. et al. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 110, n. 3, p. 1227-31, 1993.

FERREIRA, S.H. et al. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 39-48, 1978.

FERREIRA, S.H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1479-85, 1994.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. III - Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. **Prostaglandis**, v. 18, n. 2, p. 201-8, 1979.

GOLD, M.S. et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 3, p. 1108-12, 1996.

GRIESBACHER, T. et al. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and release of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur J Pharmacol**, v. 351, n. 1, p. 95-104, 1998.

HANKS, G.W. et al. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. **Br J Cancer**, v. 84, n. 5, p. 587-93, 2001.

HANSON, J.M. et al. Anti-inflammatory property of 401 (MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee *Apis mellifera*. **Br J Pharmacol**, v. 50, n. 3, p. 383-92, 1974.

HISADA, M. et al. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, n. 4, p. 1048-54, 2005.

HO, C.L. et al. Enhancing the hypotensive effect and diminishing the cytolytic activity of hornet mastoparan B by D-amino acid substitution. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1561-6, 2001.

HOFFMAN, D.R. et al. Demonstration of IgE and IgG antibodies against venoms in the blood of victims of fatal sting anaphylaxis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 71, n.2, p. 193-6, 1983.

HUGHES, W.O. et al. Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. **J Evol Biol**, v. 21, n. 4, p. 1090-5, 2008.

IRSFELD, M. et al.  $\beta$ -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. **Webmedcentral**, v. 4, n. 9, p. 1-13, 2014.

JACOX, A. et al. New clinical-practice guidelines for the management of pain in patients with cancer. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 651-5, 1994.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

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

KLEINBAUM D.G. et al. Analysis of repeated measures data in Brooks/Cole Publishing Company (eds): Applied Regression Analysis and 38 Other Multivariable Methods. **Brooks/Cole Publishing Company**, New York, p.589–638,1998.



- KONNO, K. et al. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2624-31, 2006.
- KWON, Y.B. et al. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. **Pain**, v. 90, n. 3, p. 271-80, 2001.
- KWON, Y.B. et al. Substantial role of locus coeruleus-noradrenergic activation and capsaicin-insensitive primary afferent fibers in bee venom's anti-inflammatory effect. **Neurosci Res**, v. 55, n. 2, p. 197-203, 2006.
- LI, K.C.; CHEN, J. Altered pain-related behaviors and spinal neuronal responses produced by s.c. injection of melittin in rats. **Neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 753-62, 2004.
- MALASPINA, O. et al. Biologia dos Himenópteros Sociais. In: CASTRO, F.F.M. (Org.); PALMA, M.S. (Org.) **Alergia a Venenos de Insetos**. Barueri: Manole, 2009. p. 5-36. (Série Alergias).
- MANZOLI-PALMA, M.F.; GOBBI, N.; PALMA, M.S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. 179-85, 2003.
- MARTIN, W.; HARTTER, P. Basic peptides in bee venom, VI. Structure-activity studies on the anti-inflammatory effects of derivatives and fragments of the MCD-peptide. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 361, n. 4, p. 525-35, 1980.
- MATSUOKA, Y. et al. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the relation of endogenous norepinephrine to phenylethylamine analog-induced. **Japan J Pharmacol**, v. 48, p. 263-72, 1988.
- MATSUOKA, Y. et al. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the involvement of alpha-2-adrenoceptors. **Japan J Pharmacol**, v. 63, p. 101-8, 1993.
- MATUSZEK, M.A. et al. Pharmacological studies of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom: evidence for the presence of histamine, and haemolytic and eicosanoid-releasing factors. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 1081-91, 1992.
- McCORMIC, K.D.; MEINWALD. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J Chem Ecol**, v.19, n.10, p. 2411-51, 1993.
- MEINWALD, J.; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 1, p. 14-8, 1995.
- MENDES, M.A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes* pallipes. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2004.
- MENDES, M.A. et al. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 101-6, 2005.

- MENDES, M.A., PALMA, M.S. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2632-9, 2006.
- MORTARI, M.R. et al. Anticonvulsivant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 97, n. 5, p. 289-95, 2005.
- MORTARI, M.R. et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 6, p. 860-9, 2007.
- MOSNAIM, A.D. et al. Analgesic effects of  $\beta$ -phenylethylamine and various methylated derivatives in mice. **Neurochem Res**, v. 39, n. 9, p. 1675-80, 2014.
- MURATA, K. et al. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi iwatai*. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 12, p. 2493-7, 2006.
- NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v. 25, p. 115-21, 1986.
- NAKAJIMA, T. et al. Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides**, v. 6, p. 425-30, 1985.
- NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 135, n. 2, p. 145-53, 1987.
- NIDDAM, R. et al. Amphetamine induced release of endogenous dopamine in vitro is not reduced following pretreatment with reserpine. **Eur J Pharmacol**, v. 329, n. 2, p. 121-4, 1985.
- NYAKAS, C. et al. Effect of low amphetamine doses on cardiac responses to emotional stress in aged rats. **Neurobiol Aging**, v. 13, n. 1, p. 123-9, 1991.
- OWEN, M. D. Chemical components in the venoms of *Ropalidia revolutionalis* and *Polistes humilis* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, v. 17, n. 5, p. 519-23, 1979.
- PALMA, M.S. et al. Mass spectrometric structure determination of spider toxins: arginine-containing acylpolyamines from venoms of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. **Nat Toxins**, v. 5, n. 2, p. 47-57, 1997.
- PALMA, M.S. In Handbook of Biologically Active Peptides; Kastin A. J., Ed.; Academic Press: Burlington; Chapter 56, p. 389-96, 2006.
- PANTERA, B. et al. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1623, n. 2-3, p. 72-81, 2003.
- PARADA, C.A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p. 2923-8, 2003.

PARRISH, H.M. Analysis of 460 fatalities from venomous animals in the United States. **Am J Med Sci**, v. 245, p. 129-41, 1963.

PATERSON, I.A. et al. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? **J Neurochem**, v. 55, p. 1827-37, 1990.

PHILIPS, S.R. et al. Evidence for the presence of m-tyramine, p-tyramine, tryptamine, and phenylethylamine in the rat brain and several areas of the human brain. **Biol Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 51-7, 1978

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Quím Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POGORELOV, V.M. et al. Use of a platform in an automated open-field to enhance assessment of anxiety-like behaviors in mice. **J Neurosci Methods**, v. 162, p. 222–8, 2007.

REICHLING, B.D.; LEVINE, J.D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain**, v. 6, p. S103-9, 1999.

REYNOLDS, G.P. et al. The determination and distribution of 2-phenylethylamine in sheep brain. **J Neurochem**, v. 34, n. 5, p. 1123-5, 1980.

RIBEIRO, S.P. et al. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 25, n. 12, p. 2069-78, 2004.

RICHARDS, O.W. The Social Wasps of the Americas Excluding the Vespinae. British Museum (Natural History), 580 p. 1978.

SAIDEMBERG, D.M. **Bioprospecção e Caracterização Químico-Funcional de Compostos Orgânicos de Baixas Massas Moleculares de Venenos de Vespas Sociais: *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista*** (Hymenoptera – Vespidae). 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**, v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004.

SCHMIDT, J.O. et al. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 907-21, 1986.

SOUTHALL, M.D.; VASKO, M.R. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16083-91, 2001.

SPRADBERRY, J.P. Wasps - An Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps. London: Sidgwick & Jackson, p. 1-12, 1973

STEEN, C.J. et al. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. **Int J Dermatol**, v. 44, n. 2, p. 91-4, 2005.

SZABO, A. et al. Phenylethylamine, a possible link to antidepressant effects of exercise? **Br J Sports Med**, v. 35, n. 5, p. 342-3, 2001.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 928-32, 1991.

TOCCO, D.R. et al. Differential analgesic actions of amphetamine enantiomers in the mouse: a drug-drug interaction study. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 278, n. 2, p. 261-72, 1985.

VAN ROSSUM, J.M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evolution of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 143, p. 240-6, 1963.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 6, p. 441-51, 2004.