**EFEITO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FOSFOLIPASES
A₂ (variantes Lys49 e Asp49) ISOLADAS DO VENENO DE
SERPENTES *Bothrops asper*: CARACTERIZAÇÃO DOS
MECANISMOS CENTRAIS E DETERMINANTES
MOLECULARES**

MARUCIA CHACUR

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo, 2004

**EFEITO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FOSFOLIPASES
A₂ (variantes Lys49 e Asp49) ISOLADAS DO VENENO DE
SERPENTES *Bothrops asper*: CARACTERIZAÇÃO DOS
MECANISMOS CENTRAIS E DETERMINANTES
MOLECULARES**

MARUCIA CHACUR

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Dra. Yara Cury

São Paulo, 2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Ao Luí,

nem tenho palavras, acho que nosso convívio já explica tudo!

enfim...por você fazer parte do meu caminho...TE AMO!

*"O amor não consiste em olhar um para o outro, mas sim em olhar juntos para a
mesma direção."*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Aos meus queridos pais, Margarida e Roberto

pelo apoio, carinho e ensinamento dedicado todos estes anos

*"A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma"*

(John Ruskin)

*Aos meus maravilhosos irmãos, Cláudia, Lída e Beto
pela grande amizade e apoio mesmo que a distância!*

"Brincar é condição fundamental para ser sério".

(Arquimedes)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial,

A Yara, por iniciar meu caminho na "Ciência", pela orientação e pela oportunidade de trabalhar em seu Laboratório, um dos melhores que eu já conheci !!

"Conhecimento vem de teu instrutor, sabedoria vem de teu interior"

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia,

"A amizade é como uma gota de mercúrio: é preciso manter a mão aberta para retê-la. Se a fecharmos, ela escapa"

Agradeço a todos que de alguma forma participaram na realização deste trabalho!

A Carla, Júnior, Carina, Tati, Marcos, Cintia, Fê Faria, Ana e Maria Eliza pela amizade e ajuda todos estes anos.

Ao Dr. José Maria Gutiérrez e Dr. Bruno Lomonte, pelas fosfolipases e peptídeos sintéticos, sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz R.G. Britto, por abrir as portas de seu laboratório e pela confiança em mim depositada. Pela ajuda que seus alunos e técnico, Adilson, Andrea, Rhowena, Ivana, Samuel, Gabriela, Nathalia, Mauro, me deram durante todo o tempo em que passei no seu laboratório, enfim, meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. J. A. Bauer, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões e pela amizade. A Margot e ao Edilson, pela ajuda na preparação das lâminas e nos experimentos.

A Dra. Linda R. Watkins, pela co-orientação, pela ajuda e discussão desde a época do Mestrado, enfim, pelo enriquecimento científico!

A Dra. Ida S. Sano-Martins, pela oportunidade em trabalhar em seu laboratório e por permitir a continuação deste trabalho.

A Dra. Catarina F.P. Teixeira, pela ajuda nos trabalhos científicos e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia, Neucelí, Iracema, Angela, Terezinha, Neusa, Alice, Nicolau, Silvana, Luiz, Marcelo, Cristina, Tomy, Diva, Anita pela ajuda e amizade durante toda a realização deste trabalho.

Ao Sérgio, da informática, que estava sempre presente e disposto a ajudar!!

Às bibliotecárias do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas, pela atenção com que me receberam.

Ao Celso, Luciana, Julieta e Selma do Departamento de Pós-graduação do ICB, pelo carinho e paciência com que me ajudaram.

À FAPESP, CAPES, IASP e Pró-Reitoria de Pós-graduação pelo apoio financeiro.

Aos animais, que deram a vida sem direito de escolha...

*"Ninguém pode exercer tirania ou crueldade para com qualquer criatura animal
que habitualmente é utilizada para auxiliar nas tarefas do homem"*

(British anticruelty Act, 1822)

*Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan*

*"Se realmente entendemos o problema, a resposta virá dele,
porque a resposta não está separada do problema".
(Krishnamurti)*

1 - INTRODUÇÃO	1
Fosfolipases miotóxicas.....	5
<i>Atividade nociceptiva de fosfolipases A₂ miotóxicas</i>	9
<i>Dor: Considerações gerais</i>	9
<i>Efeito nociceptivo de fosfolipases A₂ isoladas de venenos do gênero Bothrops</i>	20
2 - OBJETIVOS	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais.....	23
3.2. Fosfolipases A ₂	23
3.3 Planejamento geral.....	24
3.4 Determinação da hiperalgesia mecânica.....	25
3.5 Determinação da alodinia mecânica.....	266
3.6 Avaliação da relação estrutura-atividade das fosfolipases A ₂	27
3.6.1 Estudo de neutralização de sítios catiônicos pela heparina.....	27
3.6.2 Estudo da importância da atividade fosfolipásica através do tratamento com o brometo de <i>p</i> -bromofenacil.....	278
3.6.3 Estudo da contribuição dos resíduos catiônicos/hidrofóbicos presentes na região C-terminal, 115-129.....	28
3.7 Administração intratecal das drogas.....	28
3.8 Tratamentos farmacológicos.....	299
3.9 Ensaios de Imunohistoquímica.....	32
3.10 Drogas e Reagentes:.....	33
3.11 Análise estatística.....	34
4 - RESULTADOS	35
1. Caracterização da hiperalgesia e alodinia mecânicas induzidas pelas fosfolipases A ₂ variantes Lys49 e Asp49.	35
1.1. <i>Efeito da FLA₂-Lys49</i>	35
1.2. <i>Efeito da FLA₂-Asp49</i>	35
2. Determinação dos mecanismos estruturais envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A ₂	39
2.1. <i>Efeito da modificação química da fosfolipase A₂ variante Asp49</i>	39
2.2. <i>Efeito da neutralização por heparina</i>	39
2.3. <i>Avaliação do efeito nociceptivo dos peptídeos sintéticos</i>	39
3. Determinação dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A ₂	43
3.1. <i>Determinação da participação dos canais de cálcio</i>	43
3.2. <i>Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de sódio</i>	43
3.3. <i>Efeito dos inibidores de proteína-quinases dependente de AMPc ou GMPc</i>	43
3.4. <i>Efeito do tratamento com inibidor da enzima fosfolipase C</i>	44
3.5. <i>Efeito do tratamento com inibidor da enzima PKC</i>	44
Tabela I - Quadro resumo do efeito dos diversos tratamentos farmacológicos sobre a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A ₂	52
4. Determinação dos mediadores químicos liberados na medula espinhal envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A ₂	53
4.1. <i>Efeito dos antagonistas de receptores NK₁ ou NK₂ para taquicinininas</i>	53
4.2. <i>Efeito do tratamento com CGRP₈₋₃₇</i>	54
4.3. <i>Efeito do tratamento com capsazepina</i>	54
4.4. <i>Efeito dos antagonistas de receptores ionotrópicos para glutamato</i>	55

4.5. Efeito dos antagonistas de receptores metabotrópicos do grupo I para glutamato - subtipo 1 e subtipo 5 (mGlu1 e mGlu5)	56
4.6. Efeito dos anticorpos anti-citocinas (anti-IL-1 e anti-TNF α)	71
4.7. Efeito dos inibidores da óxido nítrico sintase	71
4.8. Efeito do inibidor da ciclooxigenase	71
4.9. Efeito do antagonista de receptor A2 para adenosina	71
5. Participação das taquicininas e do glutamato liberados na medula espinhal, na manutenção da hiperalgesia acarretada pelas fosfolipases A ₂	78
5.1. Efeito dos antagonistas de receptores para taquicininas	78
5.2. Efeito do antagonista de CGRP	78
5.3. Efeito dos antagonistas de receptores ionotrópicos para glutamato	78
5.4. Efeito dos antagonistas de receptores metabotrópicos do grupo I para glutamato (subtipo 1 e subtipo 5)	79
6. Envolvimento das células da glia da medula espinhal na hiperalgesia e alodinia causadas pelas fosfolipases A ₂	85
6.1. Efeito do tratamento com fluorocitrato	85
6.2. Efeito das fosfolipases A ₂ na expressão de marcadores de células gliais (astrócitos e microglia) na medula espinhal	85
7. Análise histológica dos nervos do coxim plantar de ratos injetados com fosfolipases A ₂ variantes Lys49 e Asp49	90
5-DISCUSSÃO	92
6-CONCLUSÃO	115
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

APÊNDICE 1

Trabalho publicado: Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants.

APÊNDICE 2

Trabalho publicado: Inflammatory effects of snake venom mitotoxic phospholipase A₂.

APÊNDICE 3

Trabalho publicado: Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators.

RESUMO

Chacur M. Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases A₂ (FLA₂ variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper*: caracterização dos mecanismos centrais e determinantes moleculares.

Fosfolipases A₂ miotóxicas (Lys49, enzimaticamente inativa, e Asp49, com atividade) isoladas do veneno de *Bothrops asper*, induzem hipernocicepção. Assim, avaliamos os mecanismos estruturais, moleculares e mediadores centrais envolvidos neste efeito. A injeção intraplantar das FLA₂s acarretou hiperalgesia, enquanto que apenas a FLA₂-Asp49 induziu alodinia. A região C-terminal é a responsável pelo efeito da FLA₂-Lys49, enquanto que a atividade catalítica da FLA₂-Asp49 parece ser responsável pela indução de hipernocicepção. Canais de Ca²⁺ e Na⁺ participam deste efeito. Na medula espinhal, receptores NK₁ e para CGRP, receptores ionotrópicos para glutamato, NO, IL-1, prostanóides e adenosina participam da hiperalgesia induzida pelas FLA₂s. Adicionalmente, receptores metabotrópicos para glutamato e o TNF α , estão envolvidos na hiperalgesia induzida pela FLA₂-Asp49. Receptores NK₁ e NK₂ e para CGRP, receptores para glutamato, TNF α e prostanóides medeiam a alodinia. A ativação de astrócitos e microglia, na medula espinhal, contribui para a gênese do efeito hipernociceptivo.

Palavras-chave: fosfolipase A₂, hiperalgesia, alodinia, canais iônicos, medula espinhal

ABSTRACT

Chacur M. Nociceptive effect induced by phospholipase A₂ (PLA₂-Lys49 and PLA₂-Asp49) isolated from *Bothrops asper* snake venom: Characterization of central mechanisms and molecular determinants.

Phospholipase A₂ (Lys49, catalytically-inactive and Asp49, catalytically active), isolated from *Bothrops asper* snake venom, induce pain. The present studies examined the molecular, structural and central mechanisms involved in hypernociception induced by both PLA₂s. These PLA₂s induced mechanical hyperalgesia, whereas only PLA₂-Lys49 evoked allodynia. The C-terminal region of the PLA₂-Lys49 seems to be responsible for hyperalgesia, whereas the enzymatic activity of PLA₂-Asp49 contributes to such an effect. Calcium and sodium channels are involved in PLA₂s-induced hyperalgesia. In the spinal cord, NK₁ and CGRP receptors, glutamate ionotropic receptors, NO, IL-1, prostanoids and adenosine contribute to hyperalgesia caused by PLA₂s. Additionally, metabotropic glutamate receptors and TNF are involved in hyperalgesia induced by PLA₂-Asp49. NK₁, NK₂ and CGRP receptors, glutamate receptors, TNF and prostanoids mediate allodynia. Activation of spinal astrocytes and microglia contribute to the generation of hyperalgesia and allodynia induced by both toxins.

Key-words: phospholipase A₂, hyperalgesia, allodynia, ions channels, spinal cord

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol
AMPC	3', 5'-adenosina-monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BK	bradicinina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil sulfóxido
FLA ₂	fosfolipase A ₂
FLA ₂ -Lys49	fosfolipase A ₂ variante Lisina 49
FLA ₂ -Asp49	fosfolipase A ₂ variante Aspartato 49
FLC	fosfolipase C
Fig.	figura
GMPc	3', 5'-guanosina -monofosfato cíclico
12-HPETE	12-hidroperoxi-eicosatetraenóico
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
IP ₃	trifosfato de inusitol
i.t.	intratecal
e.v.	endovenosa
ERKs	quinase regulada por sinais extracelulares
GFAP	proteína fibrilar acídica glial
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
L-NIL	L-N ⁶ - (1-iminoetil) lisina
LTB ₄	leucotrieno B ₄
mGlu	receptor metabotrópico para glutamato
7-NI	7-nitroindazol
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
NMDA	N-metil-D-aspartato

NKA	neurocinina A
NKB	neurocinina B
NGF	fator de crescimento neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NK	neurocinina
PBS	tampão fosfato salina
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
RNA	ácido ribonucleico
s.c.	subcutânea
SNC	sistema nervoso central
SP	substância P
TNF	fator de necrose tumoral
TRPV	"transient receptor potential channel-vanilloid"
TTX	tetrodotoxina
v.o.	via oral
VR	receptor vanilóide
VR ₁	receptor vanilóide 1
WDR	neurônios dinâmicos de amplo espectro

1 - INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a ação de venenos obtidos de animais peçonhentos e/ou de toxinas isoladas destes venenos, incluindo fosfolipases A_2 (FLA_2), vem evoluindo consideravelmente em decorrência da utilização destes venenos/toxinas na pesquisa experimental (Vital-Brazil, 1986; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Teixeira *et al.*, 2003; Rajendra *et al.*, 2004).

As FLA_2 ou fosfatidil-acíl-hidrolases (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação acíl-éster, na posição sn-2 de fosfoglicerídeos. Esta reação libera quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (Slotboom *et al.*, 1982; Van Scharrenburg *et al.*, 1982; Dennis, 1994) (Fig. 1)

Figura 1- Hidrólise de fosfoglicerídeo por fosfolipase A_2

De modo geral, a ativação das fosfolipases A_2 depende de sua interação com grandes agregados lipídicos, em interfaces de lipídeo/água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo. A natureza dessa interação ainda não está totalmente esclarecida e tem sido investigada empregando fosfolipases A_2 de venenos animais e pancreáticas. Dessa forma, as enzimas isoladas de venenos de serpentes têm sido úteis como ferramentas para a compreensão do mecanismo e de parâmetros de interação de enzimas solúveis com interfaces de fosfolipídeos.

Diversas fosfolipases A_2 têm sido identificadas, baseado na localização, regulação, sequência de gene e estrutura. Atualmente, as fosfolipases A_2 estão divididas em 12 grupos, com base na estrutura primária e na presença de pontes dissulfídicas intramoleculares.

As FLA₂ dos grupos I, II, III, V, IX, X, XI e, mais recentemente, do grupo XII, utilizam, como unidade catalítica, a histidina na posição 48 e o aspartato na posição 99. Estas FLA₂ requerem quantidades milimolares de cálcio para a catalise e são também denominadas fosfolipases A₂ secretadas (sFLA₂) (Tabela I). Por outro lado, as enzimas dos grupos IV, VI, VII e VIII utilizam a serina 228 como sítio catalítico e não requerem cálcio para a atividade enzimática (Six & Dennis, 2000, para revisão) (Tabela II).

As FLA₂ do *grupo I* compreendem as enzimas encontradas no pâncreas de mamíferos e em venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. Estas fosfolipases A₂ apresentam peso molecular de 13 a 15 KDa e são constituídas por aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos ligados por 7 pontes dissulfídicas. Estas enzimas são secretadas como zimogênio, manifestando atividade enzimática de forma limitada e somente através da clivagem protéica. O *grupo II* é constituído por enzimas com 125 a 130 resíduos de aminoácidos contendo de 6 a 8 pontes dissulfídicas e com peso molecular variando entre 13 a 17 KDa. Estas FLA₂ são encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae (subfamílias *Viperinae* e *Crotalinae*), no fluído sinovial de mamíferos (grupo IIA), no veneno da víbora Gaboon (grupo IIB), no testículo de camundongos (grupo IIC), no baço e pâncreas de camundongos/humanos (grupo IID), no útero, coração e cérebro humano e/ou de camundongos (grupo IIE) e no embrião de camundongos (grupo IIF) (Murakami *et al.*, 1995). O *grupo III*, representado pelas FLA₂ de venenos de abelhas e do lagarto *Heloderma* possuem peso molecular entre 16-18 KDa e são também encontradas em exsudatos inflamatórios, grânulos de plaquetas e mastócitos (Clark *et al.*, 1991). O *grupo V*, com peso molecular de 14 KDa, é constituído por sFLA₂s expressas em tecidos de mamíferos, principalmente em resposta a estímulos inflamatórios (Chen *et al.*, 1994; Chen & Dennis, 1998; Cho, 2000). O *grupo IX*, também com peso molecular de 14 Kda, compreende as sFLA₂s isoladas de caracol marinho (*Conodipina m*). O *grupo X* é constituído por FLA₂ isoladas do baço, timo, leucócitos e células endoteliais de alvéolos pulmonares. O *grupo XI* compreende enzimas isoladas de plantas, enquanto que ao *grupo XII* pertencem as enzimas de 20 KDa isoladas de células T-helper (Six & Dennis, 2000; Ho *et al.*, 2001).

As fosfolipases do *grupo IV* compreendem as FLA₂s citosólicas (cFLA₂) (Dennis, 1994). Estas enzimas foram isoladas do fígado de ratos e plaquetas de humanos (grupo IVA), no cérebro, coração e fígado humanos (grupo IVB) e do músculo esquelético e cardíaco de humanos (grupo IVC). Estas FLA₂s apresentam de 61 a 114 KDa e expressam sua atividade catalítica em presença de concentrações mínimas de íons cálcio. Acredita-se

que essas cFLA₂s são ativadas por estímulos ligados à transdução de sinal e hidrolisam preferencialmente, os precursores do ácido araquidônico (Clark *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1991). O grupo VI, constituído por fosfolipases A₂ independentes de cálcio (iFLA₂), são expressas em diferentes tecidos humanos, como por exemplo, músculos esquelético e cardíaco, testículos e macrófago. Possuem peso molecular entre 84- 90 kDa (Ma *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 1999). Os grupos VII e VIII são constituídos por enzimas que possuem atividade PAF acetilhidrolase. Estas enzimas degradam PAF e lipídios oxidados. As do grupo VII apresentam de 40 a 45 KDa e estão presentes no plasma e intracelularmente, no fígado e rim de humano ou bovino, enquanto que as do grupo VIII possuem cerca de 26 KDa e são expressas no sistema neuronal (Six & Dennis, 2000, para revisão).

A caracterização de proteínas de membrana e solúveis, que se ligam às FLA₂ secretadas (sFLA₂) sugere que, além da atividade enzimática, estas enzimas possam funcionar também como ligantes de alta afinidade. Dois tipos de receptores para FLA₂s foram isolados: (a) receptor do tipo N (neuronal), com afinidade elevada pelas fosfolipases A₂ de venenos neurotóxicos. Tem sido sugerido que este receptor medeia os efeitos neurotóxicos destes venenos e (b) receptor do tipo M (músculo), o qual apresenta estrutura semelhante ao receptor manose de macrófagos. Este receptor é expresso por células do músculo esquelético, pulmões, rins e fígado (Valentin & Lambeau, 2000; Fuentes *et al.*, 2002, para revisão).

Tabela I - Grupos de fosfolipases A₂ que utilizam histidina como unidade catalítica.

Grupo	Localização	PM (KDa)	aminoácidos excitatórios	Pontes dissulfídicas
I	pâncreas de mamíferos, venenos das famílias Elapidae e Hydrophiidae	13-15	120	7
II A	veneno da família Viperidae, fluído sinovial de mamíferos	13-15	125-130	7
B	veneno de víbora Gaboon	13-15	125-130	6
C	testículo de camundongos	15	125-130	8
D	baço e pâncreas de cg/humanos	14-15	125-130	7
E	útero, coração e cérebro humano	14-15	125-130	7
F	embrião de camundongos	16-17	125-130	7
III	venenos de abelhas e lagarto	16-18	—	—
V	tecidos de mamíferos	14	—	6
IX	caracol marinho (conidipina m.)	14	—	6
X	isolados do baço, timo, leucócitos e células endoteliais de alvéolos pulmonares	14	—	8
XI	isoladas de plantas	12-13	—	6
XII	células T-helper	20	—	—

— Não determinado

Tabela II - Grupos de fosfolipases A₂ que utilizam serina como unidade catalítica

Grupo	Localização	PM (KDa)
IV A	fígado de ratos e plaquetas de humanos	85
B	cérebro, coração e fígado de humanos	114
C	músculo esquelético e cardíaco de humanos	61
VI	músculo esquelético, cardíaco, testículos e macrófagos	84-90
VII	plasma e no fígado e rim de humano ou bovino	40-45
VIII	expressas no sistema neuronal	26

Fosfolipases A₂ miotóxicas

As fosfolipases A₂ são particularmente abundantes nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Moura Da Silva *et al.*, 1991) e compreendem um grupo importante de enzimas presentes na maioria dos venenos e secreções orais de serpentes (Tu, 1977; Harris, 1991). Estas fosfolipases A₂ são enzimas envolvidas com uma ampla variedade de processos fisiológicos incluindo digestão fosfolipídica e defesa do hospedeiro, além de causarem vários efeitos fisiopatológicos, caracterizados por efeitos neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, hemorrágico, inflamatório e mionecrótico (Rosenberg, 1986; Harris, 1991).

Algumas das FLA₂ presentes em venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, apresentam importante atividade miotóxica (Queiroz & Petta, 1984; Queiroz *et al.*, 1985; Gutierrez & Lomonte, 1995). Dados da literatura têm sugerido que este efeito miotóxico é causado tanto por ação direta das fosfolipases A₂, afetando a integridade da membrana plasmática das células musculares e/ou indireta, pela isquemia ocasionada por alterações de vasos da microcirculação e artérias intramusculares (Selistre *et al.*, 1990; Butron *et al.*, 1993). Não estão determinados, ainda, se os eventos que acarretam a morte celular são decorrentes da lise da membrana plasmática ou da ação intracelular da toxina, após sua internalização (Gutierrez & Lomonte, 1995; Ownby *et al.*, 1999).

A atividade miotóxica destas fosfolipases A₂ não depende exclusivamente de sua atividade catalítica, visto que apesar da homologia seqüencial, algumas FLA₂s destituídas de atividade enzimática apresentam atividade miotóxica. As FLA₂s dos grupos I e II contém aspartato na posição 49 (Asp 49) e apresentam atividade catalítica elevada, como a miotoxina III de *Bothrops atrox* e *Bothrops asper*, a miotoxina II de *Bothrops godmani*, as frações SIII e SIV de *Bothrops insularis* e as toxinas PLA-B e PLA-N de *Trimeresurus flavoviridis*. No entanto, outras FLA₂ homólogas, com baixa ou nenhuma atividade catalítica, mantém potente atividade miotóxica. Como exemplo, citam-se a miotoxina II do veneno de *Bothrops asper*, a Bothropstoxina-I de *Bothrops jararacussu*, a Piratoxina I de *Bothrops pirajái*, a Moojetoxina I da *Bothrops moojeni*, a BnSP-7 da *Bothrops neuwiedi pauloensis* e as BPI e BPII de *Trimeresurus flavoviridis*. Estas FLA₂ têm como característica a presença de uma lisina na posição 49 (Lys 49) (Gutiérrez *et al.*, 1985; Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Canduri *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2000a; Soares *et al.*, 2000b). Estudos de cristalografia demonstraram que o grupo ε-amino do resíduo Lys49 está localizado na posição ocupada pelo íon cálcio, cofator essencial para a

estabilização do intermediário tetraédrico durante a reação de catálise pelas FLA₂-Asp49 (Holland *et al.*, 1990; Arni & Ward, 1996; Lee *et al.*, 2001). Estudos iniciais sugeriam que estas FLA₂s-Lys49 apresentariam pequena atividade catalítica (Maraganore *et al.*, 1984; Maraganore & Henrikson, 1986), entretanto, estudos subsequentes demonstraram ausência de hidrólise de fosfolípídeos por estas FLA₂s (Condrea *et al.*, 1981; Cintra *et al.*, 1993). Ainda, estudos de mutagênese sítio-dirigida demonstraram que, em FLA₂ de mamíferos, a substituição do aminoácido Asp, na posição 49, pela lisina é efetiva na eliminação da atividade catalítica desta enzima (Van Den Bergh *et al.*, 1988).

A despeito da redução ou ausência de atividade enzimática, as FLA₂s-Lys49 homólogas mantém a habilidade de lesar membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo pouco conhecido e independente de cálcio (Rufini *et al.*, 1992; Gutiérrez & Lomonte, 1995). Este fato é intrigante, uma vez que essas FLA₂s conservam os resíduos essenciais do sítio catalítico (His-48, Asp-99 e uma molécula de água), sugerindo que uma região da molécula, distinta do sítio catalítico, seja importante para a atividade fisiopatológica destas FLA₂s-Lys49.

Assim, estudos baseados na capacidade do poliânion heparina em neutralizar os efeitos tóxicos das FLA₂s-Lys49 (Lomonte *et al.*, 1994b; Landucci *et al.*, 1998; 2000), sugerem a importância de regiões moleculares ricas em aminoácidos carregados positivamente, para o desencadeamento das ações destas fosfolipases. Peptídeos sintéticos abrangendo a região C-terminal (115-129) de FLA₂-Lys49 isoladas do veneno de serpentes *B. asper* e *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, são capazes de induzir, *in vitro*, efeitos citolítico e bactericida e, *in vivo*, ações miotóxica e edematogênica semelhantes às observadas para a FLA₂ nativa. Cabe ressaltar que a região C-terminal destas enzimas é rica em grupamentos catiônicos e hidrofóbicos (Lomonte *et al.*, 1994b; Paramo *et al.*, 1998; Nunez *et al.*, 2001). Ainda, a tripla substituição Tyr→Trp (Y117W/Y119W/Y120W) do peptídeo sintético correspondente à região 115-129 da FLA₂ Lys49 de *B. asper*, o que acarreta aumento do caráter anfifílico da molécula, causa incremento das propriedades lesivas do peptídeo (Lomonte *et al.*, 1994b). A administração de anticorpos anti-região 115-129 da Lys49-FLA₂ de *B. asper* inibe os efeitos citolítico e miotóxico desta miotoxina, reforçando a importância desta região C-terminal para os efeitos biológicos da FLA₂-Lys49 (Calderon & Lomonte, 1998; 1999).

Mais recentemente, por meio da técnica de mutagênese sítio dirigida, foi possível caracterizar nas moléculas da FLA₂-Lys49, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela gênese das atividades desta toxina (Ward *et al.*, 2001; Chioato *et al.*, 2002), empregando

métodos de biologia molecular, produziram uma bothropstoxina-I (BTX-I) recombinante, estruturalmente semelhante à BTX-I nativa, isolada do veneno de *B. jararacussu*, e também BTX-I recombinantes mutantes. Por meio destas mutações foi possível investigar a importância dos aminoácidos presentes na região correspondente ao sítio ativo e dos resíduos Lys115, Lys116 e Arg118, presentes na região C-terminal, para a atividade biológica desta FLA₂. Assim, foi observada importante participação dos resíduos Lys115 e Lys116 no mecanismo de lesão de membranas causadas por esta FLA₂, mas não na miotoxicidade, enquanto que o resíduo Arg 118 está fortemente envolvido com a atividade miotóxica (Zambelli, 2003). Dados mais recentes indicam que além dos resíduos citados acima, os resíduos Y119, F125 e D131, também pertencentes à alça C-terminal, estão envolvidos na atividade miotóxica da molécula. Estes dados indicam que os resíduos envolvidos no efeito miotóxico são distintos daqueles que determinam a lesão de membrana (Chioato, 2004).

Chioato *et al.* (2002) mostraram, utilizando ainda a técnica de mutagênese, que a perda da atividade catalítica da FLA₂-Lys49 não é resultado apenas da substituição de Asp por Lys na posição 49, sendo dependente de outros fatores estruturais ainda não determinados.

Fosfolipases A₂ e inflamação

As FLA₂s são enzimas importantes para a atividade celular, pois hidrolizam fosfolipídeos de membrana e constituem a via predominante para a produção de ácido araquidônico, precursor de segundos mensageiros que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Ainda, por hidrolizarem 1-o, alquil, 2-araquidonil-glicerofosfocolina, algumas enzimas geram o liso-PAF, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF, além de mediadores de fenômenos fisiológicos, estão envolvidos em vários processos inflamatórios (Murakami *et al.*, 1990; Oka & Arita, 1991; Granger & Kubes, 1994).

A participação das fosfolipases A₂ do grupo II, em processos em que há o desenvolvimento de reação inflamatória, como artrite reumatóide e asma, está bem estabelecida. Vários dados sobre a atividade inflamatória destas enzimas estão baseados em estudos experimentais utilizando FLA₂s purificadas de pâncreas e de venenos ofídicos (Pruzanski & Vadas, 1989; Nevalainen *et al.*, 2000). As fosfolipases induzem edema em animais (Cirino *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1991; Chaves *et al.*, 1998; Nunez *et al.*, 2001),

acarretam desgranulação de mastócitos *in vivo* (Damerau *et al.*, 1975) e induzem infiltrado leucocitário na cavidade pleural ou bolsa de ar em ratos e em pele de coelho (Bomalaski *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003b).

A contribuição da atividade catalítica destas FLA₂ para a gênese do efeito inflamatório tem sido discutida. Vários trabalhos têm evidenciado que a presença da atividade enzimática contribui para a formação de edema (Vishwanath *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1992; Lloret & Moreno, 1993; Nunez *et al.*, 2001). Por outro lado, Vishwanath *et al.* (1987), utilizando 3 diferentes FLA₂ purificadas do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (Habu), mostraram que quando a atividade enzimática destas FLA₂ é inibida por agentes químicos, o edema é inibido apenas para uma das fosfolipases. Desta forma, estes autores sugeriram a existência de dois sítios distintos na molécula das FLA₂s que estariam envolvidas com a atividade destas toxinas - um sítio responsável pela atividade catalítica e o outro pela atividade farmacológica. Com o intuito de esclarecer a relação entre a atividade farmacológica e a atividade enzimática das diferentes FLA₂s isoladas de venenos de serpentes Kini & Evans (1989) criaram um modelo para explicar a ação destas FLA₂s (Kini, 2003). De acordo com este modelo, as fosfolipases A₂ induziriam vários efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes da atividade enzimática. Assim, a ação das FLA₂s poderia ser determinada pela presença de um sítio específico (proteína/glicoproteína) presente na célula alvo e por uma região específica complementar presente na molécula da FLA₂ - o sítio farmacológico - o qual apresentaria afinidade pela molécula alvo. A ligação física das FLA₂s com a molécula alvo e, em alguns casos, associada a atividade hidrolítica sobre fosfolípidos de membrana, levaria aos efeitos farmacológicos da toxina.

Adicionalmente às ações pró-inflamatórias destas enzimas, foi verificado que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF α acarretam, em vários tecidos, a transcrição gênica de FLA₂ e o aumento subsequente da secreção destas enzimas (Crowl *et al.*, 1991; Nakazato *et al.*, 1991; Schalkwijk *et al.*, 1991). Estes achados reforçam a hipótese do envolvimento das fosfolipases A₂ na inflamação e colocam estas enzimas como importantes ferramentas de pesquisa para estudos farmacológicos da resposta inflamatória. Trabalhos experimentais realizados principalmente nas décadas de 80 e 90, evidenciaram a participação de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, na resposta inflamatória local induzida por venenos do gênero *Bothrops* (Trebien & Calixto, 1989; Chaves *et al.*, 1995; Burigo *et al.*, 1996; Farsky *et al.*, 1997). Estes dados apontam para a relevância de enzimas com atividade de fosfolipase A₂ presentes nestes venenos, ou

liberadas pela atuação dos mesmos, nos mecanismos envolvidos com a fisiopatologia das ações locais induzidas pelos venenos destas serpentes (Rothschild & Rothschild, 1979; Gutiérrez *et al.*, 1984; Moura Da Silva *et al.*, 1991). Corroborando tal hipótese, foi demonstrado que fosfolipases A_2 obtidas do veneno de *B. asper* e *B. jararacussu* induzem a formação de edema. Este fenômeno é multimediado, com a participação de aminas e de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico. Em relação às FLA₂s obtidas do veneno de *Bothrops asper*, tanto a FLA₂-Asp49 (miotoxina III), com atividade catalítica, quanto a FLA₂-Lys49 (miotoxina II), desprovida de atividade catalítica, são capazes de induzir edema em camundongos, com mediação química semelhante (Gutierrez & Lomonte, 1995; Chaves *et al.*, 1998). Algumas FLA₂s isoladas de venenos de serpentes, incluindo as do gênero *Bothrops*, acarretam, ainda, a desgranulação de mastócitos, com consequente liberação de mediadores inflamatórios envolvidos no aumento da permeabilidade vascular, como a histamina e serotonina (Landucci *et al.*, 1998; 2000). Além do componente vascular, as FLA₂s favorecem a formação do componente celular da inflamação. Lomonte *et al.* (1993) demonstraram que a injeção de FLA₂-Lys49 isolada do veneno de *B. asper*, na pata de ratos, acarreta intenso infiltrado neutrofílico. Em modelo de pleurisia em ratos, as bothropstoxina I e II e a piratoxina I induziram o recrutamento de leucócitos, por um mecanismo independente da atividade enzimática (Castro *et al.*, 2000). Além disso, foi evidenciado também que FLA₂s de venenos de diferentes serpentes são capazes de acarretar quimiotaxia de neutrófilos humanos. Esta ação das toxinas em neutrófilos é resultado da liberação de agentes quimiotáticos como o leucotrieno B₄ e o fator de ativação plaquetária (Gambero *et al.*, 2002, 2004). Por outro lado, Teixeira e colaboradores (2003a) demonstraram que neutrófilos não estão envolvidos nas alterações patológicas locais induzidas pela miotoxina I extraída do veneno de *B. asper*, mas desempenham importante papel no processo de regeneração de músculo esquelético de animais tratados com esta toxina. Esta regeneração é atribuída ao processo de fagocitose do material necrosado e ao recrutamento de outras células inflamatórias pelos neutrófilos.

Atividade nociceptiva de fosfolipases A_2 miotóxicas

Dor: Considerações gerais

A *dor*, segundo 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 depende da memória, aspectos culturais e psíquicos.

Dor transitória é usualmente observada quando neurônios sensitivos são ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são caracterizadas como fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, denominadas fibras C e Aδ. As fibras C são fibras não mielinizadas, com baixa velocidade de condução (< 1 m/s) e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras Aδ são fibras mielinizadas com velocidade de condução de 5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos (Julius & Basbaum, 2001, para revisão). Cabe ressaltar a existência de um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores “silenciosos” ou “adormecidos” (“silent” ou “sleeping nociceptors”). Estes nociceptores, descritos em 1988 por Schaible e Schmidt, não respondem a estímulos mecânicos ou térmicos imediatos, mas se tornam ativados durante algumas condições patológicas, como em processos inflamatórios (Schaible & Schmidt, 1988; Schemelz *et al.*, 1994). Estas fibras foram identificadas em tecido cutâneo e visceral e detectados em estudos eletrofisiológicos com registros feitos em nervos e articulações de joelho (Willis & Westlund, 1997). Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem, na periferia, terminações não mielinizadas (nociceptores) responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos. As fibras nervosas nociceptivas estão envolvidas na transdução do estímulo nocivo periférico, na condução do potencial de ação para a medula espinhal e na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios centrais. Mecanismos distintos de transdução, receptores, canais iônicos e transmissores sensoriais medeiam estes processos (Grigg *et al.*, 1986; Woolf & Costigan, 1999).

Durante lesão tecidual ou inflamação, ocorre sensibilização dos nociceptores e a dor é freqüentemente, mais persistente (Levine *et al.*, 1993; Dray, 1994; Ferreira & Lorenzetti, 1995). Durante o processo inflamatório, a dor pode ocorrer espontaneamente e/ou ainda, fenômenos de sensibilização, traduzidos pelo aumento da resposta a estímulos nociceptivos (hiperalgesia), bem como pela presença de dor em resposta a estímulos não nocivos (alodinia), podem ser observados (Besson, 1999; Kidd & Urban, 2001, para revisão). A sensibilização dos nociceptores, pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório, bem como o aumento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (sensibilização central), contribuem para estes estágios hipernociceptivos (Millan, 1999; Urban & Gebhart, 1999).

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 (Ferreira, 1994; England *et al.*, 1996). Alguns mediadores hiperalgésicos elevam diretamente as concentrações intracelulares de AMPc mas outros, cujos receptores não estão acoplados a adenilato ciclase, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação de proteína quinase C (PKC) (Bevan, 1999, para revisão). A ativação da PKC leva a fosforilação e ao aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca^{++} e Na^+ (Lorenzetti & Ferreira, 1996; Millan, 1999; Julius & Basbaum, 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação da via das MAPKs é um importante mecanismo intracelular na geração de hipernocicepção. Esta via pode ser ativada independentemente da ativação da PKC ou PKA (Dirig & Yaksh, 1999; Obata & Noguchi, 2004, para revisão). A cascata da MAPK é ativada pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina (Ji *et al.*, 1999), sendo subdividida em 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK. Dai e colaboradores (2002) demonstraram a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hiperalgésicos.

Dor evocada por estímulo táctil (alodinia) é um fenômeno importante em síndromes dolorosas decorrentes de processos inflamatórios periféricos, neuropatias ou processos cirúrgicos. A alodinia mecânica pode ser mediada pela ativação de neurônios de segunda ordem na medula espinhal, em resposta à atividade de fibras $\text{A}\beta$ (mecanorreceptores), ou resultar do fenômeno de sensibilização de nociceptores (Willis, 1993; Wasner *et al.*, 1999, para revisão), incluindo fibras sensitivas primárias do tipo $\text{A}\delta$ (Field *et al.*, 1999). 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 mecanorreceptores (fibras $\text{A}\beta$), além dos nociceptores (Willis, 1993, revisão). 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 mecanorreceptores (fibras $\text{A}\beta$), em decorrência da acentuada ativação dos nociceptores, ou alterações das vias descendentes de controle da dor (Willis, 1993,

revisão) têm sido propostos como mecanismos de indução de alodinia. Adicionalmente, tem sido sugerido que em condições de dor crônica, a atividade contínua das fibras C resulta em sensibilização, na medula espinhal, de um interneurônio, normalmente inibitório, relacionado às fibras C e A β . Nestas condições, a ativação deste interneurônio, pela estimulação normal das fibras A β , acarreta, em vez de inibição, aumento acentuado da atividade da fibra C (Cervero & Laird, 1996). Ainda, foi evidenciado que após injúria periférica, ocorre reorganização anatômica das terminações nervosas aferentes A β , 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). Woolf & Salter (2000) sugeriram também que a injúria nervosa periférica pode acarretar alterações fenotípicas das fibras A β , as quais passam a produzir substâncias nociceptivas.

Os canais iônicos, presentes nas fibras sensitivas, estão envolvidos na transmissão da informação nociceptiva. Durante inflamação, ocorre aumento significativo na expressão de canais iônicos, incrementando a excitabilidade da membrana dos neurônios periféricos (Devor, 1994; Matzner & Devor, 1994; Waxman *et al.*, 1994). Os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos são os canais de Na⁺ e de Ca⁺⁺ dependentes de voltagem (Nowycky, 1992).

Os canais de sódio dependentes de voltagem medeiam a condução do potencial de ação da periferia para a medula espinhal. Em particular, os canais de sódio resistentes à tetrodotoxina, particularmente o canal do tipo NaV1.8, presentes especificamente em neurônios aferentes nociceptivos, contribuem para a sensibilização periférica induzida por mediadores inflamatórios (Coggeshall *et al.*, 2004) e para a gênese da dor crônica (Gold, 1999; Porreca *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2002; Hains *et al.*, 2003). Estudos recentes têm demonstrado que além dos canais de sódio TTXr, os canais de sódio sensíveis à TTX, mais especificamente o canal do tipo 1.3, expressos no ganglio da raiz dorsal estão associados com a gênese da dor neuropática (Hains *et al.*, 2003). Várias drogas anticonvulsivantes (carbamazepina, fenitoína), anestésicos locais (lidocaína, tocinida) e drogas antiarrítmicas (mexiletina) induzem analgesia, quando utilizadas no tratamento de dor crônica associada à neuropatia e distrofia simpática (Tanelian & Brose, 1991; Marchettini *et al.*, 1992; Chevrier *et al.*, 2004). A eficácia destas drogas pode ser relacionada ao bloqueio de canais de sódio.

Em relação aos canais de cálcio dependente de voltagem, mais especificamente os canais do tipo CaV1 (tipo L), CaV 2.1 (tipo P/Q) e CaV 2.2 (tipo N) estão envolvidos na transmissão nociceptiva, liberação de neurotransmissores e sensibilização central (Vanegas & Schaible, 2000; Saegusa *et al.*, 2002). Além da abertura de canais de cálcio, tem sido proposto que oscilações na concentração do cálcio citosólico, ao longo da fibra nervosa, propicia um mecanismo celular de integração envolvido na indução e manutenção de estágios hipernociceptivos (Parada *et al.*, 2003a).

As alterações no processo de transdução, pelos nociceptores, observadas durante injúria tecidual e inflamação, resultam da ativação destes nociceptores por mediadores liberados durante o processo inflamatório (Treede & Cole, 1993; Reeh, 1994; Dray, 1995; Ferreira & Lorenzetti, 1995). A maioria destes mediadores age através da ativação de receptores acoplados à proteína G, fosforilando canais iônicos, via ativação de PKA e PKC (Bevan, 1999). Dentre os mediadores inflamatórios envolvidos na nocicepção, podemos citar os íons K^+ e H^+ , o ATP, NO, adenosina, serotonina, histamina, bradicinina, citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e $TNF\alpha$), neurotrofinas, fator de crescimento neural, neuropeptídeos (SP, NKA, CGRP), eicosanóides e mediadores simpáticos, os quais podem agir conjuntamente, de modo sinérgico. Alguns destes mediadores atuam ativando diretamente o nociceptor (histamina e SP), induzindo dor espontânea, ou sensibilizando nociceptores e induzindo hiperalgesia (serotonina, citocinas e PGE_2). Este fenômeno de sensibilização pode ocorrer por uma ação direta do mediador e/ou pela liberação de outros agentes nociceptivos (Dray, 1997; Kidd & Urban, 2001; Riedel & Neeck, 2001). Alguns mediadores inflamatórios, como a bradicinina, podem ativar direta e/ou indiretamente os nociceptores, acarretando dor e/ou ainda sensibilização periférica. Esta sensibilização periférica envolve a liberação de outros mediadores, como aminas biogênicas, neuropeptídeos, ou a geração de ácido araquidônico e prostanóides (Gammon *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1992; Dray & Perkins, 1993).

Cabe ressaltar que além dos mediadores inflamatórios, vários receptores acoplados a canais iônicos estão envolvidos na transdução do estímulo nocivo (Kidd & Urban, 2001). Dentre eles, podemos citar o receptor vanilóide tipo 1 (VR-1), sensível à capsaicina. O receptor VR-1 é um canal de cátion não seletivo, integrando a subfamília dos receptores TRPV. Estes receptores estão distribuídos nos neurônios aferentes de pequeno diâmetro, desde os terminais periféricos até os axônios do terminal central e corpo celular (Caterina *et al.*, 1999; Kidd & Urban, 2001). O VR-1 é ativado por compostos vanilóides como a capsaicina, prótons e calor (Caterina *et al.*, 1997). A atividade dos receptores VR-1 é

regulada diretamente e indiretamente por fatores endógenos, como a PKC, que sensibilizam os receptores VR-1 à capsaicina, prótons e calor (Premkumar & Ahern, 2000). Este receptor pode ser sensibilizado por bradicinina, ATP e NGF, que estimulam a formação de PKC (De Petrocellis *et al.*, 2001; Hoogerwerf *et al.*, 2001). Os VRs são importantes mediadores de respostas hipernociceptivas e essenciais na hiperalgesia térmica inflamatória (Szallasi & Blumberg, 1999; Davis *et al.*, 2000).

Como mencionado anteriormente, a informação nociceptiva é captada por estruturas do sistema nervoso periférico e transmitida ao SNC, onde é decodificada e interpretada. No SNC, o corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação desta transmissão sináptica. Além disso, mecanismos endógenos, representados por sistemas modulatórios descendentes inibem a transmissão da informação nociceptiva para as estruturas supra-espinhais (Woolf & Costigan, 1999; Kidd & Urban, 2001; Riedel & Neeck, 2001).

Vários neurotransmissores estão envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. As taquicininas (SP, NKA e NKB), liberadas na medula espinhal, são importantes mediadores da nocicepção. A substância P é amplamente distribuída no sistema nervoso central e periférico e age preferencialmente em receptores NK₁ (Urban & Gebhart, 1999; Zheng & Chen, 2001). A SP estimula a síntese de IP₃ e ativa canais de Ca⁺⁺ voltagem dependente. Em gânglios sensitivos, a SP é sintetizada por neurônios de pequeno diâmetro e quando liberada nas sinapses da medula espinhal comporta-se como neuromodulador, contribuindo significativamente para a indução de sensibilização central (Lawson *et al.*, 1993; Traub, 1996). A NKA, agindo em receptores NK₂, desempenha papel muito semelhante ao da SP na transmissão da dor. Este neuropeptídeo contribui para a inflamação neurogênica, para a hiperalgesia e para a mudança de excitabilidade que ocorre no corno dorsal da medula espinhal, durante resposta inflamatória (Salter & Henry, 1991). O papel da NKB, agindo em receptores NK₃, ainda é controverso e pouco conhecido. Estudos realizados por Sakurada e colaboradores (1992) demonstraram que a injeção intradérmica de antagonista de receptor NK₃ acarreta antinocicepção no teste da formalina e capsaicina. Por outro lado, Laneuville e colaboradores (1988) evidenciou que a administração de NKB na medula espinhal, exerce efeito antinociceptivo em modelos de dor fásica. Além da atuação em sinapses medulares, as neurocininas podem ser liberadas nas terminações periféricas durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Levine *et al.*, 1993).

O CGRP se liga a receptores CGRP1 e CGRP2 e a sua importância na medula espinhal, como mediador da transmissão nociceptiva, ainda não está totalmente esclarecida. Estudos experimentais têm demonstrado que a administração intratecal de CGRP causa hiperalgesia, enquanto que a administração, por esta mesma via, de um antisoro anti-CGRP diminui a hiperalgesia térmica e mecânica durante processo inflamatório periférico (Kuraishi *et al.*, 1988). O efeito hiperalgésico do CGRP parece ser indireto, mediado em parte, pela ativação de receptores para CGRP localizados nos neurônios primários aferentes, com consequente facilitação da liberação de SP e aminoácidos excitatórios (Oku *et al.*, 1987). Por outro lado, a ativação de receptores CGRP localizados nos neurônios espinhais, acarreta aumento da abertura dos canais de cálcio dependente de voltagem, acarretando ativação de fibra pós-sináptica (Seybold *et al.*, 2003).

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 (Seybold *et al.*, 2003).

Além das taquicininas e do CGRP, aminoácidos excitatórios liberados na medula espinhal são importantes mediadores da informação nociceptiva (Picard *et al.*, 1993).

O principal neurotransmissor excitatório é o glutamato. A ação deste aminoácido é mediada por receptores ionotrópicos (AMPA e NMDA) e receptores metabotrópicos. Os receptores AMPA (α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol) e NMDA (N-metil-D-aspartato) estão diretamente acoplados a canais de cátions, enquanto que os receptores metabotrópicos estão acoplados a proteína G e agem liberando IP₃ e DAG, como segundos mensageiros. Os receptores AMPA induzem aumento do influxo de Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺ para o interior do neurônio, despolarizando rapidamente a membrana celular (King *et al.*, 1988; Yoshimura & Jessell, 1990). Por outro lado, os receptores NMDA são responsáveis pela transmissão sináptica lenta. O receptor NMDA é normalmente bloqueado pelo íon Mg⁺⁺ e a sua ativação depende do deslocamento do Mg⁺⁺, possibilitando a entrada de íons Ca⁺⁺ (Kidd & Urban, 2001). A ativação do receptor NMDA resulta no aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, contribuindo para a geração do fenômeno de "wind up", caracterizado como o aumento progressivo da excitabilidade neuronal, durante a ativação do estímulo nocivo, e para geração da sensibilização central, caracterizada por alterações mais prolongadas da atividade neuronal pós-sináptica (Woolf, 1983; Woolf & Wall, 1986). O "wind up" resulta da ativação dos receptores NMDA, pela remoção dos íons Mg²⁺ deste receptor (Woolf &

Costigan, 1999, revisão). A sensibilização central resulta da liberação pré-sináptica do glutamato, de neuropeptídeos e de fatores neurotróficos. Estas substâncias, agindo em receptores específicos, interagem sinergicamente, gerando mudanças na transdução de sinais nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal (Coderre & Melzack, 1992; Ren & Dubner, 1993; Thompson *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998; Woolf & Costigan, 1999).

Os receptores metabotrópicos são divididos em três grupos de acordo com a homologia de sequência, mecanismos de transdução e farmacologia (Conn & Pin, 1997). Os receptores do grupo I (mGlu1 e mGlu5) são receptores ligados à hidrólise de fosfoinosítídeos e mobilização de cálcio intracelular, via ativação da enzima fosfolipase C (Conn & Pin, 1997). Os receptores do grupo II (mGlu2 e mGlu3) e do grupo III (mGlu4, mGlu6-8) são receptores negativamente ligados a adenilil ciclase e sua ativação resulta na diminuição na produção do AMP cíclico (Pin & Duvoisin, 1995; Conn & Pin, 1997). Assim, a ativação de receptores do grupo I pode resultar no aumento da excitabilidade neuronal, enquanto que a ativação de receptores do grupo II e III pode acarretar diminuição da excitabilidade neuronal. Várias evidências mostram que os receptores do grupo I estão envolvidos na nocicepção na medula espinhal (Fisher & Coderre, 1998; Young *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) e tálamo (Salt & Binns, 2000) e, de acordo com dados mais recentes, na nocicepção periférica (Bhave, 2001; Walker, 2001).

Além de mediador central da transmissão do impulso nociceptivo, tem sido evidenciada também ação nociceptiva periférica para o glutamato, por atuação em receptores presentes nas terminações periféricas de nociceptores das fibras aferentes primárias (Ault & Hildebrand, 1993; Sato *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Lawand *et al.*, 1997; Bhave *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2001b).

Outro importante mediador do processo nociceptivo, na medula espinhal, é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela conversão da L-arginina em L-citrulina, reação cuja catálise é realizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Essa reação tem como co-substratos a L-arginina, o oxigênio (O₂) e o fosfato de nicotinamida dinucleotídeo de adenosina reduzida (NADPH-d), e como co-fatores, o mononucleotídeo de flavina, o dinucleotídeo de flavina e de adenosina, o agrupamento heme e a tetrahidrobiopterina (Alderton *et al.*, 2001). Diversas isoformas da NOS foram identificadas, variando conforme a localização, estrutura, regulação e função (Bredt *et al.*, 1992). A NOS é classificada de acordo com sua expressão celular, podendo ser constitutiva (cNOS) ou induzida (iNOS). A cNOS divide-se em NOS do tipo I (NOSI), também denominada de

neuronal (nNOS), localizada em neurônios, e do tipo III (NOSIII) ou endotelial (eNOS), localizada no endotélio vascular. Estas isoformas são expressas e ativadas pelo cálcio. Por outro lado, a iNOS, conhecida como tipo II (NOSII), não é dependente de cálcio e está envolvida com a produção do NO durante a estimulação de macrófagos e células da glia (Contestabile, 2000, para revisão).

Vários trabalhos sugerem que o NO é um componente essencial na fisiologia das células e sua produção exarcebada pode ser a origem de várias condições fisiopatológicas (Dugas & Kolb, 1995; Moncada & Higgs, 1995; Coleman, 2001, para revisão). Vários estudos têm mostrado que o NO interfere com o desenvolvimento da resposta inflamatória e com a nocicepção, podendo ter efeitos pro-ou antiinflamatório e nociceptivo ou antinociceptivo (Duarte *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1992). Os efeitos na nocicepção dependem da concentração do NO, do local de atuação e do modelo utilizado para a avaliação da sensibilidade dolorosa. Souza e Prado (2001) sugeriram que em baixas concentrações o NO induz efeito antinociceptivo, por ação na via descendente de modulação da dor, enquanto que altas concentrações são necessárias para manter o estado de hiperalgesia. Ainda, Ferreira e colaboradores (1991) demonstraram o envolvimento da via do NO na antinocicepção periférica induzida pela morfina, um agonista de receptor μ -opióide (Duarte *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1992).

Interações entre o sistema glutamatérgico e a formação do NO têm sido evidenciadas. A interação do glutamato com o receptor NMDA acarreta o influxo de cálcio intracelular, permitindo a ligação da calmodulina com a NOS neuronal e, conseqüentemente a ativação desta enzima (Garthwaite, 1991). Da mesma forma, os receptores metabotrópicos para o glutamato, por promoverem a liberação do cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, estimulam também a ativação da NOS neuronal (Allan & Rothwell, 2003, para revisão).

Além dos neurotransmissores, as prostaglandinas desempenham papel relevante na transmissão nociceptiva na medula espinhal (Vane & Botting, 1998). As enzimas COX-1 e COX-2 catalizam a formação de ácido araquidônico em prostanóides (Smith, 1989) e na medula espinhal, tanto COX-1 quanto COX-2 estão expressas constitutivamente (Yaksh *et al.*, 2001). Evidências têm mostrado que os níveis de PGs estão aumentados no fluído cérebro-espinhal em resposta a ativação persistente de fibras C (Malmberg & Yaksh, 1995) ou inflamação persistente (Samad *et al.*, 2001). Além disso, a administração intratecal de PGE₂ acarreta hiperalgesia térmica, mecânica ou química que pode ser

revertida pela administração i.t. de inibidores de COX ou antagonistas de receptores para PGE₂ (Svensson & Yaksh, 2002, para revisão).

Vários estudos têm mostrado que, na medula espinhal, uma variedade de citocinas estão envolvidas na dor induzida por inflamação periférica e dor neuropática (Arruda *et al.*, 2000; Milligan *et al.*, 2001). Os mecanismos envolvidos nesta hiperalgesia incluem a liberação de eicosanóides de vários tecidos; o aumento da expressão de receptores para NGF ou cininas; ou a ativação de fibras simpáticas (Cunha *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1992). Além disso, tem sido proposto que o TNF e IL-1 β têm papel relevante para a indução e manutenção de estados hipernociceptivos por meio da regulação da síntese de IL-6 (Sweitzer *et al.*, 2001). É importante salientar ainda que a IL-1 β é capaz de aumentar a síntese de COX-2 no SNC, contribuindo para os fenômenos hipernociceptivos (Samad *et al.*, 2001). Mais recentemente, Milligan e colaboradores (2001) observaram que TNF α e IL-1 podem ser liberados na medula espinhal após estimulação antigênica local, aumentando os estados dolorosos

Além destas citocinas, várias evidências tem sugerido que as quimiocinas liberadas na medula espinhal, são mediadores da dor patológica (Boddeke, 2001). A fractalquina integra a família das quimiocinas, sendo expressa apenas em neurônios e astrócitos. O receptor para esta quimiocina, o CX3CR1, é encontrado predominantemente em células da microglia e em menor concentração nos astrócitos (Harrison *et al.*, 1998). A fractalquina têm papel relevante na sinalização entre neurônios e microglia, sendo importante mediador da dor (Maciejewski-Lenoir *et al.*, 1999; Milligan *et al.*, 2003b).

Ainda, a adenosina é uma purina capaz de causar tanto dor quanto analgesia, dependendo do local de ação e do subtipo de receptor envolvido. Esta purina atua em receptores purinérgicos P₁, que são ligados à proteína G, os quais foram subdivididos nos subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Aird, 2002). A adenosina regula a transmissão nociceptiva espinhal, supra espinhal e periférica, além de possuir papel importante na dor neuropática. Os receptores A₁ e A₂ para adenosina estão localizados na substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal. Os receptores A₁ são responsáveis pela neuromodulação e neuroproteção inibitória. Os receptores A_{2A} induzem ações excitatórias, podendo exacerbar lesões cerebrais, enquanto que os receptores A_{2B} exercem seus efeitos em processos inflamatórios centrais, por regularem funções gliais. Com relação aos receptores A₃, seu efeito é ainda incerto, podendo exercer ação tanto protetora quanto indutora de injúria, dependendo do seu local de ação (Sawynok *et al.*, 1997; Poon & Sawynok, 1998; Sawynok, 1998; Sawynok & Liu, 2003). A adenosina pode ser gerada em

quantidades significativas na vigência de lesões tecidual, ativando fibras aferentes não mielinizadas, provocando dor em humanos e nocicepção em animais (Taiwo & Levine, 1990).

Vários dados da literatura têm evidenciado que as células da glia da medula espinhal, por meio de liberação de mediadores nociceptivos, têm papel relevante para a transmissão da informação nociceptiva no SNC (Barres, 1991; Watkins *et al.*, 2001; Milligan *et al.*, 2003a; Watkins & Maier, 2003). Centralmente, a glia é formada pela macroglia (oligodentrócitos e astrócitos) e pela microglia (Haydon, 2001). Os astrócitos constituem cerca de 50% das células gliais (Kimelberg, 1983, revisão), contribuindo para a homeostasia e para a regulação de concentrações de íons K^+ . Evidências recentes têm demonstrado a existência de interação entre astrócitos e neurônios (Araque *et al.*, 2001; Perea & Araque, 2002). Estas evidências estão baseadas em estudos empregando células em cultura e mostraram que neurotransmissores liberados por neurônios induzem, nos astrócitos, aumento dos níveis intracelulares de Ca^{++} , com consequente liberação de glutamato. O glutamato, uma vez liberado, modula a excitabilidade neuronal e o aumento da transmissão sináptica (Haydon, 2001). Os oligodentrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras nervosas no SNC e podem ser considerados como equivalente às células de Schwann no sistema nervoso periférico. A microglia é caracterizada pela presença de células pequenas e ovais (Streit *et al.*, 1988, para revisão). A microglia é o primeiro tipo de célula a responder a diversos tipos de injúria. A ativação microglial envolve um padrão de resposta celular estereotipado, com proliferação e recrutamento celular para o local da lesão, aumento da expressão de imunomoléculas e mudanças funcionais, incluindo a liberação de mediadores citotóxicos e/ou inflamatórios (Colburn & Deleo, 1999).

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 (Hartung *et al.*, 1988; Marriott *et al.*, 1991; Stella *et al.*, 1994; Agullo *et al.*, 1995). Além de sintetizar estas substâncias, a glia expressa receptores para o glutamato, SP, CGRP (Amann *et al.*, 1996) e as citocinas (Streit & Kincaid-Colton, 1995).

A importância das células da glia da medula espinhal, em processos nociceptivos, foi primeiramente evidenciada por Garrison *et al.* (1991), que mostraram o aumento da densidade destas células, mais especificamente de astrócitos, na medula espinhal, após a

indução de ligaduras no nervo ciático. Dados mais recentes têm demonstrado que a glia (astrócitos e microglia), além da participação em processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos nociceptivos (Milligan *et al.*, 2003a; Watkins & Maier, 2003). Assim, tem sido evidenciado a participação das células gliais na hiperalgesia induzida por processos inflamatórios periféricos. A hiperalgesia térmica resultante da injeção s.c. de formalina e i.p. de endotoxina (Watkins & Maier, 1999, revisão) é bloqueada pela injeção intratecal de inibidores gliais. Da mesma forma, a alodinia mecânica resultante da injeção periférica de zimosan, é também bloqueada por inibidor metabólico das células da glia (Milligan *et al.*, 2000). A lesão de nervos periféricos acarreta, na medula espinhal, a liberação, pelas células da glia, de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β e o TNF α , as quais medeiam os processos nociceptivos decorrentes desta lesão (Benveniste, 1992; Martin *et al.*, 1992; Lubet-Narod *et al.*, 1994). Cabe ressaltar que alterações da ativação glial não modificam a resposta a estímulos físicos, suportando a idéia de que a glia está envolvida especificamente, na dor decorrente de processos patológicos (Watkins *et al.*, 1997; Milligan *et al.*, 2000).

Efeito nociceptivo de fosfolipases A₂ isoladas de venenos do gênero Bothrops

Apesar das inúmeras atividades inflamatórias descritas para fosfolipases A₂ isoladas de venenos de serpentes (Pruzanski *et al.*, 1991; Wang & Teng, 1992; Lloret & Moreno, 1993; Chaves *et al.*, 1998; Landucci *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 2000), pouco se conhece sobre os efeitos nociceptivos destas toxinas e sua contribuição para a dor observada nos envenenamentos ofídicos.

Figura. 2 *Bothrops asper*

A primeira evidência de que fosfolipases A₂ miotóxicas induzem nocicepção foi apresentada por Chacur *et al.* (2003). Neste trabalho, os autores demonstraram que FLA₂ miotóxicas, variante Lys-49, destituída de atividade catalítica e variante Asp-49, com atividade catalítica (miotoxinas II e III, respectivamente), isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper* (Fig. 2), acarretam, em ratos, hipernocicepção, com pico na primeira hora após injeção das toxinas. Estudos experimentais sobre a mediação química envolvida no efeito hipernociceptivo das FLA₂s mostraram que este fenômeno é um processo multimediado, dependente da ação da bradicinina em receptores B₂, e pelo

menos parcialmente, da liberação de histamina, serotonina e citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1). Além disso, foi demonstrado também, que além destes mediadores, a hiperalgesia induzida pela FLA₂ variante Lys-49 é mediada por prostanóides e por aminas simpatomiméticas (Chacur *et al.*, 2003). Estes dados sugerem que apesar da não ser essencial para o desencadeamento de hiperalgesia, a presença da atividade catalítica é importante para a determinação da mediação química envolvida neste fenômeno.

Apesar destas evidências sobre o efeito hipernociceptivo das fosfolipases A₂ miotóxicas isoladas do veneno de *Bothrops asper*, não estão caracterizados ainda os mecanismos estruturais e moleculares envolvidos neste efeito. Não foi determinado também, o envolvimento de neurotransmissores liberados na medula espinhal, bem como a participação das células da glia para a gênese ou manutenção deste fenômeno hipernociceptivo.

Cabe ressaltar que o veneno de *Bothrops asper* induz dor em humanos (Gutierrez & Lomonte, 1995; Arroyo *et al.*, 1999). Experimentalmente, foi evidenciada a capacidade deste veneno em acarretar hipernocicepção em ratos, mediada principalmente por bradicinina (Chacur *et al.*, 2001). Uma vez que as FLA₂ miotóxicas correspondem à cerca de 15-25% do veneno bruto de *B. asper* (Gutiérrez & Lomonte, 1995) e em decorrência de dados obtidos nos estudos experimentais sobre o efeito hipernociceptivo destas toxinas e do veneno bruto, é possível sugerir que estas FLA₂ miotóxicas devem contribuir para a gênese da dor observada durante o envenenamento humano por esta serpente.

2-**OBJETIVOS**

Em continuidade aos estudos sobre o efeito algogênico de fosfolipases A₂ variantes Lys49 e Asp49, isoladas dos venenos de *Bothrops asper*, o objetivo do presente projeto de pesquisa foi avaliar:

A) os mecanismos estruturais envolvidos no efeito hipernociceptivo, investigando a importância do sítio catalítico e da porção C-terminal das moléculas para a gênese do fenômeno.

B) os mecanismos moleculares, determinando a participação das proteíno-quinases dependentes de AMPc e GMPc, da fosfolipase C, proteíno quinase C e de canais iônicos.

C) os mecanismos centrais, evocados na medula espinhal, determinando a participação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, prostanóides, adenosina, bem como o envolvimento das células da glia na gênese e manutenção destes fenômeno.

d) as possíveis alterações histopatológicas de tecido nervoso da pata de ratos injetados com as fosfolipases A₂.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos: a) Wistar, pesando entre 160-180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil e b) Sprague-Dawley, pesando entre 350-375 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Colorado, em Boulder, EUA. Ambas as linhagens animais, utilizadas no presente projeto de pesquisa, têm aproximadamente dois meses e meio de idade. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB-protocolo nº 055/2002) e comissão de Ética da Universidade do Colorado e obedeceram as normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (Zimmermann, 1983).

3.2. Fosfolipases A₂

3.2.1. Obtenção das fosfolipases A₂

Foram utilizadas fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *Bothrops asper*. A miotoxina II, uma FLA₂ variante Lys-49 e a miotoxina III, uma FLA₂ variante Asp-49 foram obtidas do veneno bruto, por cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex C-50 (Lomonte & Gutiérrez, 1989; Kaiser *et al.*, 1990). Os picos correspondentes à miotoxina II (Lomonte & Gutiérrez, 1989) e miotoxina III (Bultrón *et al.*, 1993) foram coletados e novamente purificados por cromatografia de troca iônica em sistema HPLC, utilizando coluna Mono-S. As amostras puras foram liofilizadas e a homogeneidade demonstrada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, em condições de redução (Laemmli, 1970).

3.2.3. Atividade biológica das fosfolipases A₂

Para demonstrar a atividade biológica destas toxinas purificadas, foi empregado ensaio de miotoxicidade, através da determinação da quantidade de enzima creatinoquinase (CK) liberada na circulação sanguínea de camundongos, utilizando-se "Kit" CK (Sigma, EUA). Para tanto, camundongos Swiss, machos (18-20 g), foram injetados, por via intramuscular (músculo gastrônemico direito), com as toxinas (50µg em 100µl de salina estéril). Animais controles foram tratados com solução salina. Três horas após, o

sangue dos camundongos foi coletado em tubos capilares heparinizados e centrifugado para obtenção do plasma. A atividade da enzima creatino-quinase foi então quantificada, por ensaio cinético. Estas etapas foram realizadas pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado da Universidade da Costa Rica.

As fosfolipases liofilizadas foram mantidas a -20°C e preparadas (p/v) em solução estéril de NaCl 0,85%, no momento do uso.

3.3 Planejamento geral

Para análise do efeito hipernociceptivo pelas FLA₂s, foi determinada a capacidade de ambas as fosfolipases em induzir os fenômenos de hiperalgesia e alodinia.

Para a investigação dos mecanismos estruturais envolvidos na atividade das FLA₂s, foi determinada a importância da atividade fosfolipásica da FLA₂-Asp49 por meio da utilização do brometo de *p*-bromofenacil (*p*-BPB), um agente alquilante da His48 (Gutierrez *et al.*, 1986). Para a análise da importância dos sítios catiônicos presentes nestas moléculas, as fosfolipases A₂ foram neutralizadas pelo poliânion heparina. Para investigar a contribuição dos resíduos catiônicos/hidrofóbicos presentes na região 115-129 da porção C-terminal de ambas as moléculas, foram utilizados peptídeos sintéticos correspondentes a esta região.

Para a avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na hipernocicepção acarretada por ambas as fosfolipases A₂, foram empregados inibidores de proteínó-quinases dependentes de AMPc ou GMPc, de PKC e de FLC. O envolvimento de canais de cálcio ou sódio, foi investigado utilizando bloqueadores destes canais.

Em relação à determinação dos mediadores químicos liberados na medula espinhal, envolvidos no efeito algogênico periférico de ambas as fosfolipases A₂, foram empregados antagonistas de receptores, anticorpos específicos ou inibidores enzimáticos, administrados por via intratecal (i.t.), antes da injeção intraplantar das toxinas. Foi analisada a participação de a) glutamato, taquicinas e CGRP, através da utilização de antagonistas de receptores ionotrópicos e metabotrópicos para glutamato, de antagonista de receptores NK₁ e NK₂ para taquicinas e de antagonistas de receptores para CGRP; b) óxido nítrico, através de uso de inibidores da óxido nítrico sintase neuronal e induzida; c) interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF α), através da utilização de anticorpos anti citocinas; d) prostanóides, empregando inibidor seletivo da ciclooxigenase do tipo II e e) adenosina, utilizando antagonista de receptor A₂. Foi nosso objetivo também, avaliar o tipo e a importância destes receptores para a manutenção do processo algogênico

induzido por estas FLA₂s. Para tanto, os antagonistas de receptores para glutamato ou taquicinas foram administrados 1 hora após a injeção das toxinas.

Foi analisada ainda, a participação das células da glia, da medula espinhal, através da utilização do fluorocitrato, um inibidor metabólico destas células. Uma vez detectada a participação glial, avaliamos o tipo de célula da glia envolvida neste efeito, por meio da determinação, em ensaios de imunohistoquímica, da porcentagem de área ocupada por astrócitos e microglia. Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Neurociências da Universidade do Colorado em Boulder, EUA sob a orientação da Dra. Linda R. Watkins e no Laboratório de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas, USP, São Paulo, Brasil sob a orientação do Prof. Dr. Luiz R. G. Britto.

Com o intuito de determinar possíveis alterações nos nervos da pata de ratos tratados com as FLA₂s, foram realizadas análises histológicas do coxim plantar destes animais.

3.4 Determinação da hiperalgesia mecânica

Figura 3- Analgesímetro Ugo Basile®

Foi utilizado o teste da pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile, Itália) (Fig. 3), realizado de acordo com o método descrito por Randall & Sellitto (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do animal e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro. Neste modelo, o limiar da dor é representado como a força (g)

necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após (medidas finais) a administração intraplantar (i.pl.), em uma das patas posteriores dos ratos, das fosfolipases A₂ ou salina estéril (animais controle). As toxinas ou salina foram administradas em um volume total de 100 µl.

Os resultados foram analisados através da comparação das medidas das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.5 Determinação da alodinia mecânica

Foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pata posterior do rato, segundo método descrito por Chaplan *et al.* (1994), modificado. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas com fundo de

arame, para permitir acesso às patas destes animais. Os ratos foram inicialmente habituados à gaiola, por uma hora, durante os três dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados na gaiola, 20 minutos antes do início dos experimentos. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Figs. 4 e 5) (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA). A rigidez dos filamentos é definida como $\log_{10}$ (gramas $\times$ 10000), tendo

os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407g); 3,84 (0,692g); 4,08 (1,202g); 4,17 (1,479g); 4,31 (2,041g); 4,56 (3,630g); 4,74 (5,495g); 4,93 (8,511g); 5,07 (11,749g) e 5,18 (15,136g). Cabe ressaltar que os filamentos com rigidez superior à 15,136g não foram empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar de uma das patas posteriores e mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041g. Na ocorrência da retirada da pata a este filamento, foi utilizado o filamento de 0,407g. Na ausência de resposta com o filamento de 0,407g, o filamento seguinte (0,692g) foi aplicado 30-60s depois. O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (2,041g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento. Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135g), este filamento foi considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal ao teste (Milligan *et al.*, 2000).

Figura 5- aplicação dos filamentos de von Frey na pata dos ratos

O valor da força (em log) necessária para induzir 50% de resposta de retirada da pata foi calculado pela aplicação de uma função psicométrica integral de Gauss.

Esta função foi aplicada para as respostas obtidas para cada filamento de von Frey, utilizando um método de ajuste de probabilidade máxima. Os limiares de resposta estimados a partir da função integral de Gauss tornaram-se, desta forma, apropriados para análise estatística paramétrica. A função Gaussiana foi aplicada utilizando programa de computador PsychoFit.

Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após (medidas finais) a administração intraplantar (i.pl.), em uma das patas posteriores dos ratos, das fosfolipases A₂ ou salina estéril (animais controle). As toxinas ou salina foram administradas em um volume total de 100 µl.

Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.6 Avaliação da relação estrutura-atividade das fosfolipases A₂

3.6.1. Estudo de neutralização de sítios catiônicos pela heparina.

Heparina de baixa afinidade por antitrombina, foi incubada com cada miotoxina (razão molar heparina:miotoxina igual a 10), em temperatura ambiente, por 30 min. A mistura foi subsequente injetada nos animais, pela via intraplantar, para avaliação dos fenômenos de hiperalgesia e alodinia.

3.6.2. Estudo da importância da atividade fosfolipásica através do tratamento com o brometo de *p*-bromofenacil.

Para confirmar a importância da atividade fosfolipásica da miotoxina III para o fenômeno hipernociceptivo, a toxina foi inativada pelo brometo de *p*-bromofenacil (*p*-BPB). Para tanto, a miotoxina III foi dissolvida em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0, contendo 0,7 mM de EDTA) e misturada com o *p*-BPB, obtendo-se a concentração final de 0,4 mg/ml. A mistura foi incubada a 37 °C, por 20 horas. Após este período, a mistura foi filtrada em Sephadex G25, com o intuito de eliminar o excesso de brometo de *p*-bromofenacil que não se complexou com a fosfolipase A₂, de Tris e de EDTA. O controle foi constituído pela toxina submetida às etapas descritas, não havendo, porém, a adição do *p*-BPB. Para confirmar a inibição da atividade enzimática da FLA₂, foi realizado ensaio enzimático *in vitro*, quantificando a liberação, por titulação, de ácidos graxos (Gutierrez *et*

al., 1986). Esta etapa foi realizada pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado da Universidade da Costa Rica.

3.6.3. Estudo da contribuição dos resíduos catiônicos/hidrofóbicos presentes na região C-terminal (115-129).

Baseados em dados sugerindo que a região catiônica 115-129 da miotoxina II (FLA₂ variante Lys49) é a responsável pela sua atividade citolítica e miotóxica (Lomonte *et al.*, 1994b; Nunez *et al.*, 2001), foram utilizados, para a avaliação da atividade hipernociceptiva, peptídeos 13-mer, sintetizados pela estratégia Fmoc [N-(9-fluorenil) metoxycarbonil] (Valerio *et al.*, 1993). Foram empregados: a) o peptídeo p115-129 (sistema de numeração (Renetseder *et al.*, 1985) correspondente aos resíduos 105-117 (KKYRYYLKPLCKK) da miotoxina II (Francis *et al.*, 1991) e o peptídeo p115-W3, correspondente à tripla substituição, no peptídeo 115-129, da tirosina pelo triptofano (Y117W/4119W/Y120W), o que acarreta incremento do caráter anfifílico da molécula. A pureza dos peptídeos foi de 95% e 98% respectivamente, em análise por HPLC e espectrometria de massa; b) o peptídeo correspondente à região C-terminal homóloga da miotoxina III (FLA₂ variante Asp49) (KKRYMAYPDLLCKK), com pureza de 95%. Os peptídeos foram armazenados a -20°C e dissolvidos em solução de salina estéril no momento do uso. Os peptídeos foram sintetizados pelo Dr. Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado da Universidade da Costa Rica.

3.7 Administração intratecal das drogas

Os animais foram levemente anestesiados por inalação de halotano (Cristália Ltda.). Erguendo-se o osso ilíaco (espinhas ilíacas ventrais), uma agulha de número 23 (13 x 0,4 mm) foi inserida diretamente no espaço subaracnóideo entre as vértebras lombares L5 e L6. Imediatamente após a inserção, o *flick* característico da cauda foi observado, indicando a entrada da agulha no espaço subaracnóideo da medula. Os fármacos foram injetados lentamente, utilizando microseringa Hamilton de 50µl.

Para garantir que o local da injeção permanecia restrito a L5 e L6, na medula espinhal, foram realizados estudos pilotos, no qual foram injetados, por via i.t., 50µl do corante azul brilhante. Imediatamente após, 1 ou 4 horas após a injeção do corante, os animais foram sacrificados e a posição do corante verificada.

3.8 Tratamentos farmacológicos

- ♦FLA₂s (variantes Lys-49 e Asp-49), administradas por via intraplantar (volume de injeção, 100 µL).
- ♦Peptídeos sintéticos correspondentes à região 115-129 das FLA₂ (10 µg/pata, volume de injeção, 100 µL).
- ♦Verapamil, bloqueador de canal de cálcio do tipo Cav1 (tipo L), dissolvido em salina e administrado por via i.p. (22,91 µmol, volume de injeção, 200 µL), 30 minutos antes das fosfolipases A₂ (Prado, 2001).
- ♦ω-conotoxin MVIIC, bloqueador de canal de cálcio do tipo Cav2.1 (tipo P/Q), dissolvido em salina e administrado por via i.p. (5,44 µmol, volume de injeção, 200 µL), 30 minutos antes das fosfolipases A₂ (Prado, 2001).
- ♦ω-conotoxin MVIIA, bloqueador de canal de cálcio do tipo Cav2.2 (tipo N), dissolvido em salina e administrado por via i.p. (3,41 µmol, volume de injeção, 200 µL), 30 minutos antes das fosfolipases A₂ (Prado, 2001).
- ♦Carbamazepina, bloqueador de canal de sódio resistente à TTX, dissolvido em metanol-DMSO-salina, posteriormente diluído em salina e administrado por via oral (v.o.) (20 mg/Kg, volume de injeção, 200 µL), 60 minutos antes das fosfolipases A₂ (Bianchi *et al.*, 1995).
- ♦Rp-cAMPS, inibidor de proteíno-quinase de AMPc, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (67 µmol, volume de injeção, 100 µL), ou por via i.t. (2,2 mmol, volume de injeção, 50 µL), 30 ou 15 minutos antes, respectivamente, as fosfolipases A₂.
- ♦Rp-cGMPS inibidor de proteíno-quinase de GMPc, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (64 µmol, volume de injeção, 100 µL), ou por via i.t. (1,2 mmol, volume de injeção, 50 µL), 30 ou 15 minutos antes, respectivamente, as fosfolipases A₂.
- ♦ Bradicinina, dissolvida em salina e administrado por via i.pl. (9 µmol, volume de injeção, 50 µL) 30 minutos antes da injeção dos inibidores de proteíno-quinases.
- ♦U73122, inibidor da enzima fosfolipase C, dissolvido em 50% DMSO e salina e administrado por via i.pl. (0,43 mmol, volume de injeção, 50 µL), ou por via i.t. (5,4 nmol, volume de injeção, 50 µL), concomitante ou 10 minutos antes, respectivamente, as toxinas (Narita *et al.*, 2000).
- ♦GF109203X, inibidor da enzima PKC, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (0,44 mmol, volume de injeção, 50 µL), ou por via i.t. (0,73 nmol, volume de injeção, 50 µL), concomitante ou 15 minutos antes, respectivamente, das toxinas (Wajima *et al.*,

2000).

♦GR73632, agonista de receptor NK₁ para taquicinas, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (1 nmol, volume de injeção, 50 µL), administrado 15 minutos após o antagonista de receptor para NK₁ (GR82334) (O'shaughnessy & Connor, 1994; Guo *et al.*, 1995; Andoh *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998).

♦GR82334, antagonista de receptores NK₁ para taquicinas, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (10 µmol, volume de injeção, 50 µL), 15 minutos antes ou 1 hora após as miotoxinas (O'shaughnessy & Connor, 1994; Guo *et al.*, 1995; Andoh *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998).

♦GR64349, agonista de receptor NK₂ para taquicinas, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (100 nmol, volume de injeção, 50 µL), 15 minutos após o antagonista de receptor para NK₂ (GR94800) (O'shaughnessy & Connor, 1994; Guo *et al.*, 1995; Andoh *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998).

♦GR94800, antagonista de receptores NK₂ para taquicinas, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (10 µmol, volume de injeção, 50 µL), 15 minutos antes ou 1 hora após as miotoxinas (O'shaughnessy & Connor, 1994; Guo *et al.*, 1995; Andoh *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998).

♦CGRP₈₋₃₇, antagonista competitivo de receptor para CGRP, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (20 nmol, volume de injeção, 50 µL), imediatamente antes ou 10 minutos antes das miotoxinas (Long-Chuan *et al.*, 1998).

♦Capsazepina, antagonista de receptor vanilóide, dissolvido em metanol e salina, administrado por via i.v. (120 µmol, volume de injeção, 200 µL), 15 minutos antes das toxinas (Costa *et al.*, 2001).

♦Capsaicina, agonista de receptor vanilóide, dissolvido em etanol-DMSO-Salina e administrado por via i.pl. (50 µg, volume de injeção, 100 µL), 15 minutos após a capsazepina.

♦MK-801, antagonista não-competitivo de receptores NMDA, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (20 pmol, volume de injeção, 50 µL) ou por via i.t. (4,59 mmol, volume de injeção, 50 µL), imediatamente antes ou 1 hora após as toxinas (Birch *et al.*, 1988; Ferreira & Lorenzetti, 1994; Jackson *et al.*, 1995).

♦AP-5, antagonista competitivo de receptores NMDA, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (20 pmol, volume de injeção, 50 µL) ou por via i.t. (4,56 mmol, volume de injeção, 50 µL), imediatamente antes ou 1 hora após as toxinas (Birch *et al.*, 1988; Ferreira & Lorenzetti, 1994; Jackson *et al.*, 1995).

- ♦ CNQX antagonista de receptor não-NMDA, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (1 μ mol, volume de injeção, 50 μ L) ou por via i.t. (10 nmol, volume de injeção, 50 μ L), imediatamente antes ou 1 hora após as toxinas (Birch *et al.*, 1988; Ferreira & Lorenzetti, 1994; Jackson *et al.*, 1995).
- ♦ AIDA, antagonista de receptor metabotrópico, subtipo 1 (mGlu1), dissolvido em DMSO-salina, posteriormente diluído em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (300 nmol, volume de injeção, 50 μ L), 20 minutos antes ou 1 hora após as toxinas (Walker *et al.*, 2001b; Fisher *et al.*, 2002).
- ♦ MPEP, antagonista de receptor metabotrópico, subtipo 5 (mGlu5), dissolvido em DMSO-salina, posteriormente diluído em salina e administrado por via i.pl. ou i.t. (300 nmol, volume de injeção, 50 μ L), 20 minutos antes ou 1 hora após as toxinas (Walker *et al.*, 2001b; Fisher *et al.*, 2002).
- ♦ Glutamato, aminoácido excitatório, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (30 nmol, volume de injeção, 50 μ L) ou por via i.t. (0,1 mmol, volume de injeção, 50 μ L), imediatamente após os antagonistas de receptores para glutamato (Ferreira & Lorenzetti, 1994).
- ♦ 7-nitroindazol, inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), dissolvido em água destilada e administrado por via i.t. (7-NI, 1,11 μ mol, volume de injeção, 50 μ L), 1 hora antes das toxinas (Osborne & Coderre, 1999).
- ♦ L-NIL, inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase iduzível (iNOS), dissolvido em água destilada e administrado por via i.t. (1,11 μ mol, volume de injeção, 50 μ L), 1 hora antes das miotoxinas (Osborne & Coderre, 1999).
- ♦ Anticorpo anti-IL1, dissolvido em salina e administrado por via i.t. (10 μ g, volume de injeção, 50 μ L), 15 minutos antes da injeção das toxinas (Poole *et al.*, 1999; Milligan *et al.*, 2000).
- ♦ Anticorpo anti-TNF α , dissolvido em salina e administrado por via i.t. (1 μ g, volume de injeção, 50 μ L), 20 minutos antes da injeção de ambas fosfolipases A₂ (Poole *et al.*, 1999; Milligan *et al.*, 2000).
- ♦ Celecoxib, inibidor de ciclooxigenase tipo-2, dissolvido em DMSO-salina, posteriormente diluído em salina estéril e administrado por via i.t. (5,2 mmol, volume de injeção, 50 μ L), 10 minutos antes das toxinas (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 2002).
- ♦ 3,7-dimethyl-1-propargilxantina, antagonista de receptor A₂ para adenosina, dissolvido em salina e administrado por via i.t. (242 nmol, volume de injeção 50 μ L), 15 minutos antes, das toxinas (Poon & Sawynok, 1998; Song *et al.*, 2002).

♦ 2-fenilaminadenosina, agonista de receptor A₂ para adenosina, dissolvido em etanol-salina, posteriormente diluído em salina e administrado por via i.t. (10 nmol, volume de injeção, 50 µL), 15 minutos após a administração do antagonista de adenosina A₂ (Poon & Sawynok, 1998).

♦ Fluorocitrato, bloqueador preferencial das células da glia, dissolvido em salina e administrado por via i.t. (1 nmol, volume de injeção, 50 µL), 30 minutos antes das miotoxinas (Milligan *et al.*, 2000).

3.9 Ensaios de Imunohistoquímica

Os ratos foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina tamponada, seguida de solução fixadora constituída de 4% de formaldeído (PFA) dissolvido em tampão fosfato salina 0,1M (PB, pH 7,4) (Reuss *et al.*, 2001). Após a perfusão, a medula espinhal foi coletada e armazenada em 4% de formaldeído, durante 4 horas. Após este período, a medula foi transferida para uma solução tampão fosfato salina (PB), pH 7,4 contendo 30% de sacarose. Após 3 dias, a porção lombar (L3-L5/rostral e caudal) da medula foi separada e os fragmentos incluídos em gelatina (10%). Para os ensaios de imunohistoquímica, os blocos de gelatina contendo os fragmentos da medula, foram seccionados utilizando criostato (Hacker, EUA). Os cortes histológicos, com 40µm de espessura, foram colocados em placa de cultivo de 6 unidades, mantidos sob agitação constante e submetidos às seguintes etapas: a) lavados em PBS e em seguida mantidos em PBS contendo 30% de peróxido de hidrogênio e 10% de azida sódica, durante 30 minutos, para inibir a peroxidase endógena; b) submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, em PBS; c) em seguida incubados "overnight" à temperatura de -5°C, em solução incubadora, a qual contém PBS-T (5% de Triton X-100 e PBS na proporção de 1:9, respectivamente), 10% de azida sódica, 10% de soro normal de cabra, o anticorpo primário específico para astrócitos (Proteína Fibrilar Acídica Glial-GFAP, ICN Biomedical, EUA) ou específico para microglia (complemento do receptor C3, OX42, BioSource, EUA) (Milligan *et al.*, 2001); d) submetidos a três lavagens de 10 minutos cada com PBS; e) incubados durante 2 horas a temperatura ambiente, com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de camundongo obtido de cabra (1:200); f) submetidos à três lavagens em PBS; g) incubados com complexo avidina e biotina (1:100) durante 2 hr; h) submetidos à duas lavagens com PBS (10 minutos) e três lavagens em Tris HCl (pH 7,6). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,1% de azida sódica e 10% de soro normal de cabra. A marcação com peroxidase foi realizada usando

cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em Tris HCl, contendo glicose oxidase (0,02%), cloreto de amônio e β - D- glicose (0,1%) para gerar peróxido de hidrogênio, permitindo a revelação da reação. Os cortes histológicos foram então colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas, desidratados à temperatura ambiente, protegidos com meio de montagem à base de glicerol e recobertos com lamínulas de vidro.

Os cortes histológicos submetidos às imunomarcações específicas para astrócitos e microglia foram analisados ao microscópio de luz e as quantificações foram feitas com o programa Image (NIH-EUA). Este método consiste em análise por meio de microscopia de campo claro e contraste de interferência. A densidade óptica encontrada no lado contralateral (controle) foi considerada 100%, para a análise comparativa entre o lado controle e o experimental. Posteriormente, foi feito cálculo da média da diferença porcentual para cada corte analisado.

3.10 Drogas e Reagentes:

($\pm$)-2-amino-5-ácido fosfopentanóico (AP5) (Sigma-RBI, EUA)

ω -conotoxina MVIIA (Península Laboratórios, EUA)

ω -conotoxina MVIIC (Península Laboratórios, EUA)

2-fenilaminadenosina (Sigma-RBI, EUA)

3,7-dimetil-1-propargilxantina (Sigma-RBI, EUA)

7-nitroindazol (SIGMA, EUA)

Ácido glutâmico, hidrocloreto (Sigma, EUA)

AIDA (Tocris, EUA)

Anticorpo anti-IL-1 β (R&D Systems, EUA)

Anticorpo anti-TNF- α (R&D Systems, EUA)

Anticorpo secundário biotinilado (Jackson ImmunoResearch, EUA)

Bisindolilmaleimida I, hidrocloreto (Sigma, EUA)

Bradicinina (Sigma-RBI, EUA)

Capsaicina (Sigma-RBI, EUA)

Capsazepina (Sigma-RBI, EUA)

Carbamazepina (Sigma, EUA)

Celecoxib (Pharmacia, Brasil)

CNQX (Sigma-RBI, EUA)

Complexo avidina e biotina (ABC, Vector Laboratories, EUA)

Corante Azul Brilhante (Pontamine Sky Blue 6B, American Tokyo Kasel, Portland, OR, USA)

Cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Sigma-Aldrich, EUA)

Dizolcipina, maleato (MK801) (Sigma-RBI, EUA)

Fluorocítrico, ácido (Sigma, EUA)

Glicose oxidase (Sigma-Aldrich, EUA)

GR-64349 (Sigma-RBI, EUA)

GR-73632 (Sigma-RBI, EUA)

GR-82334 (Sigma-RBI, EUA)

GR-94800 (Sigma-RBI, EUA)

Heparina de baixa afinidade por antitrombina (LA-heparina, Kabi-Pharmacia, Suécia)

MPEP, hidrocloreto, (Tocris, EUA)

p-bromofenacil (*p*-BPB) (Sigma-RBI, EUA)

Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – fragmento 8-37 (CGRP₈₋₃₇) (Sigma, EUA)

Rp-adenosina 3',5'-monofosfotioato trietilamina cíclico (Rp-cAMPS, trietilamina) (Sigma-RBI, EUA)

Rp-guanosina 3',5'-monofosfotioato trietilamina cíclico (Rp-cGMPS, trietilamina) (SIGMA-RBI, EUA)

U73122 (Sigma, EUA)

Verapamil (Sigma, EUA)

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (Snedecor *et al.*, 1946) associado ao teste de Tukey (Sokal & Rohlf, 1981), para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

Para análise estatística dos ensaios de Imunohistoquímica, foi utilizada a análise de variância ANOVA associada ao programa Statview®. Quando a ANOVA indicou diferença significativa ($p < 0,05$), este teste foi associado ao teste de Fisher para comparação de mais de duas médias.

4-RESULTADOS

1. Caracterização da hiperalgesia e alodinia mecânicas induzidas pelas fosfolipases A₂ variantes Lys49 (desprovida de atividade catalítica) e Asp49 (com atividade catalítica).

1.1. Efeito da FLA₂-Lys49

Os animais foram injetados, por via i.pl., com a miotoxina II (FLA₂-Lys49), nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15 ou 20 µg ou salina (animais controle). A FLA₂-Lys49 acarretou aumento da sensibilidade à dor, quando comparado à medida inicial (Figura 6A). O efeito hiperalgésico máximo foi observado na 1ª hora após a injeção da toxina, decaindo a seguir e desaparecendo por completo na 24ª hora. A intensidade do fenômeno de hiperalgesia induzido pelas concentrações de 10, 15 e 20 µg/pata foi significativamente maior que a induzida pelas concentrações de 2,5 ou 5 µg.

Por outro lado, esta FLA₂ não acarretou alteração na resposta dos animais aos filamentos de von Frey em comparação com a medida inicial, durante todo o período de observação (Fig. 6B).

A administração i.pl. de salina (animais controles) não modificou a resposta dos animais em ambos os testes, em relação à medida inicial, durante todo o período de experimentação (Fig. 6).

Para os estudos subseqüentes foi escolhida a dose de 10 µg/pata desta FLA₂, por ser a menor dose a acarretar efeito hiperalgésico.

1.2. Efeito da FLA₂-Asp49

A miotoxina III (FLA₂-Asp49), nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/pata acarretou aumento da sensibilidade à dor (Figura 7A). O efeito hiperalgésico máximo foi observado 1 hora após a injeção da toxina, decaindo a seguir e desaparecendo até a 24ª hora. Não houve diferença na porcentagem do efeito máximo, em relação à medida inicial, entre as concentrações de 5 a 20 µg/pata. Não foi possível observar alteração do limiar de dor para a concentração de 2,5 µg/pata. A miotoxina III, além de hiperalgesia mecânica, acarretou, marcante diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata (Fig. 7B). O efeito alodínico máximo foi

observado na 1ª hora após a injeção da FLA₂-Asp49, decaindo a seguir e desaparecendo até a 24ª hora. Não foram detectadas diferenças significativas na intensidade ou evolução do fenômeno de alodinia entre todas as doses testadas. Não foi evidenciado o desenvolvimento de alodínia e/ou hiperalgesia na pata contralateral, não tratada com a toxina (dados não mostrados). Cabe ressaltar que ambos os fenômenos de alodinia e hiperalgesia apresentaram evolução semelhante, porém a intensidade de alteração do limiar de resposta ao estímulo mecânico de baixa intensidade foi maior em relação a alteração observada para o limiar de dor.

Figura 6- Efeito da fosfolipase A₂ variante Lys49 (FLA₂-Lys49) sobre (A) o limiar de dor (estimulação mecânica nociceptiva) e (B) a resposta à estimulação tátil da pata de ratos. O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil, avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mgx10), foram determinados antes (tempo zero) e 0,5; 1; 4; 6 e 24 horas após a injeção intraplantar de diversas concentrações de FLA₂-Lys49 ou salina (controle). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação a medida inicial.

Figura 7- Efeito da fosfolipase A₂ variante Asp49 (FLA₂-Asp49) sobre (A) o limiar de dor (estimulação mecânica nociceptiva) e (B) a resposta à estimulação tátil da pata dos ratos. O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil, avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mgX10), foram determinados antes (tempo zero) e 0,5; 1; 4; 6 e 24 horas após a injeção intraplantar de diversas concentrações de FLA₂-Asp49 ou salina (controle). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. *p<0,05 por comparação a medida inicial.

2. Determinação dos mecanismos estruturais envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A₂

2.1. Efeito da modificação química da fosfolipase A₂ variante Asp49

A alquilação da histidina 48 pelo brometo de *p*-bromofenacil reduziu a atividade enzimática da FLA₂-Asp49 para aproximadamente 1% da atividade da enzima controle (dados não mostrados). A inativação da miotoxina aboliu o efeito hiperalgésico e a alodinia acarretados pela toxina (Fig. 8).

2.2. Efeito da neutralização por heparina

A pré-incubação das fosfolipases A₂ com heparina inibiu parcialmente (40%) a hiperalgesia acarretada por ambas as toxinas (Fig. 9A) e a alodinia (28%) causada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 9B). A heparina *per se* não induziu alteração da sensibilidade dolorosa dos animais.

2.3. Avaliação do efeito nociceptivo dos peptídeos sintéticos

A injeção i.pl. de 10 µg do peptídeo sintético correspondente à região 115-129 da porção C-terminal da FLA₂-Lys49 causou hipernocicepção com cinética semelhante, porém de magnitude menor, do que aquela observada para a miotoxina nativa (Fig. 10A). Em decorrência dos dados obtidos com o peptídeo sintético, evidenciando que este peptídeo é capaz de induzir hiperalgesia, utilizou-se um peptídeo sintético (p115-w3) modificado pela tripla substituição Tyr→Trp (Y117W/Y119W/Y120W), uma vez que foi demonstrado que estas substituições incrementam as propriedades lesivas do peptídeo (Lomonte *et al.*, 1999). Este peptídeo acarretou também efeito hipernociceptivo (Fig. 10A), quando comparado com o grupo controle (salina). Em comparação com os dados obtidos para o peptídeo sintético não modificado, a tripla substituição induziu incremento da intensidade do fenômeno. Da mesma forma que o observado para a miotoxina nativa, o p115-W3 não causou o desenvolvimento de alodinia (Fig. 10C).

A injeção i.pl. de 10µg do peptídeo correspondente à região homóloga da FLA₂-Asp49 não causou fenômenos hipernociceptivos (Fig. 10B).

Figura 8. Efeito do tratamento com o brometo de *p*-bromofenacil (pBPB) sobre a hiperalgesia (A) e alodinia (B) induzidas pela fosfolipase A₂ variante Asp49 (FLA2-Asp49). A enzima foi modificada quimicamente pela incubação com o pBPB, de acordo com o descrito em Material e Métodos. Os animais foram injetados por via intraplantar, com 10 µg da fosfolipase A₂ nativa (FLA2-Asp49, controle) ou modificada pelo pBPB (FLA2-Asp49 inativada). O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil, avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como log (mg x 10). Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo, 1 hora após a injeção da toxina. * p < 0,05 por comparação com o grupo Salina.

Figura 9. Efeito da neutralização por heparina sobre a hiperalgesia (A) e alodinia (B) induzidas pelas fosfolipases A_2 variantes Lys49 e Asp49 (FLA2-Lys49 e FLA2-Asp49). As toxinas foram incubadas com heparina ou Veículo (salina), à temperatura ambiente por 30 min. A mistura contendo 10 μ g da FLA₂ neutralizada foi injetada por via intraplantar. Como controles foram utilizadas FLA₂s nativas (10 μ g/pata). A hiperalgesia foi avaliada pelo método de pressão de pata de ratos e o limiar de resposta ao estímulo tátil, avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como log (mg x 10). O limiar das respostas foi determinado antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** por comparação ao grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 10. Efeito dos peptídeos sintéticos correspondentes à porção C-terminal das fosfolipases A₂ sobre o limiar de dor (estimulação mecânica nociceptiva) (A e B) e a resposta à estimulação tátil (C) da pata de ratos. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão de pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil, avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como log (mg x 10). Os animais foram injetados por via intraplantar, com os peptídeos sintéticos, peptídeo Lys49, peptídeo Asp49 e peptídeos sintéticos Tyr-Trp (10µg/pata), com fosfolipases A₂ nativas (FLA2-Lys49 e FLA2-Asp49, 10µg/pata) ou salina. Os painéis representam os valores obtidos na 1ª hora após a administração das fosfolipases A₂ ou dos peptídeos. Os resultados correspondem à média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com o grupo salina e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Lys49.

3. Determinação dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A₂

3.1. Determinação da participação dos canais de cálcio

O tratamento com verapamil (22,91 µmol), bloqueador de canal de Ca⁺² do tipo Cav1 (canal tipo L), diminuiu significativamente, na 1ª hora, a resposta hiperalgésica induzida pela FLA₂-Lys49, sem interferir com a resposta acarretada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 11 A).

O pré-tratamento com ω-conotoxina MVIIA (3,41 µmol), bloqueador seletivo de canal de Ca⁺² do tipo Cav2.2 (canal tipo N), reduziu a hiperalgesia causada por ambas as toxinas. Para a FLA₂-Lys49, a inibição foi observada na 1ª hora após a administração da toxina. Em relação à FLA₂-Asp49, a redução foi detectada durante todo o período de observação da resposta hipernociceptiva (Fig. 11 B).

O pré-tratamento com ω-conotoxina MVIIC (5,44 µmol), bloqueador seletivo de canal de Ca⁺² do tipo Cav2.1 (canal tipo P/Q), diminuiu significativamente, apenas na 1ª hora, a resposta hiperalgésica induzida por ambas as toxinas (Fig. 11 C).

Os bloqueadores, *per se*, não acarretaram alterações do limiar de dor dos animais.

3.2. Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de sódio

O pré-tratamento carbamazepina (4mg/2mL), bloqueador de canais de sódio resistente à TTX, inibiu parcialmente a resposta hipernociceptiva induzida pelas FLA₂-Asp49 e FLA₂-Lys49 (Fig. 12).

A droga *per se* não alterou o limiar de dor dos animais.

3.3. Efeito dos inibidores de proteíno-quinases dependente de AMPc ou GMPc

O pré-tratamento com os inibidores de proteíno-quinases dependente de AMPc ou GMPc (R_p-AMPSc (67 µmol), e R_p-8-Br-GMPSc (64 µmol), respectivamente) quando injetados por via intraplantar (Fig. 13) e/ou intratecal (Fig. 14) não interferiram com a atividade hiperalgésica ou alodínica causada pelas fosfolipases A₂. Os inibidores, *per se*, não alteraram o limiar de dor dos animais.

Para avaliar a efetividade das doses utilizadas para os inibidores de proteíno quinases dependentes de AMPc ou GMPc, bradicinina foi empregada como controle

positivo. O tratamento com Rp-AMPC ou Rp-Br-GMPc interferiu com a hiperalgesia causada pela bradicinina (Fig. 15). Os valores representados na Fig. 15 correspondem ao pico da resposta hiperalgésica acarretada pela bradicinina, que foi observado na 3ª h após a administração do agente hipernociceptivo.

3.4. Efeito do tratamento com inibidor da enzima fosfolipase C

O pré-tratamento com U73122 (0,43 mmol), inibidor da enzima fosfolipase C, tanto por via intraplantar (i.pl.), quanto por via intratecal (i.t.), não alterou a resposta hiperalgésica ou alodínica induzida por ambas as fosfolipases (Figs. 16 e 17).

A droga *per se* não alterou o limiar de dor dos animais.

3.5. Efeito do tratamento com inibidor da enzima PKC

O pré-tratamento i.pl. ou i.t., com GF109203X (0,44 mmol), inibidor da enzima PKC, não foi capaz de interferir com os efeitos hipernociceptivos induzidos pelas fosfolipases A₂ (Figs. 16 e 17).

A droga *per se* não alterou o limiar de dor dos animais.

A **Tabela III** apresenta um quadro resumo dos resultados relacionados aos mecanismos moleculares envolvidos no efeito hiperalgésico de ambas as FLA₂s.

Figura 11. Efeito do tratamento com Verapamil (A), MVIIA (B) ou MVIIC (C) sobre a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 ou Asp49. O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com MVIIA (3,41 μ mol), MVIIC (5,44 μ mol), Verapamil (22,91 μ mol) ou Veículo (salina), por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 12. Efeito do tratamento com carbamazepina sobre a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 ou Asp49. O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, foram determinado antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com carbamazepina (4 mg/ 2 mL) ou Veículo (metanol-DMSO-salina), por via oral, 60 minutos antes da injeção das FLAs₂. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 13. Efeito do tratamento intraplantar com Rp-AMPC ou Rp-GMPc sobre a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com Rp-AMPC ou Rp-GMPc (67 µmol e 64 µmol, respectivamente) ou Veículo (salina), por via i.pl. 30 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

Figura 14. Efeito do tratamento intratecal com Rp-AMPC ou Rp-GMPc sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA₂) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com Rp-AMPC ou Rp-GMPc (2,2 mmol e 1,2 mmol, respectivamente) ou Veículo (salina), por via intratecal 15 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

Figura 15. Efeito do inibidor de proteínquinase dependente de AMPc ou GMPc sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas. Os animais foram tratados com Rp-AMPC ou Rp-GMPc por via intraplantar (67 μ mol e 64 μ mol, respectivamente) ou intratecal (67 μ mol e 64 μ mol, respectivamente), 30 minutos antes da injeção intraplantar de da bradicinina (9 μ mol) ou salina. Os resultados representam o limiar de dor 3 horas após a injeção da bradicinina, que corresponde à resposta hipernociceptiva máxima, e estão expressos como a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Bradicinina+Salina).

Figura 16. Efeito do tratamento intraplantar com GF109203X ou U73122 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, foi determinado antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com GF109203X (0,44 mmol), U73122 (0,43 mmol) ou Veículo (DMSO), por via i.pl., 15 ou 10 minutos antes da injeção das FLA2s, respectivamente. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial.

Figura 17. Efeito do tratamento intratecal com GF109203X ou U731222 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com GF109203X (0,73 nmol), U73122 (5,4 nmol) ou Veículo (DMSO), por via intratecal, 15 ou 10 minutos antes da injeção das FLA2s, respectivamente. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo.* p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

Tabela III - Quadro resumo do efeito dos diversos tratamentos farmacológicos sobre a hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A₂.

<i>Tratamentos</i>	<i>FLA₂-Lys49</i>	<i>FLA₂-Asp49</i>
Rp-AMPC	—	—
Rp-GMPC	—	—
U73122	—	—
GF 109203X	—	—
3,7-dimetil	—	—
<i>Verapamil</i>	<i>RP (42%)</i>	—
<i>MVIIA</i>	<i>RP (35%)</i>	<i>RP (47%)</i>
<i>MVIIC</i>	<i>RP (53%)</i>	<i>RP (61%)</i>
<i>Carbamazepina</i>	<i>RP(49%)</i>	<i>RP (48%)</i>

Os resultados representam os efeitos observados 1 hora após a injeção das fosfolipases A₂, variantes Lys49 (FLA₂-Lys49) ou Asp49 (FLA₂-Asp49) (10 µg/pata). Doses, tempos e via de administração das drogas conforme descrito em Material e Métodos. RP - reversão parcial; — - sem efeito.

4. Determinação dos mediadores químicos liberados periféricamente e na medula espinhal envolvidos no efeito algogênico das fosfolipases A₂

Neste estudo foram caracterizados os mediadores químicos liberados na medula espinhal. Para tanto, os diversos fármacos empregados neste estudo foram administrados por via intratecal, e o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia investigados.

4.1. Efeito dos antagonistas de receptores NK₁ ou NK₂ para taquicininas

A administração prévia de GR 82334 (10 µmol), antagonista de receptor NK₁, reduziu a resposta hiperalgésica causada por ambas as FLA₂s (Fig. 18 A,B). Este antagonista inibiu parcialmente a alodinia na 1ª hora após a injeção da FLA₂-Asp49 e reverteu totalmente este fenômeno na 4ª hora (Fig. 18 C).

A injeção intratecal do antagonista de receptor NK₂ (10 µmol) não interferiu com a resposta hipernociceptiva induzida por ambas as miotoxinas (Fig. 18 A,B). Por outro lado, este antagonista foi capaz de bloquear a alodinia causada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 18 C).

Trabalhos da literatura têm mostrado que as taquicininas, além de atuarem em sinapses medulares, podem ser liberadas nas terminações periféricas das fibras nervosas sensitivas (Levine *et al.*, 1993). Uma vez demonstrada a participação central das taquicininas na resposta nociceptiva induzida por ambas fosfolipases A₂, foi nosso objetivo avaliar também a participação periférica destas neurocininas. A administração prévia, por via i.pl., dos antagonistas de receptores para NK₁ ou NK₂, não foi capaz de alterar a hipernocicepção induzida pelas FLA₂, durante todo o período de observação (Fig. 19).

Os antagonistas *per se*, quando administrados por via i.t. ou por via i.pl., não acarretaram alteração da sensibilidade dolorosa dos animais (Figs. 18 e 19).

Para confirmar a eficácia das doses utilizadas para os antagonistas dos receptores para taquicininas, os mesmos tratamentos foram realizados empregando agonistas destes receptores como controle positivo. De acordo com os resultados apresentados na Fig. 20, o GR73631 e o GR64349, agonistas de receptores NK₁ e NK₂, respectivamente, quando administrados por via intratecal ou via intraplantar, acarretaram hiperalgesia mecânica,

com pico na 1ª hora. Este fenômeno foi totalmente revertido pelo pré-tratamento com os antagonistas destes receptores.

4.2. Efeito do tratamento com CGRP₈₋₃₇

A administração prévia de CGRP₈₋₃₇ (20 nmol), antagonista competitivo do receptor para CGRP, inibiu parcialmente a hiperalgesia induzida pelas FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49 (Fig. 21 A,B). Este antagonista reduziu também a alodinia causada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 21 C). Esta reversão foi significativa apenas na 1ª hora (14% de inibição) após a injeção das fosfolipases.

Uma vez demonstrada a participação central do CGRP, foi nosso objetivo avaliar a participação periférica deste mediador, através do uso do antagonista de receptor para CGRP, administrado por via i.pl., 10 minutos antes das toxinas. A administração prévia de CGRP₈₋₃₇ inibiu parcialmente a hiperalgesia, sem interferir com a alodinia induzida pela fosfolipase A₂-Asp49 (Fig. 22 B,C). Este mesmo tratamento não foi capaz de interferir com a resposta hiperalgésica induzida pela FLA₂-Lys49 (Fig. 22 A).

O antagonista, *per se*, não acarretou alteração da sensibilidade dolorosa dos animais (Figs. 21 e 22).

4.3. Efeito do tratamento com capsazepina

Uma vez detectada a participação de neuropeptídeos no efeito algogênico das miotoxinas, foi investigada a participação de receptores vanilóides neste efeito, por meio da utilização de capsazepina (120 µmol), um antagonista deste receptor. O pré-tratamento com este fármaco, por via endovenosa, acarretou inibição parcial da resposta hipernociceptiva induzida por ambas as toxinas (Fig. 23). O antagonista *per se* não produziu alteração da sensibilidade dolorosa dos animais (Fig. 23).

Para verificar a efetividade da dose de capsazepina, utilizamos como controle positivo, a capsaicina. A administração intraplantar de capsaicina reduziu o limiar de dor dos animais, sendo a resposta hiperalgésica máxima detectada 30 minutos após a administração da droga. O pré-tratamento com capsazepina, na dose testada, inibiu significativamente a resposta hiperalgésica induzida pela capsaicina (Fig. 24).

4.4. Efeito dos antagonistas de receptores ionotrópicos para glutamato

O tratamento com MK-801 (20 pmol), antagonista não-competitivo de receptores NMDA, inibiu a hipernocicepção acarretada pela FLA₂-Lys49 (Fig. 25 A). Este mesmo tratamento diminuiu parcialmente a resposta hiperalgésica e reverteu a alodinia induzida pela FLA₂-Asp49 (Fig. 25 B,C).

A administração de AP-5 (20 pmol), antagonista competitivo de receptores NMDA, não interferiu com a hiperalgesia acarretada pela FLA₂-Lys49 (Fig. 25A). Este tratamento reverteu parcialmente a hiperalgesia causada pela FLA₂-Asp49, sem modificar, contudo, a alodinia induzida por esta miotoxina (Fig 25 B,C).

O tratamento com CNQX (1 µmol), antagonista de receptores não-NMDA, não interferiu com a hiperalgesia induzida pelas FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49 (Fig. 26 A,B). Este tratamento não alterou a alodinia acarretada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 26 C).

Trabalhos da literatura têm mostrado que o glutamato, além de mediador central da transmissão do impulso nociceptivo, tem também ação algogênica periférica, por atuação em receptores presentes nas terminações periféricas de nociceptores cutâneos (Zhou *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1997; Lawand *et al.*, 1997). Uma vez demonstrada a participação central do glutamato na resposta algogênica induzida por ambas fosfolipases A₂, foi nosso objetivo avaliar a participação periférica deste aminoácido, através do uso de antagonistas de receptores para NMDA e não-NMDA para este mediador, administrados por via intraplantar.

Somente o tratamento com MK-801, antagonista não-competitivo de receptores NMDA, foi capaz de bloquear a hiperalgesia e reduzir a alodinia acarretadas pela FLA₂-Asp49 (Fig. 27). Nenhum dos tratamento modificou o efeito hipernociceptivo da FLA₂-Lys49 (Fig. 27 e 28).

Os antagonistas, *per se*, administrados por via i.t. ou i.pl., não alteraram a sensibilidade dolorosa dos animais (Figs. 25-28).

Como controle da efetividade das doses utilizadas para estes fármacos, foi empregado o glutamato como agente indutor de hiperalgesia, administrado por via i.t ou i.pl. Os dados apresentados na Fig. 31 mostram que os antagonistas foram capazes de inibir na primeira hora, o efeito hipernociceptivo induzido pelo glutamato.

4.5. Efeito dos antagonistas de receptores metabotrópicos do grupo I para glutamato - subtipo 1 e subtipo 5 (mGlu1 e mGlu5).

O pré-tratamento com AIDA ou MPEP (300 nmol), antagonistas de receptores metabotrópicos mGlu1 e mGlu5, respectivamente, reduziu, na 1ª hora, a hipernocicepção e alodinia causadas pela FLA₂-Asp49 (Fig. 29 B,C). Por outro lado, estes mesmos antagonistas não foram capazes de interferir com a resposta hipernociceptiva induzida pela FLA₂-Lys49 (Fig. 29 A).

Como descrito anteriormente, trabalhos da literatura demonstram a participação periférica do glutamato também por atuação em receptores metabotrópicos presentes na periferia (Walker *et al.*, 2001a; Walker *et al.*, 2001b). Assim, investigamos presentemente o envolvimento de receptores mGlu1 e mGlu5 periféricos no efeito hipernociceptivo induzido pelas FLA₂s, através do uso de antagonistas destes receptores, administrados por via intraplantar.

Como apresentado na figura 30, os antagonistas de receptores metabotrópicos, quando administrados por via intraplantar, não interferiram com a hiperalgesia ou alodinia induzidos pelas fosfolipases A₂ (Fig. 30).

Os antagonistas *per se*, administrados tanto por via i.t. e i.pl., não alteraram o limiar de dor dos animais (Figs. 26 e 30).

Como controle da efetividade das doses utilizadas para estes fármacos, foi empregado o glutamato como agente indutor de hiperalgesia, administrado por via i.t ou i.pl. Os dados apresentados na Fig. 31 mostram que os antagonistas foram capazes de inibir na primeira hora, o efeito hipernociceptivo induzido pelo glutamato.

Figura 18. Efeito do tratamento intratecal com GR 82334 ou GR 94800 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com GR 82334, GR94800 (10 μ mol) ou Veículo (Salina), por via intratecal, 15 minutos antes da injeção das FLA2s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 19. Efeito do tratamento intraplantar com GR 82334 ou GR 94800 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA $_2$) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com GR 82334, GR94800 (10 μ mol) ou Veículo (Salina), por via i.pl., 15 minutos antes da injeção das FLA $_2$ s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial.

Figura 20. Efeito dos antagonistas de receptores para taquicinininas sobre a hiperalgesia induzida pelos agonistas destes receptores. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas. Os animais foram tratados com GR82334 (antagonista NK₁-10 µmol), GR94800 (antagonista NK₂-10 µmol) ou Salina, 15 minutos antes da injeção de GR73632 (agonista NK₁-1 nmol), GR64349 (agonista NK₂-100 nmol), ou salina, por via intratecal ou intraplantar. Os resultados representam o limiar de dor 1 hora após a injeção dos agonistas, que corresponde à resposta hipernociceptiva máxima, e estão expressos como a média ± epm de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle (Salina+Salina).

Figura 21. Efeito do tratamento intratecal com CGRP8-37 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com CGRP8-37 (20 nmol) ou Veículo (Salina), por via intratecal, 10 minutos antes da injeção intraplantar das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 22. Efeito do tratamento intraplantar com CGRP8-37 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com CGRP8-37 (20 nmol) ou Veículo (salina), por via i.pl., 10 minutos antes da injeção intraplantar das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 23. Efeito do tratamento endovenoso com capsazepina sobre a hiperalgesia (A) e alodinia (B) induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 ou Asp49. O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (Salina). Os animais foram tratados com capsazepina (120 μ mol) ou Veículo (metanol-salina) por via endovenosa, 15 minutos antes da injeção das FLA₂. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 24. Efeito da capsazepina sobre a hiperalgesia induzida por capsaicina. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas. Os animais foram tratados com capsazepina (120 μ mol) ou salina por via endovenosa, 15 minutos antes da injeção de capsaicina (50 μ g) por via intraplantar. Os resultados representam o limiar de dor 30 minutos após a injeção de capsaicina, que corresponde à resposta hipernociceptiva máxima, e estão expressos como a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (capsaicina+Salina).

Figura 25. Efeito do tratamento intratecal com MK-801 ou AP5 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com MK-801 (4,59 mmol), AP5 (4,56 mmol) ou Veículo (água destilada), por via intratecal, imediatamente antes da injeção das FLA2s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 26. Efeito do tratamento intratecal com CNQX sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA $_2$) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com CNQX (10 nmol) ou Veículo (água destilada), por via intratecal imediatamente antes da injeção das FLAs $_2$. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial.

Figura 27. Efeito do tratamento intraplantar com MK-801 ou AP5 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com MK-801, AP5 (20 pmol) ou Veículo (água destilada), por via intraplantar, imediatamente antes da injeção das FLA2s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 28. Efeito do tratamento intraplantar com CNQX sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com CNQX (1 μ mol) ou Veículo (água destilada), por via i.pl. imediatamente antes da injeção das FLAs₂. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial.

Figura 29. Efeito do tratamento intratecal com AIDA ou MPEP sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10⁻¹), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com AIDA, MPEP (300 nmol) ou Veículo (DMSO+salina), por via intratecal, 20 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo.* p < 0,05 por comparação com a medida inicial e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 30. Efeito do tratamento intraplantar com AIDA ou MPEP sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com AIDA, MPEP (300 nmol) ou Veículo (DMSO+salina), por via i.pl., 20 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo.* $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial.

Figura 31. Efeito dos antagonistas de receptores para glutamato sobre a hiperalgesia induzida pelo glutamato. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas. Os animais foram tratados com Glutamato (agonista 30 nmol i.pl. e 0,1 mmol i.t.) ou salina imediatamente após a injeção da injeção de MK-801 (antagonista não-competitivo de receptor NMDA- i.pl., 20 pmol ou i.t., 4,59 mmol), AP-5 (antagonista competitivo de receptor NMDA- i.pl., 20 pmol ou i.t., 4,56 mmol), CNQX (antagonista de receptor não-NMDA- 1 μ mol), AIDA e MPEP (antagonista de receptor mGlu1 e mGlu5, respectivamente-300 nmol) ou Salina. Os resultados representam o limiar de dor 1 hora após a injeção do glutamato, que corresponde à resposta hipernociceptiva máxima, e estão expressos como a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina+Salina).

4.6. Efeito dos anticorpos anti-citocinas (anti-IL-1 e anti-TNF α)

O pré-tratamento com o anticorpo anti-IL-1 reduziu a hiperalgesia causada por ambas as fosfolipases (Fig. 32 A), enquanto que o anticorpo anti-TNF α diminuiu a resposta hiperalgésica induzida apenas pela FLA₂-Asp49 (Fig. 32 B). Com relação a resposta alodínica, somente o anticorpo anti-TNF α foi capaz de inibir parcialmente esta resposta (Fig. 32 C). Os antagonistas, *per se*, não alteraram o limiar de dor dos animais.

4.7. Efeito dos inibidores da óxido nítrico sintase

O pré-tratamento com o inibidor da óxido nítrico sintase neuronal, 7-NI reduziu a hiperalgesia causada pelas toxinas (Fig. 33 A,B), sem interferir com a resposta alodínica induzida pela FLA₂-Asp49 (Fig. 33 C). Por outro lado, o inibidor da óxido nítrico sintase induzida, L-NIL não foi capaz de interferir com o efeito nociceptivo de ambas as fosfolipases (Fig. 33). Os inibidores, *per se*, não alteraram o limiar de dor dos animais.

4.8. Efeito do inibidor da ciclooxigenase

A administração de Celecoxib, inibidor seletivo da ciclooxigenase-tipo 2, reduziu na 1ª hora, a hiperalgesia acarretada por ambas as fosfolipases A₂ (Fig. 34 A,B) e a alodinia acarretada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 34 C). O inibidor, *per se*, não alterou a sensibilidade dolorosa dos animais.

4.9. Efeito do antagonista de receptor A2 para adenosina

A administração de 3,7-dimetil-1-propargilxantina, antagonista de receptor A2 para adenosina, reduziu a hipernocicepção induzida por ambas as fosfolipases (Fig. 35), sem interferir com o efeito alodínico acarretado pela FLA₂-Asp49 (Fig. 35 C). O antagonista, *per se*, não alterou a sensibilidade dolorosa dos animais (Fig. 35).

Para avaliar a efetividade da dose utilizada para o antagonista de receptor A2, o agonista deste receptor, 2-fenilaminadenosina foi utilizado como controle positivo. Os valores apresentados na figura 36 correspondem ao pico da resposta hiperalgésica acarretada pelo agonista, observado na 1ª hora após a administração intratecal da droga. A administração prévia do antagonista 3,7-dimetil-1-propargilxantina bloqueou a resposta hiperalgésica induzida pelo agonista (Fig. 36).

A **Tabela IV** apresenta um quadro resumo dos resultados relacionados aos mediadores liberados na medula espinhal, envolvidos no efeito hipernociceptivo de ambas as FLA₂s.

Figura 32. Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-1 ou anti-TNF α sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com anticorpo anti-IL-1 (aIL-1, 10 μ g), anticorpo anti-TNF α (aTNF α , 1 μ g) ou Veículo (salina), por via intratecal, 15 ou 20 minutos antes da injeção das FLA₂s, respectivamente. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com os grupos FLA₂-Asp49+Veículo ou FLA₂-Asp49+Veículo.

Figura 33. Efeito do tratamento com 7-NI ou L-NIL sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com 7-NI, L-NIL (1,11 µmol) ou Veículo (água destilada), por via intratecal, 1 hora antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial e ** p < 0,05 por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 34. Efeito do tratamento com Celecoxib sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com Celecoxib (5,2 mmol) ou Veículo (DMSO+salina), por via intratecal, 10 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com os grupos FLA2-Asp49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 35. Efeito do tratamento com 3,7-dimetil-1-propargilxantina sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA₂) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com 3,7-dimetil-1-propargilxantina (3,7-dimetil, 242 nmol) ou Veículo (salina), por via intratecal, 15 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com os grupos FLA2-Asp49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 36. Efeito do tratamento com o antagonista de receptor para adenosina sobre a hiperalgesia induzida pelo agonista deste receptor. O limiar de dor foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas. Os animais foram tratados com antagonista de receptor A₂, 3,7-dimetil-1-propargilxantina (3,7-dimetil, 242 nmol) ou Salina foram administrado 10 minutos antes do agonista 2-fenilaminadenosina (10 nmol). Os resultados representam o limiar de dor 1 hora após a injeção dos agonistas, que corresponde à resposta hipernociceptiva máxima, e estão expressos como a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo 2-fenilaminadenosina+Salina.

Tabela IV - Quadro resumo do efeito dos diversos tratamentos farmacológicos envolvidos no efeito hiperalgésico e alodínico das fosfolipases A₂.

<i>Tratamentos</i>	<i>FLA₂-Lys49 Hiperalgesia</i>	<i>FLA₂-Asp49 Hiperalgesia</i>	<i>FLA₂-Asp49 Alodínia</i>
Rp-AMPC	—	—	—
Rp-GMPC	—	—	—
U73122	—	—	—
GF 109203X	—	—	—
Celecoxib	RP (48%)	RP (47%)	RP (67%)
Capsazepina (e.v.)	RP (41%)	RP (34%)	RP (68%)
3,7-dimetil	RP (34%)	RP (48%)	—
aIL-1	RP (59%)	RP (45%)	—
aTNFα	—	RP (35%)	RP (60%)
7-NI	RP (53%)	RP (74%)	—
L-NIL	—	—	—
GR82334	RP (60%)	RP (46%)	RT
GR94800	—	—	RP (72%)
CGRP-8-37	RP (53%)	RP (44%)	RP (35%)
MK-801	RT	RP (19%)	RT
AP-5	—	RP (56%)	—
CNQX	—	—	—
AIDA	—	RP (60%)	RP (24%)
MPEP	—	RP (48%)	RP (34%)
Fluorocitrato	RP (60%)	RP (45%)	RP (46%)

Os resultados representam os efeitos observados 1 hora após a injeção das fosfolipases A₂, variantes Lys49 (FLA₂-Lys49) ou Asp49 (FLA₂-Asp49) (10µg/pata). Doses, tempos e via de administração das drogas conforme descrito em Material e Métodos. RP - reversão parcial; RT - reversão total; — - sem efeito.

5. Participação das taquicininas e do glutamato liberados na medula espinhal, na manutenção da hiperalgesia acarretada pelas fosfolipases A₂

Uma vez demonstrada a participação de receptores NK₁ e NK₂ para taquicininas e de receptores ionotrópicos e metabotrópicos para glutamato, na gênese do efeito hipernociceptivo causado por ambas as fosfolipases A₂, foi nosso objetivo investigar também, a importância destes receptores para a manutenção deste fenômeno. Para tanto, os antagonistas de receptores para taquicicina e glutamato foram administrados, por via intratecal, 1 hora após a injeção i.pl. das toxinas.

5.1. Efeito dos antagonistas de receptores para taquicininas

A injeção intratecal do antagonista de receptor NK₁ inibiu parcialmente a hiperalgesia induzida pela FLA₂-Lys49 (Fig. 37 A). Este mesmo tratamento não interferiu com a hiperalgesia e alodinia induzida pela FLA₂-Asp49 (Fig. 37 B,C). Por outro lado, a injeção intratecal do antagonista de NK₂ não interferiu com as respostas de ambas as fosfolipases (Fig. 37). Os antagonistas não alteraram, *per se*, a sensibilidade dolorosa dos animais (Fig. 37).

5.2. Efeito do antagonista de CGRP

A administração de CGRP₈₋₃₇, antagonista competitivo de CGRP, 1 hora após a injeção das toxinas, não interferiu com a hiperalgesia ou alodinia induzidas por ambas fosfolipases A₂ (Fig. 38).

O antagonista, *per se*, não induziu alteração da sensibilidade dolorosa dos animais.

5.3. Efeito dos antagonistas de receptores ionotrópicos para glutamato

O AP5, quando administrado 1 hora após a injeção das toxinas, reduziu a resposta hiperalgésica induzida pela FLA₂-Lys49 (Fig. 39 A). Este mesmo tratamento diminuiu a hiperalgesia causada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 39 B), sem, contudo modificar a alodinia induzida por esta toxina (Fig. 39 C).

Por outro lado, o pós-tratamento com o MK-801 ou CNQX (Figs. 39 e 40) não interferiu com a evolução das respostas causadas por ambas FLA₂.

Os antagonistas não alteraram, *per se*, a sensibilidade dolorosa dos animais.

5.4. Efeito dos antagonistas de receptores metabotrópicos do grupo I para glutamato (subtipo 1 e subtipo 5)

O pós-tratamento com o antagonista de receptor mGlu1 (AIDA) ou mGlu5 (MPEP) para glutamato, não modificou a resposta hiperalgésica ou alodínica induzida por ambas as fosfolipases A₂ (Fig. 41).

A droga *per se* não alterou o limiar de dor dos animais.

Figura 37. Efeito do pós-tratamento com GR82334 ou GR94800 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com GR 84334, GR94800 (10 μ mol) ou Veículo (salina), por via intratecal, 1 hora ($\downarrow$) após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo.

Figura 38. Efeito do pós-tratamento com CGRP8-37 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com CGRP8-37 (20 nmol) ou Veículo (salina), por via intratecal, 1 hora (↓) após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo.* p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

Figura 39. Efeito do pós-tratamento com MK-801 ou AP5 sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com MK-801 (4,59 mmol) ou AP5 (4,56 mmol) ou Veículo (água destilada), por via intratecal, 1 hora ($\downarrow$) após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA2-Lys49+Veículo ou FLA2-Asp49+Veículo.

Figura 40. Efeito do pós-tratamento com CNQX sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA₂) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com CNQX (32,3 mmol) ou Veículo (água destilada), por via intratecal, 1 hora (↓) após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

Figura 41. Efeito do pós-tratamento com AIDA ou MPEP sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A₂ (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero), 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 µg/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com AINDA ou MPEP (300 nmol) ou Veículo (DMSO+salina), por via intratecal, 1 hora (↓) após a injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a medida inicial.

6. Envolvimento das células da glia da medula espinhal na hiperalgesia e alodinia causadas pelas fosfolipases A₂

6.1. Efeito do tratamento com fluorocitrato

O pré-tratamento com fluorocitrato, bloqueador metabólico das células da glia, quando administrado, por via i.t., 30 minutos antes das miotoxinas, foi capaz de inibir significativamente o efeito hiperalgésico de ambas as toxinas (Fig. 42 A,B) e a alodinia causada pela FLA₂-Asp49 (Fig. 42 C).

A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais.

6.2. Efeito das fosfolipases A₂ na expressão de marcadores de células gliais (astrócitos e microglia) na medula espinhal

Uma vez demonstrada a participação das células da glia, foi nosso objetivo também caracterizar que tipo de célula da glia (astrócitos e/ou microglia) estaria envolvido com a resposta hipernociceptiva induzida por ambas FLA₂s.

A injeção intraplantar das FLA₂s, variantes Asp-49 e Lys-49, acarretou ativação de astrócitos (GFAP) e microglia (OX-42) (Figs. 43 e 44), quando comparado aos animais controle (injetados com salina). Com relação a FLA₂-Asp49, foi possível observar ativação de astrócitos e microglia já a partir da 1ª hora após a injeção da toxina. Por outro lado, para a FLA₂-Lys49, esta ativação foi observada somente 8 horas após a injeção da toxina (Fig. 44). Estas diferenças podem também ser observadas no histograma apresentado na Figura 45. A comparação dos dados obtidos entre as duas FLA₂s indica que para a FLA₂-Asp49, a ativação dos astrócitos foi significativamente maior quando comparado à FLA₂-Lys49 (Fig. 45).

Figura 42. Efeito do tratamento com Fluorocitrato sobre a hiperalgesia e alodinia induzidas pelas fosfolipases A_2 (FLA2) variantes Lys49 (A) ou Asp49 (B,C). O limiar de dor, avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e expresso em gramas, e o limiar de resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de von Frey e expresso como Log (mg x 10), foram determinados antes (tempo zero) e 1 e 4 horas após a injeção intraplantar das toxinas (10 μ g/pata) ou Veículo (salina). Os animais foram tratados com Fluorocitrato (1 nmol) ou Veículo (salina), por via intratecal, 30 minutos antes da injeção das FLA₂s. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial e ** $p < 0,05$ por comparação com os grupos FLA₂-Asp49+Veículo ou FLA₂-Asp49+Veículo.

Figura 43. Aumento da expressão dos marcadores para microglia (OX-42) e astrócitos (GFAP), na medula espinhal, induzida pela injeção intraplantar das FLA₂ (10 µg/pata). Imagens digitais de cortes medulares capturados 1 hora após injeção das toxinas ou salina (controle). Escala: 25µm.

Figura 44. Aumento da expressão dos marcadores para microglia (OX-42) e astrócitos (GFAP), na medula espinhal, induzida pela injeção intraplantar das FLA₂ (10 µg/pata). Imagens digitais de cortes medulares capturados 8 horas após injeção das toxinas ou salina (controle). Escala: 25µm.

A

B

Figura 45. Quantificação da expressão de OX-42 (A) e GFAP (B) na medula espinhal de ratos injetados com fosfolipases A_2 variantes, Lys49 e Asp49. Os dados representam a média das diferenças percentuais entre controle (salina) e experimental (FLA2). * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle (Salina). ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo FLA₂-Lys49.

7. Análise histológica dos nervos do coxim plantar de ratos injetados com fosfolipases A₂ variantes Lys49 e Asp49

As análises histológicas do coxim plantar de ratos injetados com as FLA₂ não mostrou qualquer alteração dos nervos ciático e/ou safeno analisados por meio da coloração Luxol-Fast-Blue (específico para bainha de mielina). A bainha de mielina apresentou-se positiva e regular em todo o perímetro dos axônios (Fig 46). A fotomicrografia evidencia nervos cortados transversalmente, mostrando perineuro e epineuro sem infiltrado inflamatório. Podemos observar também, grande quantidade de mastócitos, principalmente íntegros, no tecido conjuntivo perineural. Estas mesmas características foram observadas nos animais injetados com salina (controle) (Fig. 46 C).

A)

B)

C)

Figura 46. Fotomicrografia de corte histológico do coxim plantar de rato, 1 hora após o tratamento com FLA2-Lys49 (A), FLA2-Asp49 (B) e salina (C). Evidenciam-se cortes transversais de feixes de axônios corados com Luxol-Fast-Blue (específico para mielina), mostrando perineuro e epineuro sem infiltrado inflamatório. (objetiva 20X).

5-DISCUSSÃO

As fosfolipases A₂ miotóxicas contribuem de modo marcante para o desenvolvimento de alguns dos efeitos locais presentes nos venenos de *Bothrops asper* (Bolaños, 1982). Foram isoladas deste veneno, quatro isoformas de miotoxinas, com estrutura de fosfolipases A₂: duas variantes Asp49, com atividade enzimática (miotoxinas I e III) e duas fosfolipases A₂, variantes Lys49, destituídas de atividade enzimática (miotoxinas II e IV).

A contribuição das toxinas com estrutura de fosfolipases A₂, para a gênese da dor observada nos envenenamentos por esta serpente, não está ainda totalmente caracterizada. Recentemente, observamos que as miotoxinas II (FLA₂-Lys49) e III (FLA₂-Asp49) induzem hiperalgesia (Chacur *et al.*, 2003). A atividade enzimática parece ser importante para a determinação da mediação química deste fenômeno. Esta mediação envolve, para ambas as FLA₂ a participação de bradicinina, atuando em receptores B₂, da histamina, serotonina e citocinas. Adicionalmente a estes mediadores, a hiperalgesia acarretada pela FLA₂-Lys49 é também modulada por prostanóides e aminas simpatomiméticas (Chacur *et al.*, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi ampliar os conhecimentos sobre a atividade nociceptiva das fosfolipases A₂ isoladas do veneno de *B. asper*, investigando se estas miotoxinas são capazes de induzir, além de hiperalgesia, o fenômeno de alodinia. Ainda, foram analisados presentemente os mecanismos estruturais, moleculares e centrais (medula espinhal) envolvidos com a gênese dos fenômenos hipernociceptivos.

Para a determinação da hiperalgesia, foi usado o teste de pressão da pata de ratos, baseado no método proposto por Randall & Selitto (1957). Este teste emprega um estímulo mecânico (pressão em gramas), aplicado sobre a pata dos animais. Este estímulo, de intensidade suficiente para induzir nocicepção, evoca resposta motora, traduzida pela retirada da pata. O limiar de dor é considerado como a força (em g) necessária para indução da retirada da pata. Para a investigação do fenômeno de alodinia, foram utilizados filamentos de von Frey aplicados à região plantar das patas posteriores dos animais, segundo modelo proposto por Chaplan *et al.* (1994), modificado por Milligan *et al.* (2000). O cálculo da intensidade do estímulo necessário para induzir 50% de resposta de retirada da pata foi determinado por meio da aplicação da função psicométrica

integral de Gauss, que torna os dados matemáticos contínuos, possibilitando a aplicação de análise estatística paramétrica.

Os dados apresentados nas Figuras 6 e 7 indicam que a administração intraplantar de ambas as fosfolipases A₂ acarreta hiperalgesia mecânica. A resposta máxima foi detectada na 1ª hora, decaindo a seguir. Por outro lado, somente a FLA₂-Asp49 induziu alodínia mecânica. A resposta alodínica máxima foi observada na primeira hora, persistindo pelo menos até a 6ª hora após a injeção da toxina. A comparação entre os fenômenos de hiperalgesia e alodinia causados por esta FLA₂ indica que a alodínia mecânica é mais intensa (86%) do que a hiperalgesia (53%), sugerindo que mecanismos distintos possam estar envolvidos na gênese e/ou desenvolvimento de ambos os fenômenos.

É importante salientar que a FLA₂-Asp49 acarretou alterações imediatas da sensibilidade dolorosa dos animais, uma vez que o fenômeno de alodinia se instalou rapidamente, atingindo o pico na primeira hora após a injeção da toxina. Este tipo de resposta foi também detectado para outros agentes químicos. Yamamoto e colaboradores (2001) observaram que a administração intraplantar de carragenina, em ratos, acarreta alodinia mecânica, com pico na 2ª hora, persistindo por até 4 horas. Ainda, You e colaboradores (2002) e Milligan e colaboradores (2000) mostraram que a administração subcutânea de veneno de abelha ou a administração intratecal de gp120, uma glicoproteína proveniente do vírus HIV, respectivamente, acarretam alodinia, com pico na 1ª hora.

Recentemente, nosso grupo padronizou um modelo de neurite inflamatória induzida em ratos, por estas FLA₂ miotóxicas. Nesse modelo, o nervo ciático é dissecado e recoberto com uma esponja gelatinosa acoplada a uma cânula de polietileno, por onde as toxinas são injetadas. Foi demonstrado que ambas as FLA₂s, quando injetadas ao redor do nervo, são capazes de induzir alodinia (Chacur *et al.*, 2004). Estes resultados diferem dos resultados ora obtidos, em que as toxinas são injetadas na pata, onde apenas a FLA₂-Asp49 acarretou alodinia. Estes dados sugerem que o padrão de instalação deste fenômeno está relacionado com ao local de contato das toxinas com a fibra nervosa aferente primária.

Uma vez que as FLA₂, variantes Asp49 ou Lys49, foram capazes de induzir fenômenos hipernociceptivos e que ambas possuem diferenças na atividade catalítica, investigamos presentemente, os mecanismos estruturais envolvidos na gênese destes fenômenos.

Os dados obtidos sugerem que a atividade hiperalgésica acarretada pela FLA₂ variante Lys49 é decorrente da presença de resíduos catiônicos/hidrofóbicos na região 115-129 da porção C-terminal da molécula. Esta indicação está baseada nos resultados mostrando que: (a) a heparina neutraliza parcialmente a hiperalgesia induzida por esta fosfolipase. A heparina é um membro da família dos glicosaminoglicanos e consiste de cadeias repetidas de polissacarídeos sulfatados covalentemente ligados a uma proteína. O alto grau de sulfatação confere à heparina cargas negativas, importantes na interação com proteínas catiônicas. As FLA₂s têm alta afinidade pela heparina, mediada pela presença de aminoácidos básicos na molécula destas enzimas (Murakami *et al.*, 1997, para revisão). Vários autores têm demonstrado que a heparina tem a capacidade de interagir *in vitro*, com vários tipos de FLA₂, interferindo com as ações destas enzimas (Dua & Cho, 1994; Lomonte *et al.*, 1994a; Lomonte *et al.*, 1994b; Landucci *et al.*, 1998). Adicionalmente, Lomonte e colaboradores (1994b) observaram que a heparina neutraliza a atividade citolítica da FLA₂-Lys49, por meio da interação com a região 115-129 da porção C-terminal da molécula; b) o peptídeo sintético correspondente à região 115-129 da FLA₂-Lys49 é capaz de causar hiperalgesia, embora de menor magnitude que a acarretada pela enzima nativa. Além disso, a substituição, no peptídeo sintético, de três resíduos de tirosina por triptofano, o que resulta no aumento do caráter anfifílico e hidrofóbico do peptídeo e no aumento de suas atividades lesivas (Lomonte *et al.*, 1999), acarretou incremento de seu efeito hipernociceptivo, alcançando níveis similares aos da proteína nativa. Apesar deste incremento na magnitude da resposta algogênica, esta modificação não favoreceu o desenvolvimento do fenômeno de alodinia para esta molécula. Estes resultados indicam que o sítio responsável pela atividade hipernociceptiva da FLA₂-Lys49 isolada do veneno de *B. asper*, corresponde à mesma região envolvida com os efeitos citolítico (Lomonte *et al.*, 1994b), edematogênico (Nunez *et al.*, 2001), bactericida (Paramo *et al.*, 1998) e miotóxico (Calderon & Lomonte, 1998; 1999) desta toxina ou da FLA₂-Lys49 isolada do veneno de serpentes *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Nunez *et al.*, 2001). Nunez e colaboradores (2001) propuseram que os mecanismos estruturais responsáveis pela ação das FLA₂s-Lys49 envolveriam a interação eletrostática dos resíduos catiônicos presentes na molécula destas enzimas, com grupamentos aniônicos de um sítio aceptor (ainda não identificado) na célula alvo, enquanto que os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, interagiriam e penetrariam a bicamada fosfolipídica da membrana celular, resultando na sua desestabilização.

Como assinalado na Introdução, por meio da técnica de mutagênese sítio dirigida, foi possível caracterizar na molécula da FLA₂-Lys49, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela gênese das atividades desta toxina (Ward *et al.*, 2001; Chioato *et al.*, 2002). Assim, pesquisadores do nosso laboratório, utilizando esta técnica, determinaram os sítios presentes na porção C-terminal da Bothropstoxina I, uma FLA₂-Lys49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, responsáveis pela atividade hiperalgésica da toxina (Zambelli, 2003). Avaliando a atividade da BTX-1 nativa e recombinante, foi observado que ambas as toxinas, quando injetadas por via i.pl., são capazes de induzir hiperalgesia (43 e 42%, respectivamente), alodínia (65 e 58%, respectivamente) e edema (46 e 44%, respectivamente), com pico na segunda hora, decaindo a seguir. Por outro lado, a mutação do resíduo Arg118 para Ala promoveu a perda da capacidade da molécula em induzir hipernociceção, além de reduzir em 50% a atividade edematogênica. A avaliação das atividades dos mutantes Lys115 Ala e Lys116 Ala mostraram que estas mutações acarretam diminuição da atividade hiperalgésica, mas não modificam a intensidade da resposta inflamatória (37%). Estes resultados indicam que o mesmo resíduo presente na porção C-terminal da FLA₂, responsável pelo efeito miotóxico, está envolvido também na gênese dos efeitos nociceptivo e inflamatório da molécula, enquanto que os resíduos responsáveis pela atividade citolítica parecem estar envolvidos apenas com a atividade hiperalgésica desta FLA₂ (Zambelli, 2003). Apesar destes resultados indicando que os resíduos envolvidos na atividade miotóxica estão também envolvidos no efeito hipernociceptivo da FLA₂-Lys49, não temos dados suficiente para sugerir se o efeito hipernociceptivo é consequência somente da atividade miotóxica destas FLA₂s.

Em relação à FLA₂-Asp49, os resultados presentemente obtidos, mostrando ausência de efeito nociceptivo para o peptídeo sintético correspondente à porção C-terminal desta molécula, indicam que os determinantes estruturais responsáveis pela nocicepção acarretada pela miotoxina III diferem, pelo menos em parte, dos mecanismos utilizados pela fosfolipase A₂ variante Lys49. Os resultados sugerem que a atividade catalítica contribui para a gênese da hiperalgesia e da alodinia as FLA₂-Asp49, uma vez que a alquilação da His-48 pelo *p*BPB aboliu as atividades enzimática e algogênica da toxina. Cabe ressaltar que, apesar da técnica de tratamento com o *p*BPB ser útil na investigação do papel da atividade catalítica para a gênese das atividades farmacológicas das fosfolipases A₂, a interpretação dos resultados deve ser ressalvada, uma vez que este tratamento, além de afetar o sítio catalítico, interfere com outras regiões da molécula, como mostrado em estudos de cristalografia (Renetseder *et al.*, 1985). Apesar dos nossos

resultados indicarem que a atividade catalítica da FLA₂-Asp49 é essencial para as ações nociceptivas da toxina, a demonstração de que a heparina reduz parcialmente o efeito hiperalgésico e alodínico desta enzima sugere que a natureza catiônica da molécula é também relevante para sua ação farmacológica. Cabe ressaltar que a heparina não é capaz de interferir com a atividade fosfolipásica da FLA₂-Asp49 (Lomonte *et al.*, 1994b). Ainda, os dados apresentados mostrando que a heparina reduziu em 40% a hiperalgesia e em apenas 28% a alodinia acarretada pela FLA₂-Asp49, associados aos dados de que esta toxina, mas não a FLA₂ variante Lys49, é capaz de induzir alodinia, podem indicar mais uma vez, a importância da presença da atividade enzimática para a gênese do fenômeno de alodinia.

Em relação aos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no efeito hipernociceptivo das FLA₂s, foi investigada, presentemente, a participação de canais de cálcio e de sódio, do AMPc, GMPc, da FLC e da PKC.

Alterações na concentração citoplásmica de íons cálcio é um processo essencial para a liberação de neurotransmissores e para a modulação da excitabilidade da membrana celular dos neurônios. O influxo de cálcio extracelular para o meio intracelular ocorre através de vários processos, dentre eles, pela abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC)(Prado, 2001). Em relação a estes canais, pelo menos 5 tipos principais são expressos em neurônios sensitivos; os canais de cálcio do tipo L (Cav1), P/Q (Cav2.1), N (Cav2.2), R (Cav2.3) e tipo T (Cav3) (Scroggs & Fox, 1992; Vanegas & Schaible, 2000, para revisão). A ativação destes canais na célula nervosa afeta vários processos celulares, incluindo ativação de outros canais, liberação de neurotransmissores, regulação de segundos e terceiros mensageiros, incluindo a ativação de várias enzimas, especialmente quinases e fosfatases e a expressão gênica. No presente estudo, a participação de canais de cálcio no efeito de ambas as fosfolipases A₂ foi investigada utilizando bloqueadores de canais de cálcio. Os resultados obtidos evidenciaram a participação de canais de cálcio do tipo Cav1, Cav2.1 e Cav2.2 na hiperalgesia acarretada pela FLA₂-Lys49, uma vez que os bloqueadores destes canais reverteram parcialmente a hiperalgesia induzida por esta toxina. Em relação ao efeito acarretado pela FLA₂-Asp49, apenas os canais do tipo Cav2.1 e Cav2.2 são importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia.

Os canais de cálcio tipo Cav1 encontram-se localizados principalmente nos corpos celulares e dendritos proximais dos neurônios. São ativados por alta voltagem e controlam as correntes de cálcio de longa duração. O papel destes canais na nocicepção associada à

lesão tecidual é controverso e está na dependência do modelo utilizado para indução de dor ou para avaliação da sensibilidade dolorosa e do tempo de ativação do canal de cálcio. Contudo, a maioria destes estudos tem indicado que os canais tipo Cav1 têm papel limitado na transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal (Sluka, 1998). Os canais do tipo Cav2.1 são encontrados nas terminações sinápticas e estão também envolvidos na liberação de neuropeptídeos como glutamato, dopamina, serotonina, GABA e provavelmente glicina (Vanegas & Schaible, 2000, para revisão). Os canais tipo Cav2.2 estão concentrados nas terminações nervosas pré-sinápticas, particularmente nas lâminas I e II da medula espinhal e têm papel importante na liberação de neurotransmissores evocada por despolarização e na modulação da informação nociceptiva. São canais ativados por alta voltagem e bloqueados seletivamente pela omega-conotoxina-GVIA (Vanegas & Schaible, 2000, para revisão).

Cabe ressaltar que as doses dos bloqueadores de canais de cálcio presentemente utilizadas estão baseadas em dados de literatura (Prado, 2001, para revisão), porém, deve-se levar em consideração que estes bloqueadores induzem efeitos colaterais como vasodilatação e alteração de pressão arterial, falência cardíaca e efeitos depressores no SNC, em decorrência de alterações na liberação de neurotransmissores. Nas nossas condições experimentais, os animais controles tratados apenas com os bloqueadores de canais de cálcio, não apresentaram alteração do limiar de dor, em relação à medida inicial, durante todo o período de observação. Estes dados são indicativos de que nas doses presentemente utilizadas, estes bloqueadores não estão induzindo alterações significativas de pressão arterial ou da atividade motora dos animais, ou que possíveis alterações nestes parâmetros não estão interferindo na resposta dos animais ao teste de pressão da pata.

A participação de canais de sódio foi também investigada, uma vez que estes canais estão envolvidos na resposta hipernociceptiva. As fibras sensoriais expressam canais de sódio voltagem-dependentes, sensíveis ou resistentes à tetrodotoxina (TTX) (Akopian *et al.*, 1996). Sabe-se que os canais de sódio dependentes de voltagem, resistentes à TTX, têm importante papel nas vias de transmissão de dor (Akopian *et al.*, 1996) e na gênese da dor crônica (Lai *et al.*, 2002). Nossos resultados indicam que os canais de sódio resistentes à TTX estão envolvidos no efeito hipernociceptivo induzidas por ambas fosfolipases A₂s, uma vez que a hiperalgesia foi reduzida pelo tratamento dos animais com a carbamazepina, droga bloqueadora deste tipo de canal.

Dados de literatura têm evidenciado que o aumento da concentração de cálcio intracelular pode ativar a fosfolipase C, acarretando aumento nos níveis de diacilglicerol, que juntamente com o aumento do cálcio, ativa a PKC, levando ao aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca^{2+} e Na^{+} (Millan, 1999; Julius & Basbaum, 2001). A proteinoquinase C pertence a uma superfamília com pelo menos 10 membros. As PKC convencionais, PKC- α , PKC- β_1 , PKC- β_{II} e PKC- γ são ativadas por fosfatidilserina, Ca^{2+} e DAG. As novas PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η e PKC- ϕ não requerem Ca^{2+} para serem ativadas e as PKC atípicas, PKC- ξ e PKC- λ requerem fosfatidilserina (Webb *et al.*, 2000; Robinson-White & Stratakis, 2002). Estudos demonstraram que a PKC, mais especificamente a PKC epsilon (PKC- ϵ) está envolvida na hiperalgesia induzida por carragenina ou adjuvante de Freund (Zhou *et al.*, 2003). Recentemente, Parada e colaboradores (2003b) demonstraram que a PKC- ϵ é essencial não só para o desenvolvimento da hiperalgesia, mas também para a manutenção da hiperalgesia induzida por carragenina.

Adicionalmente, a FLC, via aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, pode estimular indiretamente a atividade da adenilil ciclase e elevar os níveis intracelulares de AMPc (Dray & Urban, 1996). A estimulação de FLC pode também acarretar ativação da PKC, levando a fosforilação e ao aumento de canais iônicos permeáveis a cátions ou de receptores envolvidos na atividade das fibras aferentes primárias (Dray & Urban, 1996).

Com o intuito de avaliar a participação central e/ou periférica da FLC e PKC na gênese da dor acarretada pelas fosfolipases, foram realizados estudos utilizando inibidores de proteína quinase C e fosfolipase C. Estes inibidores não foram capazes de interferir com a resposta hiperalgésica induzida por ambas FLA₂s. Não temos até o momento dados que possam explicar a ausência da detecção da participação destes mecanismos intracelulares no efeito hipernociceptivo de ambas as toxinas. Cabe ressaltar que as doses utilizadas para os inibidores de PKC e FLC estão baseadas em estudos realizados com veneno de *Phoneutria nigriventer*, onde estes inibidores, nas mesmas doses, foram capazes de interferir com a hiperalgesia induzida por este veneno (Zanchet, 2003).

Os mediadores inflamatórios que agem em receptores acoplados à proteína-G sensibilizam os terminais periféricos primários causando diminuição do limiar de dor. A sinalização intracelular, após ativação destes receptores, pode envolver três vias do sistema de segundos-mensageiros: proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) ou quinase regulada por sinais extracelulares (ERKs). Diversos estudos têm demonstrado o papel das ERKs em processos dolorosos. Sammons e colaboradores (2000) demonstraram que a hiperalgesia térmica induzida por carragenina pode ser prevenida utilizando-se

inibidores de ERK. A injeção de formalina ou capsaicina induz fosforilação da ERK, levando à despolarização da membrana e influxo de cálcio (Ji *et al.*, 1999; Obata & Noguchi, 2004). Adicionalmente às alterações do influxo de cálcio, a ativação da ERK em neurônios nociceptivos após inflamação periférica ou axotomia, parece contribuir para a inflamação persistente e para a dor neuropática, via regulação da transcrição gênica (Obata & Noguchi, 2004, para revisão). A determinação do envolvimento das ERKs na gênese dos efeitos hipernociceptivos acarretado pelas FLA₂s miotóxicas é nosso objetivo futuro imediato.

A indução de hiperalgesia está baseada na teoria da “porta hiperalgésica”, ou seja, 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 PKA, fosforilação de canais iônicos, influxo de Ca²⁺, despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nervoso (England *et al.*, 1996). O aumento da concentração intracelular de AMPc regula diversas respostas biológicas por modular a atividade das enzimas proteinoquinases. Na maioria das células, o AMPc exerce seus efeitos por ativar a proteinoquinase dependente de AMPc (PKA) (Aley & Levine, 1999). Aley & Levine, (1999) demonstraram que a hipernocicepção induzida por PGE₂, serotonina ou adenosina é inibida pelo tratamento com inibidores de adenilil ciclase e revertida somente com inibidores de PKA, sugerindo que a manutenção da hiperalgesia envolve mecanismos distintos daquele necessário para iniciar o processo inflamatório.

Nas nossas condições experimentais não foi possível detectar o envolvimento das cascatas de segundos-mensageiros AMPc-PKA e GMPc-PKG na hiperalgesia induzida pelas fosfolipases A₂, uma vez que os inibidores destas proteinoquinases não modificaram este fenômeno. Cabe ressaltar que a especificidade e a eficiência das doses empregadas para estes antagonistas foram presentemente confirmados com a utilização de bradicinina. Estudos evidenciaram a participação de AMPc e GMPc na hiperalgesia mecânica induzida por esta cinina (Nakamura *et al.*, 1996).

Dando prosseguimento aos estudos sobre os mecanismos envolvidos no efeito algogênico de ambas fosfolipases A₂, caracterizamos os mediadores liberados na medula espinhal, importante sítio de interação na transmissão da informação nociceptiva da periferia ao SNC. Estes estudos foram realizados através da administração de inibidores, antagonistas ou anticorpos destes mediadores, por via intratecal.

A hiperalgesia e alodinia são mediadas, pelo menos em parte, por uma cascata de eventos comuns que ocorrem no corno dorsal da medula espinhal. Estes eventos incluem

a liberação de substância P, aminoácidos excitatórios, citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (Willis, 1993, para revisão). Diversos trabalhos têm evidenciado também a participação das células da glia na gênese da hiperalgesia e alodinia acarretadas por processos inflamatórios periféricos (Meller, 1994; Milligan *et al.*, 2000; Watkins & Maier, 2002).

Inicialmente, investigamos a participação de neuropeptídeos (taquicininas e CGRP), por meio da utilização de antagonistas específicos de receptores para estes peptídeos.

Existem três tipos de receptores para taquicininas descritos na literatura. O receptor NK₁ que se liga preferencialmente à substância P, o receptor NK₂ que se liga à neurocinina A e o receptor NK₃ que se liga à neurocinina B (Regoli *et al.*, 1994). Contudo, dependendo da concentração de taquicininas e da quantidade de receptores, os neuropeptídeos endógenos podem agir em todos os tipos de receptores. Os receptores NK₁ e NK₂ estão envolvidos nos efeitos pró-inflamatórios e hiperalgésicos das taquicininas, sendo os mais importantes na transmissão, na medula espinhal, da informação nociceptiva (Fleetwood-Walker *et al.*, 1988; Laneuville *et al.*, 1988; Fleetwood-Walker *et al.*, 1990; Dougherty *et al.*, 1994).

No presente estudo foram utilizados antagonistas de receptores NK₁ e NK₂, administrados por via intratecal. A especificidade e a eficiência das doses empregadas para estes antagonistas foram presentemente confirmados com a utilização de agonistas específicos para estes receptores.

Os resultados obtidos mostram que os receptores NK₁ presentes na medula espinhal estão envolvidos no efeito hiperalgésico acarretado por ambas as FLA₂S, uma vez que o antagonista destes receptores reverteu parcialmente as respostas hiperalgésicas causadas pelas toxinas. Cabe ressaltar que a inibição acarretada pelo antagonista de receptor NK₁, sobre a hipernocicepção induzida pela FLA₂-Asp49 foi detectada na 4ª hora após a administração da toxina, sugerindo que outros receptores e/ou neurotransmissores contribuam para o desenvolvimento da resposta hipernociceptiva nos estágios iniciais. Neste período, ocorreu reversão total do efeito alodínico desta miotoxina. Por outro lado, os receptores NK₂ não estão envolvidos na hiperalgesia causada pelas FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49. Contudo, é interessante notar que o antagonista deste receptor interferiu com a alodinia induzida pela FLA₂-Asp49. O antagonista de receptor NK₂ acarretou bloqueio do fenômeno de alodinia na 4ª hora após a administração da toxina. Estes dados indicam que, diferentemente do observado para a hiperalgesia,

ambos os receptores NK₁ e NK₂ têm papel relevante para a indução de alodinia pela FLA₂-Asp49. Estudos realizados por Ma & Woolf (1995) indicam que a ativação de fibras C cutâneas acarreta alodinia mecânica mediada, centralmente, por receptores NK₁, enquanto que a ativação de fibras C musculares induz alodinia mediada centralmente pela ativação de receptores NK₂. Nestes estudos foi empregada a bradicinina, injetada no músculo gastrônemico de ratos, como agente indutor de alodinia. Recentemente, Chacur *et al.* (2003) demonstraram que periféricamente, a bradicinina é um importante mediador da hiperalgesia causada por estas toxinas. Ainda, dados obtidos em nosso laboratório mostraram que o HOE 140, inibidor de receptores B₂ para bradicinina, administrado por via i.pl., reverte parcialmente a alodinia induzida pela FLA₂-Asp49 (dados não mostrados), indicando que a BK é um mediador importante no efeito alodínico induzido por esta toxina. É importante salientar que as FLA₂s presentemente utilizadas são toxinas com atividade miotóxica. Análises histológicas das patas dos ratos injetados com estas toxinas evidenciaram a presença de lesão muscular, mais intensa para a FLA₂ variante Asp49 (Chacur *et al.*, 2003). Apesar dos dados de literatura mostrando que a bradicinina, quando administrada por via intramuscular, é capaz de induzir alodinia mediada centralmente por receptores NK₂, e dos nossos dados indicando que a BK é um mediador importante da alodinia causada pela FLA₂-Asp49, não temos até o momento, evidências para indicar uma possível correlação entre a presença local de BK e a ativação central de receptores NK₂.

Em continuidade aos estudos que visam investigar a participação de neuropeptídeos no efeito algogênico das toxinas, foi avaliado também a importância dos receptores NK₁ e NK₂ para a manutenção da hiperalgesia e alodinia acarretadas pelas FLA₂s, uma vez estabelecidos estes fenômenos. Para tanto, estes antagonistas foram administrados, por via intratecal, 1 hora após a injeção i.pl. das miotoxinas. Os resultados obtidos mostram que a atividade dos receptores NK₁ é importante para a manutenção da hipernocicepção causada apenas pela FLA₂-Lys49. Estes dados sugerem que mecanismos adicionais estão envolvidos na manutenção dos efeitos nociceptivos causados pela FLA₂ variante Asp49. Resultados semelhantes foram observados por Traub (1996), o qual mostrou que na hiperalgesia acarretada por carragenina, a substância P espinhal contribui apenas para a geração da hiperalgesia, mas uma vez estabelecido o efeito nociceptivo, a contribuição deste neurotransmissor para a manutenção do fenômeno é pequena. Em relação aos receptores NK₂, não foi possível evidenciar a sua importância para a manutenção dos fenômenos nociceptivos induzidos por ambas as FLA₂s.

Adicionalmente ao efeito central, as taquicininas, particularmente a SP, quando liberadas nas terminações periféricas dos neurônios aferentes primários, podem acarretar efeitos nociceptivos, via ativação de receptores específicos presentes nestas terminações (Carlton *et al.*, 1996; 1998). Desta forma, foi nosso objetivo também, investigar a possível ação periférica das taquicininas no efeito das miotoxinas, através da utilização dos antagonistas de receptores NK₁ e NK₂ administrados por via intraplantar. Neste caso, nenhum dos antagonistas de receptores para taquicininas foi capaz de interferir com a hiperalgesia causada pelas toxinas. Para confirmar a efetividade das doses empregadas, foram utilizadas agonistas de receptor NK₁ e NK₂ como controles positivo.

Além da avaliação da participação das taquicininas no efeito hipernociceptivo das FLA₂S, foi também investigado o papel do CGRP neste fenômeno. O CGRP tem função neurotransmissora e neuromoduladora quando liberado pelas fibras nervosas sensitivas no corno dorsal da medula espinhal, facilitando a transmissão da informação nociceptiva (Ju *et al.*, 1987; Seybold *et al.*, 1995; Seybold *et al.*, 2003). Este peptídeo pode ser liberado por estímulos mecânicos de alta intensidade, bem como pela injeção periférica de agentes irritantes (Garry & Hargreaves, 1992; Hanesch & Schaible, 1995). O CGRP está frequentemente colocalizado com outros neurotransmissores, particularmente substância P (Ju *et al.*, 1987), fato que favorece a existência de um sistema de sinalização integrada.

Para o estudo da participação do CGRP, foi empregado o peptídeo correspondente aos resíduos 8-37 da porção C-terminal deste peptídeo (CGRP₈₋₃₇), que age como um antagonista competitivo dos receptores para CGRP (Chiba *et al.*, 1989; Gardiner *et al.*, 1990; Han *et al.*, 1990). A administração intratecal deste antagonista acarretou reversão parcial da hiperalgesia e alodinia causadas pelas miotoxinas, indicando a participação deste peptídeo nestes fenômenos. Apesar da importância deste peptídeo para a geração dos efeitos hipernociceptivos das FLA₂S, não foi possível observar a sua contribuição para a manutenção deste fenômeno, uma vez que o CGRP₈₋₃₇ quando injetado 1 hora após as toxinas não alterou as respostas hiperalgésicas e alodínicas causadas pelas toxinas.

Dando prosseguimento a estes estudos, avaliamos também a participação periférica do CGRP no efeito algogênico das FLA₂S. Os resultados obtidos indicam que, periféricamente, este mediador participa apenas da hipernocicepção induzida pela FLA₂-Asp49. Esta distinção da mediação química envolvida no efeito nociceptivo acarretado pelas FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49 indica, mais uma vez, a importância da presença da atividade enzimática para a determinação dos mecanismos responsáveis pela gênese

deste fenômeno. Estes resultados suportam os dados da literatura que demonstram a contribuição periférica do CGRP em modelos experimentais de dor (Jang *et al.*, 2004).

Um dos mecanismos responsáveis pela estimulação das fibras nervosas aferentes sensitivas, com liberação de neuropeptídeos das terminações nervosas, ocorre via ativação de receptores vanilóides (VRs) expressos nestes neurônios (Szallasi & Blumberg, 1999). O receptor vanilóide é um receptor acoplado a canal iônico permeável ao Ca^{2+} e Na^+ , cuja ativação ou sensibilização pode ocorrer via mediadores inflamatórios como PGs, 5-HT e BK. A abertura destes canais acarreta influxo de cálcio e geração do potencial de ação (Kuenzi & Dale, 1996; Szallasi & Blumberg, 1999; Davis *et al.*, 2000). Estudos realizados por Karai e colaboradores (2004) demonstram que a administração de antagonista de receptor VR1 inibe a hiperalgesia inflamatória e neurogênica em ratos, bem como a dor induzida por artrite em cães.

A avaliação da participação de receptores vanilóides no efeito hipernociceptivo das fosfolipases A_2 foi realizada através da administração, por via endovenosa, de capsazepina, um antagonista competitivo destes receptores (Bevan *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2003). Nossos resultados indicam a participação dos receptores VR1 na hiperalgesia acarretada por ambas as toxinas, uma vez que a capsazepina reverteu parcialmente este efeito. Dados recentes têm evidenciado que a bradicinina, via geração de leucotrieno B₄ e dos ácidos 12- e 15- (S)-hidroperoxieicosatetraenóico e 5- e 15- (S)-hidroxieicosatetraenóico, seria um mediador endógeno da ativação de receptores VR-1 (Hwang *et al.*, 2000). Uma vez que a bradicinina é um mediador importante da hiperalgesia causada por estas FLA₂ miotóxicas isoladas do veneno de *Bothrops asper* (Chacur *et al.*, 2003), a contribuição desta cinina para a ativação dos receptores vanilóides deve ser presentemente considerada. Contudo, vale ressaltar que não foi detectada a participação de leucotrienos (LTB₄) no efeito hipernociceptivo induzido por estas FLA₂s (Chacur *et al.*, 2003).

Cabe lembrar que os receptores vanilóides podem ser ativados por estímulos térmicos ($>47^\circ\text{C}$) e soluções ácidas ($\text{pH}<5,0$) (Bevan, 1999, para revisão). No entanto, a estimulação vanilóide observada no presente trabalho não pode ser atribuída a uma possível acidez da solução das miotoxinas injetadas na pata, uma vez que o pH desta solução estava em torno de 6,2. Para confirmar esta sugestão, os ratos foram presentemente tratados com salução salina, pH 6,2. Este tratamento não alterou a sensibilidade dolorosa dos animais (dados não mostrados). Deve-se ressaltar que Chacur e colaboradores (2003), mostraram, por meio de análise histológica das patas dos

animais injetados com ambas as fosfolipases, a presença de edema, infiltrado inflamatório e mionecrose, fato que pode acarretar alteração do pH local e ativação dos receptores vanilóides.

Os dados apresentados até o momento indicam que a transmissão da informação nociceptiva gerada pela administração periférica das fosfolipases A₂ envolve a ativação de receptores vanilóides e a liberação, na medula espinhal, de neuropeptídeos. Dando prosseguimento a estes estudos, avaliamos a participação de aminoácidos excitatórios no efeito algogênico das FLA₂s.

Vários trabalhos têm mostrado a contribuição de aminoácidos excitatórios, através da interação com receptores específicos na medula espinhal, para a transmissão da informação nociceptiva e para o fenômeno de sensibilização central (Coderre & Melzack, 1992; Okano *et al.*, 1998; Woolf & Costigan, 1999; Yaksh, 1999). No presente estudo, avaliamos a participação de receptores ionotrópicos (NMDA e não-NMDA) e metabotrópicos (mGlu1 e mGlu5) para glutamato no efeito algogênico de ambas as fosfolipases A₂. Para a avaliação da participação de receptores ionotrópicos utilizamos CNQX, um antagonista de receptores não-NMDA e do MK801 ou AP5, antagonistas não-competitivo e competitivo, respectivamente, do receptor NMDA. Para a determinação do envolvimento de receptores metabotrópicos do tipo 1 e 5, foi empregado AIDA e MPEP, antagonistas de receptor mGlu1 e mGlu5, respectivamente, administrados por via intratecal, previamente à injeção intraplantar das toxinas.

Nas nossas condições experimentais, os animais controles tratados apenas com os antagonistas de receptores para glutamato, não apresentaram alteração do limiar de dor, em relação à medida inicial, durante todo o período de observação, indicando que nas doses presentemente utilizadas, estes antagonistas não estão interferindo com a atividade motora dos animais ou que possíveis alterações nesta atividade não está interferindo com a resposta dos animais ao teste de pressão da pata.

Os resultados obtidos indicam a participação dos receptores NMDA na gênese da hiperalgesia e alodinia acarretada pelas FLA₂s. Estes resultados corroboram com dados na literatura demonstrando a importância de receptores NMDA para gênese destes fenômenos (Hao & Xu, 1996; You *et al.*, 2002; Zanchet *et al.*, 2004).

Cabe ressaltar ainda, que o MK801, antagonista não-competitivo do receptor NMDA, foi capaz de bloquear a hiperalgesia acarretada pelas FLA₂s, enquanto o AP5, antagonista competitivo deste receptor, não modificou este fenômeno. Ainda, o MK801 reverteu a alodinia induzida pela FLA₂-Asp49, enquanto o AP5 não interferiu com este

fenômeno. Como o AP5 é um antagonista competitivo do receptor NMDA, a dose ora empregada, apesar de ser efetiva em reverter a hiperalgesia causada pelo glutamato, utilizado como controle positivo, poderia não ser suficiente para interferir com os fenômenos algogênicos acarretados pelas miotoxinas. Apesar dos mecanismos envolvidos nestes resultados contraditórios não estarem determinados, dados de literatura têm mostrado dualidade na ação de antagonistas competitivos e não competitivos do receptor NMDA, particularmente em relação àqueles que agem no sítio fenciclidina do receptor, como é o caso do MK801 (Nehls *et al.*, 1988; Nasstrom *et al.*, 1992; Nishihara *et al.*, 1995). Nishihara *et al.* (1995), estudando o envolvimento de receptores NMDA na hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂, observaram diferenças na ação do AP5 e do MK801, dependendo da dose de PGE₂ utilizada. Recentemente, Cunha (2004) demonstrou que o AP-5, mas não o MK-801 é capaz de inibir a hipernocicepção persistente induzida pela administração e.v. de estreptozotocina, um agente indutor de diabetes mellitus.

Com relação aos receptores metabotrópicos, foi possível observar que centralmente, ambos os receptores mGlu1 e mGlu5 estão envolvidos no efeito hipernociceptivo e alodínico induzido pela FLA₂-Asp49. Por outro lado, estes receptores não parecem desempenhar papel significativo na resposta hipernociceptiva induzida pela FLA₂-Lys49, uma vez que estes antagonistas não foram capazes de interferir com este efeito. Estes resultados indicam novamente que a presença da atividade catalítica na molécula de FLA₂ é importante para a determinação do tipo de mediador envolvido neste efeito. Apesar de não termos ainda evidências experimentais, é possível sugerir que a ativação dos receptores metabotrópicos pode ter contribuído para a gênese do fenômeno de alodinia induzida pela FLA₂-Asp49. Dados de literatura têm mostrado que receptores metabotrópicos do grupo I possuem papel importante no desenvolvimento da alodinia mecânica induzida por injúria espinal (Mills *et al.*, 2000) ou associada a injúria nervosa ou tecidual (Jones & Headley, 1995; Fisher & Coderre, 1998).

Vários estudos têm identificado a presença de receptores metabotrópicos para glutamato nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal (Jia *et al.*, 1999) e evidenciado a sua importância no processamento nociceptivo e sensibilização central (Fisher & Coderre, 1996; 1998; Jia *et al.*, 1999). A ativação dos receptores metabotrópicos do grupo I pode acarretar aumento da concentração de cálcio intracelular (Fagni *et al.*, 2000), a estimulação da liberação de neurotransmissores (Moroni *et al.*, 1998), além facilitar o comportamento nociceptivo mediado por receptores ionotrópicos (Fisher & Coderre, 1996). A interação, na medula espinal, entre receptores ionotrópicos

e metabotrópicos para glutamato tem sido proposta (Bleakman *et al.*, 1992; Jones & Headley, 1995). Desta forma, a contribuição desta interação para o fenômeno de sensibilização central causada pela injeção de ambas fosfolipases deve ser presentemente considerada.

Os dados ora obtidos indicando que ambos os tipos de receptores ionotrópico e metabotrópico para glutamato, são importantes para a gênese do efeito hipernociceptivo da FLA₂-Asp49 diferem de dados da literatura mostrando ação preponderante para os receptores NMDA na hiperalgesia induzida por agentes químicos, como prostaglandina e carragenina (Ren *et al.*, 1992; Ferreira & Lorenzetti, 1994; 1995). Diferenças nas metodologias empregadas nestes estudos podem ter contribuído para a obtenção de resultados distintos, uma vez que estes autores administraram os antagonistas destes receptores em diferentes tempos após a injeção dos agentes lesivos, quando a hiperalgesia já estava estabelecida. Neste sentido, os resultados presentemente obtidos, em que os antagonistas de receptores ionotrópicos, NMDA e não-NMDA, e metabotrópicos, mGlu1 e mGlu5, foram administrados, por via intratecal, 1 hora após as toxinas, indicam que apenas o receptor NMDA está envolvido na manutenção da hiperalgesia acarretada pelas FLA₂s, corroborando com os dados de literatura. Estudos recentes sobre os mecanismos envolvidos no efeito nociceptivo do veneno de abelha, mostraram também a importância de receptores NMDA para a indução e manutenção da hiperalgesia induzida por este veneno (You *et al.*, 2002). Com relação a alodinia causada pela FLA₂-Asp49, nenhum dos tratamentos com antagonistas de receptores para glutamato interferiu com a manutenção deste fenômeno, indicando que esta alodinia, uma vez estabelecida, é de difícil controle.

Além de mediador central, tem sido evidenciada também, ação algogênica periférica para o glutamato. Esta ação periférica é dependente da ativação pelo glutamato, de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, presentes nas terminações periféricas das fibras nervosas aferentes primárias (Hollmann & Heinemann, 1994; Jackson *et al.*, 1995; Davidson *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2001a; Walker *et al.*, 2001b). Desta forma, investigamos presentemente, a possível ação periférica do glutamato na resposta hipernociceptiva induzida por ambas toxinas. Os dados mostraram que apenas a FLA₂-Asp49 é capaz de estimular direta ou indiretamente os receptores periféricos do tipo NMDA. A diferença detectada entre a ação das FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49 indica mais uma vez a importância da atividade enzimática para a determinação dos mecanismos responsáveis pela gênese do efeito nociceptivo induzido pelas toxinas.

Como demonstrado presentemente, a ativação periférica de receptores para CGRP e de receptores NMDA contribui para o efeito hipernociceptivo causado apenas pela FLA₂-Asp49. Apesar de não termos ainda dados experimentais, a contribuição da ativação periférica destes receptores para a gênese do fenômeno de alodinia observado apenas para a fosfolipase A₂ variante Asp49 deve ser presentemente considerado.

A ativação do receptor NMDA produz grande influxo de íons cálcio. Este aumento intracelular de cálcio promove a ativação do óxido nítrico sintase (NOS), levando à formação de NO, que como neurotransmissor retrógrado, acarreta a liberação de neurotransmissores excitatórios pelas terminações nervosas aferentes (Teixeira & Figueiró, 2003). O óxido nítrico liberado na medula espinhal, tem sido implicado nos mecanismos centrais envolvidos na gênese da hipernocicepção inflamatória (Handy & Moore, 1998; Osborne &Coderre, 1999). Assim, em continuidade aos estudos dos mecanismos centrais envolvidos no efeito algogênico das FLA₂, foi investigada a participação do óxido nítrico neste efeito. Para tanto, foram empregados inibidores da óxido nítrico sintase neuronal e induzida.

Existem três tipos de isoformas de NOS. Duas delas são expressas constitutivamente (neuronal e endotelial), sendo classificadas como NOS constitutivas (cNOS). A terceira isoforma é classificada como induzida (iNOS) (Moncada *et al.*, 1991). A cNOS é Ca⁺⁺/calmodulina dependente e está presente no endotélio, em plaquetas e no SNC. O estímulo para formação do NO não resulta na síntese da enzima, mas causa alterações intracelulares, levando ao aumento do influxo de Ca²⁺, que se liga à calmodulina, ativando a NOS. A iNOS é Ca⁺⁺/calmodulina independente, sendo necessária a síntese protéica da enzima, o que acarreta um período maior para sua atividade (Moncada *et al.*, 1991; Snyder & Dawson, 1995). Nossos resultados demonstram que o óxido nítrico, gerado pela atividade da NOS neuronal, mas não da induzida, está envolvido na resposta hiperalgésica causada por ambas as fosfolipases A₂. Por outro lado, o NO não parece estar envolvido no fenômeno de alodinia causada pela FLA₂-Asp49, uma vez que estes inibidores não foram capazes de interferir com este fenômeno. Nossos dados diferem de outros trabalhos realizados pelo nosso grupo que demonstram a participação do NO no fenômeno de alodinia induzido pelas FLA₂s injetadas ao redor do nervo ciático (Chacur *et al.*, 2004). Mais uma vez, a diferença no local de contato destas toxinas com os tecidos ou nervos pode estar ocasionando a diferença na mediação observada. Ainda, trabalhos realizados por Holguin e colaboradores (2002) demonstraram

que a injeção i.t. de inibidor da NOS abole a alodinia induzida por gp-120, uma glicoproteína do vírus HIV-1.

É importante lembrar que o aumento dos níveis de cálcio intracelular acarreta também a ativação de fosfolipases A_2 citosólicas, com conseqüente liberação de ácido araquidônico e formação de eicosanóides (Bazan *et al.*, 1995). A enzima ciclooxigenase (COX) catalisa a síntese de prostanóides a partir do ácido araquidônico gerado pela ação da FLA_2 . Existem várias isoformas de COX, dentre elas, a COX-1, constitutiva e a COX-2, induzida, as quais estão envolvidas na geração de prostanóides. Na medula espinhal, a COX-2 é constitutiva, estando presente em regiões associadas ao processamento do estímulo nociceptivo, como nas lâminas I e II (Beiche *et al.*, 1996; Willingale *et al.*, 1997). Presentemente, avaliamos a participação central dos prostanóides no efeito nociceptivo das fosfolipases através da utilização de celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2, administrado por via intratecal. Os resultados obtidos indicam o envolvimento de prostanóides, na medula espinhal, para o efeito hipernociceptivo induzido por ambas as FLA_2 s e na alodinia induzida pela FLA_2 variante Asp49.

A importância da atividade da COX-2 em processos hipernociceptivos tem sido determinada. Inibidores de COX-2, mas não de COX-1, bloqueiam a hiperalgesia induzida pela administração periférica de carragenina (Svensson & Yaksh, 2002), ou pela injeção I.T. de NMDA, AMPA (Yamamoto & Sakashita, 1998), SP ou glutamato (Malmberg & Yaksh, 1992). Além disso, estudos têm evidenciado aumento na expressão de RNA mensageiro para COX-2 após inflamação periférica (Beiche *et al.*, 1996; Hay & De Belleruche, 1997).

Dando continuidade a estes estudos, investigamos a participação de citocinas, liberadas centralmente, no efeito hipernociceptivo de ambas toxinas. Vários estudos têm mostrado que, na medula espinhal, várias citocinas estão envolvidas na dor induzida por inflamação periférica, na dor neuropática ou processos imunes espinhais (Arruda *et al.*, 2000; Milligan *et al.*, 2001). Presentemente, a contribuição das citocinas hiperalgênicas para a indução da hiperalgesia acarretada pelas fosfolipases A_2 variante Asp49 foi evidenciada pelos resultados mostrando que os anticorpos anti-TNF α ou anti-IL1 inibem o efeito acarretado pela FLA_2 -Asp49. Por outro lado, somente a IL-1 está envolvida com a hipernocicepção induzida pela FLA_2 -Lys49. Cabe ressaltar que o envolvimento da IL-1 foi detectado somente na primeira hora após a injeção das toxinas, sugerindo que estes mediadores são importantes para a fase inicial do processo. Com relação à resposta alodínica, somente o anticorpo anti-TNF α foi capaz de interferir com este fenômeno. Estes

dados diferem daqueles observados quando ambas toxinas são injetadas ao redor do nervo ciático. Neste caso, o anticorpo anti-IL-1 foi capaz de interferir com a alodinia induzida por ambas toxinas. Mais uma vez, o padrão de instalação deste fenômeno está relacionado com o local de injeção das toxinas.

Vários dados da literatura têm mostrado que a interleucina 1β e o $TNF\alpha$ estimulam a expressão da COX-2, com aumento na produção de PGE_2 em células neuronais (Serou *et al.*, 1999; Samad *et al.*, 2001). Apesar dos resultados presentemente obtidos indicarem a participação de prostanóides, geradas pela ação de COX-2 na hiperalgesia acarretada pelas fosfolipases A_2 , não temos ainda dados para sugerir que a síntese destes mediadores seja consequência apenas da ação das citocinas.

Presentemente, foi também avaliada a possível participação da adenosina, na medula espinhal, para a gênese dos fenômenos hipernociceptivos acarretados pelas toxinas. A adenosina é uma purina capaz de causar tanto dor quanto analgesia, dependendo do local de ação e do subtipo de receptor ativado. Esta purina atua em receptores purinérgicos P_1 , que são receptores ligados à proteína G, os quais foram subdivididos nos subtipos A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Aird, 2002). O efeito hipernociceptivo da adenosina é mediado por receptores A_2 e A_3 que ativam células inflamatórias localizada na periferia e/ou nas células da glia do SNC (Taiwo & Levine, 1990; Aird, 2002; Sawynok & Liu, 2003). Nossos resultados sugerem que centralmente, a adenosina, via ativação de receptores A_2 , participa, pelo menos parcialmente, da resposta hipernociceptiva induzida pelas FLA $_2$ S, uma vez que o antagonista deste receptor reduziu este efeito.

Dados recentes têm evidenciado que as células da glia (astrócitos e microglia), além da participação em processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos algogênicos (Watkins & Maier, 2003, para revisão). A microglia e os astrócitos respondem e liberam quantidades elevadas de vários mediadores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva, incluindo, citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, aminoácido excitatório e quimiocinas (Hartung *et al.*, 1988; Marriott *et al.*, 1991). Baseados nestes dados, investigamos se a glia da medula espinhal participaria do efeito algogênico das FLA $_2$ -Lys49 e FLA $_2$ -Asp49. Para tanto, foi utilizado o fluorocitrato, uma droga capaz de bloquear a função da glia, por inibir o ciclo de Krebs. A especificidade do fluorocitrato pelas células da glia decorre de sua ação sobre a aconitase, uma enzima usada para produção de energia pelas células da glia, mas não por neurônios (Hassel *et al.*, 1992). A dose presentemente empregada para o fluorocitrato está baseada em dados de literatura mostrando a sua seletividade pelas células da glia (Hassel *et al.*, 1992; Berg-

Johnsen *et al.*, 1993; Milligan *et al.*, 2000). Os dados ora obtidos sugerem que as células da glia da medula espinhal têm papel relevante para o efeito algogênico acarretado por ambas as fosfolipases A₂, uma vez que o fluorocitrato foi capaz de inibir a hiperalgesia e alodinia causadas pelas mesmas.

Uma vez detectada a participação das células da glia, foi investigado qual o tipo de célula é ativado por estas toxinas, utilizando marcadores celulares específicos para cada tipo de célula (GFAP para astrócitos e OX-42 para microglia). Estes ensaios foram realizados, em parte, no Laboratório de Neurociências da Universidade do Colorado em Boulder, EUA, sob a supervisão da Dra. Linda R. Watkins e em parte no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédica-ICB, da Universidade de São Paulo, USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz R.G. Britto. Os resultados obtidos indicam que ambas as células da glia (astrócitos e microglia) são ativadas pelas toxinas, uma vez que a marcação destas células está aumentada após a administração intraplantar das FLA₂s. Foi observada diferença na cinética da ativação destas células, para as duas FLA₂s, uma vez que a FLA₂-Asp49 foi capaz de ativar marcadores para astrócitos e microglia, 1 hora após a sua injeção, enquanto que a FLA₂ variante Lys49 somente induziu alterações significativas 8 horas após sua injeção. A rápida ativação das células da glia pela FLA₂-Asp49 está de acordo com os dados obtidos por Sweitzer *et al.*, (1999), que demonstrou que a administração de zimosam ou formalina, por via i.pl., é capaz de induzir ativação de astrócitos e microglia, 1 hora após a indução do processo inflamatório.

Cabe mencionar que foi detectado maior intensidade de marcação para astrócitos, após a injeção intraplantar da FLA₂-Asp49, quando comparado aos animais tratados com a FLA₂-Lys49. Não existem até o momento dados na literatura mostrando a importância dos astrócitos especificamente para a gênese do fenômeno de alodinia. Contudo, uma vez que a glia tem papel preponderante para a liberação de mediadores envolvidos em fenômenos de sensibilização, é possível sugerir que a ativação de astrócitos acarretada pela FLA₂-Asp49 possa estar contribuindo para a indução do fenômeno de alodinia apenas para esta FLA₂.

Os resultados ora obtidos corroboram com dados recentes demonstrando que ambas as fosfolipases, quando injetadas ao redor do nervo ciático, são capazes de ativar células da glia. Esta ativação parece ser resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal (Chacur *et al.*, 2004).

Foi presentemente investigado também se as FLA₂-Lys49 e FLA₂-Asp49 são capazes de induzir alterações histopatológicas da fibra nervosa, as quais pudessem

acarretar efeitos nociceptivos. Cabe ressaltar que Mukherjee e colaboradores (1994, para revisão) observaram que fosfolipases A₂ induzem dor como consequência à injúria neural. Essa injúria envolve modificações na bainha de mielina, degeneração vacuolar, redistribuição dos canais de sódio e hipersensibilidade neuronal (Mukherjee *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997). Nossos resultados indicam que as alterações comportamentais induzidas por ambas toxinas não parece ser devido à lesão nervosa, uma vez que análises histológicas, utilizando coloração específica para bainha de mielina, não mostram qualquer ativação morfológica dos nervos das patas.

Vários estudos têm evidenciado que fosfolipases A₂ humanas, particularmente as pancreáticas (FLA₂-IB) e sinoviais (FLA₂-IIA), possuem papel importante na gênese e desenvolvimento de diversos processos inflamatórios (Nevalainen *et al.*, 2000, para revisão). Além disso, as FLA₂s e a enzima ciclooxigenase-2 são expressas na medula espinhal e podem estar envolvidas na facilitação da dor induzida por injúria periférica ou inflamação, em estados de hipernocicepção observados em determinadas patologias, como hérnia de disco ou na dor gerada pela ativação de receptores para glutamato e SP (Saal *et al.*, 1990; Franson *et al.*, 1992; Gronblad *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Piperno *et al.*, 1997; Ozaktay *et al.*, 1998). Baseados nos dados sobre os mecanismos envolvidos na atividade nociceptiva das FLA₂ miotóxicas (grupo IIA) isoladas do veneno de *Bothrops* e uma vez que as FLA₂s de venenos da família Viperidae e aquelas isoladas do fluido sinovial humano estão intimamente relacionadas, apresentando sequência homóloga e mecanismos comuns quanto a atividade enzimática (Six & Dennis, 2000, para revisão), podemos sugerir que as FLA₂ miotóxicas são ferramentas importantes para estudos da fisiopatologia da dor, bem como para o desenvolvimento de novas drogas com atividade analgésica.

*

*

*

Os dados apresentados até o momento indicam que as fosfolipases A₂ (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper* (miotoxinas II e III, respectivamente), independente da presença da atividade enzimática, acarretam efeito hipernociceptivo.

Os mecanismos estruturais responsáveis por este efeito envolvem, para a FLA₂-Asp49, a presença da atividade catalítica, enquanto que para a FLA₂-Lys49, os resíduos catiônicos e hidrofóbicos presentes na posição 115-129 da porção C-terminal da molécula têm papel fundamental para a gênese da nocicepção. A presença da atividade enzimática parece ser importante para a determinação da intensidade do fenômeno nociceptivo elicitado.

A determinação dos mecanismos moleculares indicam que os canais de cálcio têm papel relevante para a ação hipernociceptiva de ambas as fosfolipases, contudo, a presença da atividade catalítica parece contribuir para o tipo de canal de cálcio envolvido, uma vez que foi detectada a participação de canais de cálcio tipo L, N e P/Q no efeito da FLA₂-Lys49, mas apenas do tipo N e P/Q para a FLA₂-Asp49. Além dos canais de cálcio, os canais de sódio resistente a TTX também contribuem para a hipernocicepção induzida pelas fosfolipases A₂.

A determinação dos mediadores liberados na medula espinhal em resposta a administração periférica das FLA₂s indicam que para a FLA₂-Lys49, receptores NK₁, receptores para CGRP, receptores ionotrópicos para glutamato, o óxido nítrico, a IL-1, prostanóides e a adenosina participam da hiperalgesia acarretada por esta toxina. O efeito hiperalgésico acarretado pela FLA₂-Asp49 envolve a ativação de receptores NK₁, receptores para CGRP, receptores ionotrópicos e metabotrópicos, óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF α), prostanóides e adenosina. Em relação a alodinia induzida pela FLA₂-Asp49, receptores NK₁ e NK₂, o CGRP, receptores ionotrópicos e metabotrópicos para glutamato, TNF α e prostanóides participam deste fenômeno. Além disso, as células da glia, via ativação de astrócitos e microglia, têm papel relevante para as ações das toxinas.

Baseado nos nossos resultados e nos dados de literatura, podemos sugerir que os fenômenos nociceptivos acarretados pelas fosfolipases A₂ miotóxicas são decorrentes, na medula espinhal, da liberação de vários mediadores químicos por neurônios e células da glia ativada, que atuam conjuntamente para a indução destes fenômenos. Assim, a injeção intraplantar das toxinas acarretaria a liberação, neste sítio medular, de neurocininas e glutamato. As alterações intracelulares promovidas pela liberação destes mediadores acarretariam a remoção do íon magnésio dos receptores NMDA para glutamato, levando à sua ativação. Simultaneamente, a ativação dos receptores AMPA

induziria aumento do influxo de íons Na^+ , K^+ e Ca^{++} para o interior do neurônio, despolarizando a membrana celular. O influxo de cálcio intracelular, gerado pela ativação dos receptores NMDA, levaria à ativação da NOS neuronal (nNOS) e geração do óxido nítrico. Além disso, a liberação dos íons cálcio pelos receptores metabotrópicos para glutamato, acarretaria também a estimulação da nNOS. Adicionalmente, o aumento dos níveis de cálcio intracelular favoreceria a ativação da FLA_2 citosólica, com conseqüente liberação de prostanóides, como a PGE_2 . A PGE_2 aumentaria o limiar de disparo das fibras nociceptivas aferentes, induzindo a liberação de neurotransmissores, como aminoácidos excitatório, SP e CGRP. Ainda, alguns dos neurotransmissores liberados por neurônios, induziriam a ativação das células da glia, (astrócitos e microglia), neste sítio medular, as quais liberariam glutamato, citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e quimiocinas. Estas substâncias, uma vez liberadas, modulariam a excitabilidade neuronal dos neurônios pré e pós- sinápticos, aumentando a transmissão sináptica. Nossos resultados indicam ainda, que a presença da atividade catalítica na molécula da fosfolipase A_2 é importante para determinar o tipo de mediador envolvido no efeito nociceptivo destas fosfolipases (Figura 47).

6-CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que:

- Fosfolipases A₂ variantes Lys49 e Asp49, isoladas do veneno de *Bothrops asper*, quando injetadas por via i.pl., são capazes de induzir hiperalgesia, mas somente a FLA₂ variante Asp49, induz alodinia.

- A atividade catalítica parece ser essencial para o desenvolvimento da hipernocicepção induzida pela FLA₂-Asp49, enquanto que resíduos catiônicos e hidrofóbicos presentes na porção C-terminal da molécula da FLA₂-Lys49 participam da hiperalgesia acarretada por esta toxina.

- Canais de cálcio do tipo L, N e P/Q participam da hiperalgesia induzida pela FLA₂-Lys49, enquanto que canais de cálcio do tipo N e P/Q contribuem para a hiperalgesia causada pela variante Asp49. Além dos canais de cálcio, os canais de sódio resistentes à tetrodotoxina participam da hiperalgesia induzida por ambas as fosfolipases A₂.

- Na medula espinhal,

- taquicininas, via receptores NK₁, os receptores para CGRP, receptores ionotrópicos para glutamato, óxido nítrico neuronal, IL-1, prostanóides e adenosina estão envolvidos na hiperalgesia induzida pela injeção da FLA₂-Lys49. Para a FLA₂-Asp49, receptores NK₁, receptores para CGRP, receptores ionotrópicos e metabotrópicos para glutamato, óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF α), prostanóides e adenosina participam da resposta hiperalgesia.

- com relação à alodinia induzida pela FLA₂-Asp49, receptores NK₁ e NK₂, receptores para CGRP, receptores ionotrópico e metabotrópico (mGlu1 e mGlu5) para glutamato, TNF α , além de prostanóides, medeiam este fenômeno.

- a ativação de astrócitos e microglia contribui significativamente para a gênese da hiperalgesia e alodinia induzidas pelas toxinas. A presença da atividade enzimática parece ser importante para determinar a intensidade e o período de ativação destas células.
- as alterações da sensibilidade dolorosa causadas pelas fosfolipases A_2 não são decorrentes de alterações histopatológicas dos nervos da pata dos animais.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULLO, L.; BALTRONS, M. A.; GARCIA, A. Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Res*, 686: 160-8, 1995.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, 40: 335-93, 2002.

AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; WOOD, J. N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, 379: 257-62, 1996.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615, 2001.

ALEY, K. O. & LEVINE, J. D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*, 19: 2181-6, 1999.

ALLAN, S. M. & ROTHWELL, N. J. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358: 1669-77, 2003.

ALLEN, A. C.; GAMMON, C. M.; OUSLEY, A. H.; MCCARTHY, K. D.; MORELL, P. Bradykinin stimulates arachidonic acid release through the sequential actions of an sn-1 diacylglycerol lipase and a monoacylglycerol lipase. *J Neurochem*, 58: 1130-9, 1992.

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*, 64: 323-9, 1996.

ANDOH, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURASHI, Y. Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK₁ tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 286: 1140-5, 1998.

ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P. G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, 63: 795-813, 2001.

ARNI, R. K. & WARD, R. J. Phospholipase A₂--a structural review. *Toxicon*, 34: 827-41, 1996.

ARROYO, O.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Médica Costarricense*, 41: 23-29, 1999.

ARRUDA, J. L.; SWEITZER, S.; RUTKOWSKI, M. D.; DELEO, J. A. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res*, 879: 216-25, 2000.

AULT, B. & HILDEBRAND, L. M. L-glutamate activates peripheral nociceptors. *Agents Actions*, 39 Spec No: C142-4, 1993.

- BARRES, B. A. New roles for glia. *J Neurosci*, 11: 3685-94, 1991.
- BAZAN, N. G.; RODRIGUEZ DE TURCO, E. B.; ALLAN, G. Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. *J Neurotrauma*, 12: 791-814, 1995.
- BEICHE, F.; SCHEUERER, S.; BRUNE, K.; GEISLINGER, G.; GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett*, 390: 165-9, 1996.
- BENVENISTE, E. N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol*, 263: C1-16, 1992.
- BERG-JOHNSEN, J.; PAULSEN, R. E.; FONNUM, F.; LANGMOEN, I. A. Changes in evoked potentials and amino acid content during fluorocitrate action studied in rat hippocampal cortex. *Exp Brain Res*, 96: 241-6, 1993.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet*, 353: 1610-5, 1999.
- BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: *Text Book of Pain*, P. D. Wall & R. Melzack (Ed.), Edinburgh, Churchill-Livingstone 85-103, 1999.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I. F.; RANG, H. P.; SHAH, K.; WALPOLE, C. S.; YEATS, J. C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol*, 107: 544-52, 1992.
- BHAVE, G.; KARIM, F.; CARLTON, S. M.; GEREAU, R. W. T. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci*, 4: 417-23, 2001.
- BIANCHI, M.; ROSSONI, G.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; BERTI, F. Carbamazepine exerts anti-inflammatory effects in the rat. *Eur J Pharmacol*, 294: 71-4, 1995.
- BIRCH, P. J.; GROSSMAN, C. J.; HAYES, A. G. 6,7-Dinitro-quinoxaline-2,3-dione and 6-nitro,7-cyano-quinoxaline-2,3-dione antagonise responses to NMDA in the rat spinal cord via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur J Pharmacol*, 156: 177-80, 1988.
- BLEAKMAN, D.; RUSIN, K. I.; CHARD, P. S.; GLAUM, S. R.; MILLER, R. J. Metabotropic glutamate receptors potentiate ionotropic glutamate responses in the rat dorsal horn. *Mol Pharmacol*, 42: 192-6, 1992.
- BODDEKE, E. W. G. M. Involvement of chemokines in pain. *Eur. J. of Pharmacol.*, 429: 115-119, 2001.
- BOLAÑOS, R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. cost. Cienc. Méd.*, 3: 165-184, 1982.

- BOMALASKI, J. S.; LAWTON, P.; BROWNING, J. L. Human extracellular recombinant phospholipase A₂ induces an inflammatory response in rabbit joints. *J. Immunol.*, 146: 3904-10, 1991.
- BREDT, D. S.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*, 267: 10976-81, 1992.
- BULTRÓN, E.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. *Toxicon*, 31: 217-222, 1993.
- BURIGO, A. C.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. *J Pharm Pharmacol.*, 48: 106-111, 1996.
- BUTRON, E.; GHELESTAM, M.; GUTIERREZ, J. M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. *Biochim Biophys Acta*, 1179: 253-9, 1993.
- CALDERON, L. & LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Arch Biochem Biophys*, 358: 343-50, 1998.
- CALDERON, L. & LOMONTE, B. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129. *Toxicon*, 37: 683-7, 1999.
- CANDURI, F.; MANCUSO, L. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARNI, R. K. Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. *Toxicon*, 36: 547-51, 1998.
- CAO, Y. Q.; MANTYH, P. W.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; EPSTEIN, C. J.; BASBAUM, A. I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, 392: 390-4, 1998.
- CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Res*, 734: 103-8, 1996.
- CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res*, 790: 160-9, 1998.
- CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C. T.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon*, 38: 1773-1785, 2000.
- CATERINA, M. J.; ROSEN, T. A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A. J.; JULIUS, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398: 436-41, 1999.

- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-24, 1997.
- CERVERO, F. & LAIRD, J. M. Mechanisms of allodynia: interactions between sensitive mechanoreceptors and nociceptors. *Neuroreport*, 7: 526-8, 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 A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, 41: 667-678, 2003.
- CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A₂s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain*, 108: 180-91, 2004.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 39: 1173-1181, 2001.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53: 55-63, 1994.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*, 33: 31-39, 1995.
- CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 36: 1861-9, 1998.
- CHEN, C.; CAVANAUGH, J. M.; OZAKTAY, A. C.; KALLAKURI, S.; KING, A. L. Effects of phospholipases A₂ on lumbar nerve root structure and function. *Spine*, 22: 1057-1064, 1997.
- CHEN, J.; ENGLE, S. J.; SEILHAMER, J. J.; TISCHFIELD, J. A. Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*, 1215: 115-20, 1994.
- CHEN, Y. & DENNIS, E. A. Expression and characterization of human group V phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*, 1394: 57-64, 1998.
- CHEVRIER, P.; VIJAYARAGAVAN, K.; CHAHINE, M. Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. *Br J Pharmacol*, 142: 576-84, 2004.
- CHIBA, T.; YAMAGUCHI, A.; YAMATANI, T.; NAKAMURA, A.; MORISHITA, T.; INUI, T.; FUKASE, M.; NODA, T.; FUJITA, T. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am J Physiol*, 256: E331-5, 1989.

CHIOATO, L. Investigação das bases estruturais das atividade de Bothropstoxina I, uma fosfolipase A₂-Lys49 isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* e da fosfolipase A₂ secretada humana do grupo IIA. *Doutorado* - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2004.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SA, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. *Biochem J*, 366: 971-6, 2002.

CHO, W. Structure, function, and regulation of group V phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta*, 1488: 48-58, 2000.

CINTRA, A. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem*, 12: 57-64, 1993.

CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.*, 166: 505-510, 1989.

CLARK, J. D.; LIN, L.; KRIZ, R. W.; RAMESHA, C. S.; SULTAMAN, L. A.; LIN, A. Y.; MILONA, N.; KNOFF, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65: 1043-51, 1991.

CODERRE, T. J. & MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci*, 12: 3665-70, 1992.

COGGESHALL, R. E.; TATE, S.; CARLTON, S. M. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett*, 355: 45-8, 2004.

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*, 49: 419-27, 1999.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1: 1397-406, 2001.

CONDREA, E.; FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*, 19: 705-20, 1981.

CONN, P. J. & PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 205-37, 1997.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev*, 32: 476-509, 2000.

COSTA, S. K.; ESQUISATTO, L. C.; CAMARGO, E.; GAMBERO, A.; BRAIN, S. D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Sci*, 69: 1573-85, 2001.

CROWL, R. M.; STELLER, T. J.; CONTROY, R. R.; STONER, C. R. Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem.*, 266: 2647-51, 1991.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol.*, 104: 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 660-64, 1992.

CUNHA, J. M. Contribuição de mediadores inflamatórios na hipernocicepção mecânica induzida por estreptozotocina. *Doutorado - Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, 2004.

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*, 22: 7737-45, 2002.

DAMERAU, B.; LEGE, L.; OLDIGS, H. D.; VOGT, W. Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunym Sch. Arch. Pharmac.*, 287: 141-56, 1975.

DAVIDSON, E. M.; COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport*, 8: 941-6, 1997.

DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTORPE, M. J.; HATCHER, J. P.; DAVEY, P. T.; OVEREND, P.; HARRIES, M. H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S. A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A. J.; PUGH, P. L.; ROGERS, D. C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405: 183-7, 2000.

DE PETROCELLIS, L.; HARRISON, S.; BISOGNO, T.; TOGNETTO, M.; BRANDI, I.; SMITH, G. D.; CREMINON, C.; DAVIS, J. B.; GEPPETTI, P.; DI MARZO, V. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem*, 77: 1660-3, 2001.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 269: 13057-60, 1994.

DEVOR, M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: *Text Book of Pain*, P. D. Wall & R. Melzack (Ed.), Edinburgh, Churchill-Livingstone, 79-100, 1994.

DIRIG, D. M. & YAKSH, T. L. In vitro prostanoid release from spinal cord following peripheral inflammation: effects of substance P, NMDA and capsaicin. *Br J Pharmacol*, 126: 1333-40, 1999.

DOUGHERTY, P. M.; PALECEK, J.; PALECKOVA, V.; WILLIS, W. D. Neurokinin 1 and 2 antagonists attenuate the responses and NK1 antagonists prevent the sensitization of primate spinothalamic tract neurons after intradermal capsaicin. *J Neurophysiol*, 72: 1464-75, 1994.

DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. *Pain Rev.*, 1: 153-171, 1994.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.*, 75: 125-131, 1995.

DRAY, A. The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer, 130: 21-41, 1997.

DRAY, A. & PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in Neuroscience*, 16: 99-104, 1993.

DRAY, A. & URBAN, L. New pharmacological strategies for pain relief. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36: 253-80, 1996.

DUA, R. & CHO, W. Inhibition of human secretory class II phospholipase A₂ by heparin. *Eur J Biochem*, 221: 481-90, 1994.

DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol*, 186: 289-93, 1990.

DUGAS, B. & KOLB, J. P. Nitric oxide production in human inflammatory processes. *Res Immunol*, 146: 661-3, 1995.

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)*, 495: 429-440, 1996.

FAGNI, L.; CHAVIS, P.; ANGO, F.; BOCKAERT, J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci*, 23: 80-8, 2000.

FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon*, 35: 185-193, 1997.

FERREIRA, S. H. Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores. Cantabria: Serviço de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, 149-62, 1994.

FERREIRA, S. H. & LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*, 33: 1479-85, 1994.

FERREIRA, S. H. & LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*, 33: 1479, 1995.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; FACCIOLI, L. H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol*, 217: 207-9, 1992.

FIELD, M. J.; BRAMWELL, S.; HUGHES, J.; SINGH, L. Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain*, 83: 303-11, 1999.

FISHER, K. & CODERRE, T. J. Comparison of nociceptive effects produced by intrathecal administration of mGluR agonists. *Neuroreport*, 7: 2743-7, 1996.

FISHER, K. & CODERRE, T. J. Hyperalgesia and allodynia induced by intrathecal (RS)-dihydroxyphenylglycine in rats. *Neuroreport*, 9: 1169-72, 1998.

FISHER, K.; LEFEBVRE, C.; CODERRE, T. J. Antinociceptive effects following intrathecal pretreatment with selective metabotropic glutamate receptor compounds in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav*, 73: 411-8, 2002.

FLEETWOOD-WALKER, S. M.; HOPE, P. J.; MITCHELL, R.; EL-YASSIR, N.; MOLONY, V. The influence of opioid receptor subtypes on the processing of nociceptive inputs in the spinal dorsal horn of the cat. *Brain Res*, 451: 213-26, 1988.

FLEETWOOD-WALKER, S. M.; MITCHELL, R.; HOPE, P. J.; EL-YASSIR, N.; MOLONY, V.; BLADON, C. M. The involvement of neurokinin receptor subtypes in somatosensory processing in the superficial dorsal horn of the cat. *Brain Res*, 519: 169-82, 1990.

FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, II. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem Biophys*, 284: 352-9, 1991.

FRANSON, R. C.; SAAL, J. S.; SAAL, J. A. Human disc phospholipase A₂ is inflammatory. *Spine*, 17: S129-32, 1992.

FUENTES, L.; HERNANDEZ, M.; NIETO, M. L.; SANCHEZ CRESPO, M. Biological effects of group IIA secreted phospholipase A(2). *FEBS Lett*, 531: 7-11, 2002.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J. R.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol*, 63: 65-72, 2002.

GAMBERO, A.; THOMAZZI, S. M.; CINTRA, A. C. O.; LANDUCCI, E. C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon*, 44: 473-482, 2004.

- GAMMON, C. M.; ALLEN, A. C.; MORELL, P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J Neurochem*, 53: 95-101, 1989.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, T.; BOSE, C.; FOULKES, R.; HUGHES, B. Antagonistic effect of human alpha-CGRP [8-37] on the in vivo regional haemodynamic actions of human alpha-CGRP. *Biochem Biophys Res Commun*, 171: 938-43, 1990.
- GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; KAJANDER, K. C.; CARLTON, S. M. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res*, 565: 1-7, 1991.
- GARRY, M. G. & HARGREAVES, K. M. Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Res*, 582: 139-42, 1992.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*, 14: 60-7, 1991.
- GOLD, M. S. Tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents and inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7645-9, 1999.
- GRANGER, D. N. & KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 55: 662-75, 1994.
- GRIGG, P.; SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol*, 55: 635-43, 1986.
- GRONBLAD, M.; VIRRI, J.; RONKKO, S.; KIVIRANTA, I.; VANHARANTA, H.; SEITSALO, S.; RASHBAUM, R. F.; GUYER, R. D. A controlled biochemical and immunohistochemical study of human synovial-type (group II) phospholipase A₂ and inflammatory cells in macroscopically normal, degenerated, and herniated human lumbar disc tissues. *Spine*, 21: 2531-8, 1996.
- GUO, J. Z.; YOSHIOKA, K.; ZHAO, F. Y.; HOSOKI, R.; MAEHARA, T.; YANAGISAWA, M.; HAGAN, R. M.; OTSUKA, M. Pharmacological characterization of GR82334, a tachykinin NK1 receptor antagonist, in the isolated spinal cord of the neonatal rat. *Eur J Pharmacol*, 281: 49-54, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23: 887-893, 1985.
- GUTIERREZ, J. M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33: 1405-24, 1995.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol C*, 84: 159-64, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.*, 40: 367-79, 1984.

HAINS, B. C.; KLEIN, J. P.; SAAB, C. Y.; CRANER, M. J.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, 23: 8881-92, 2003.

HAN, S. P.; NAES, L.; WESTFALL, T. C. Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun*, 168: 786-91, 1990.

HANDY, R. L. & MOORE, P. K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol*, 123: 1119-26, 1998.

HANESCH, U. & SCHAIBLE, H. G. Effects of ankle joint inflammation on the proportion of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunopositive perikarya in dorsal root ganglia. *Prog Brain Res*, 104: 339-47, 1995.

HAO, J. X. & XU, X. J. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered excitatory amino acid receptor antagonists. *Pain*, 66: 279-295, 1996.

HARRIS, J. B. In: Snake Toxins. New York: Pergamon Press 91-129, 1991.

HARRISON, J. K.; JIANG, Y.; CHEN, S.; XIA, Y.; MACIEJEWSKI, D.; MCNAMARA, R. K.; STREIT, W. J.; SALAFRANCA, M. N.; ADHIKARI, S.; THOMPSON, D. A.; BOTTI, P.; BACON, K. B.; FENG, L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 10896-901, 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*, 2: 48-51, 1988.

HASSEL, B.; PAULSEN, R. E.; JOHNSEN, A.; FONNUM, F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res*, 576: 120-4, 1992.

HAY, C. & DE BELLEROCHE, J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport*, 8: 1249-51, 1997.

HAYDON, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, 2: 185-93, 2001.

HO, I. C.; ARM, J. P.; BINGHAM, C. O., 3RD; CHOI, A.; AUSTEN, K. F.; GLIMCHER, L. H. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *J Biol Chem*, 276: 18321-6, 2001.

HOLGUIN, A.; O'CONNOR, K. A.; BIEDENKAPP, J.; CAMPISI, J.; WIESELER-FRANK, J.; MILLIGAN, E. D.; HANSEN, M. K.; SPATARO, L.; MAKSIMOVA, E.; BRAVMANN, C.; MARTIN, D.; FLESHNER, M.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. HIV-1 gp120 Stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). *Pain*, 110: 517-30, 2004.

HOLLAND, D. R.; CLANCY, L. L.; MUCHMORE, S. W.; RYDE, T. J.; EINSPAHR, H. M.; FINZEL, B. C.; HEINRIKSON, R. L.; WATENPAUGH, K. D. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem*, 265: 17649-56, 1990.

HOLLMANN, M. & HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17: 31-108, 1994.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, 26: 615-27, 1988.

HOGERWERF, W. A.; ZOU, L.; SHENOY, M.; SUN, D.; MICCI, M. A.; LEE-HELLMICH, H.; XIAO, S. Y.; WINSTON, J. H.; PASRICHA, P. J. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci*, 21: 9036-42, 2001.

HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6155-60, 2000.

JACKSON, D. L.; GRAFF, C. B.; RICHARDSON, J. D.; HARGREAVES, K. M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 284: 321-5, 1995.

JANG, J. H.; NAM, T. S.; PAIK, K. S.; LEEM, J. W. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neurosci Lett*, 360: 129-32, 2004.

JI, R. R.; BABA, H.; BRENNER, G. J.; WOOLF, C. J. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*, 2: 1114-9, 1999.

JIA, H.; RUSTIONI, A.; VALTSCHANOFF, J. G. Metabotropic glutamate receptors in superficial laminae of the rat dorsal horn. *J Comp Neurol*, 410: 627-42, 1999.

JONES, M. W. & HEADLEY, P. M. Interactions between metabotropic and ionotropic glutamate receptor agonists in the rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, 34: 1025-31, 1995.

JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J. A.; FREY, P.; ELDE, R. P.; BROWN, J. C. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res*, 247: 417-31, 1987.

JULIUS, D. & BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-10, 2001.

KAISER, I. I.; GUTIÉRREZ, J. M.; PLUMMER, D.; ARID, S. D.; ODELL, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. biophys.*, 278: 319-25, 1990.

KARAI, L.; BROWN, D. C.; MANNES, A. J.; CONNELLY, S. T.; BROWN, J.; GANDAL, M.; WELLISCH, O. M.; NEUBERT, J. K.; OLAH, Z.; IADAROLA, M. J. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest*, 113: 1344-52, 2004.

KIDD, B. L. & URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*, 87: 3-11, 2001.

KIMELBERG, H. K. Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*, 3: 1-16, 1983.

KING, A. E.; THOMPSON, S. W.; URBAN, L.; WOOLF, C. J. An intracellular analysis of amino acid induced excitations of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord slice. *Neurosci Lett*, 89: 286-92, 1988.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42: 827-40, 2003.

KINI, R. M. & EVANS, H. A model to explain the pharmacological effects os snake venom phospholipases A2. *Toxicon*, 27: 613-635, 1989.

KUENZI, F. M. & DALE, N. Effect of capsaicin and analogues on potassium and calcium currents and vanilloid receptors in *Xenopus* embryo spinal neurones. *Br J Pharmacol*, 119: 81-90, 1996.

KURASHI, Y.; NANAYAMA, T.; OHNO, H.; MINAMI, M.; SATOH, M. Antinociception induced in rats by intrathecal administration of antiserum against calcitonin gene-related peptide. *Neurosci Lett*, 92: 325-9, 1988.

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

LAI, J.; GOLD, M. S.; KIM, C. S.; BIAN, D.; OSSIPOV, M. H.; HUNTER, J. C.; PORRECA, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain*, 95: 143-52, 2002.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol.*, 19: 257-263, 1998.

LANDUCCI, E. C.; DE CASTRO, R. C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2)

homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol*, 59: 1289-94, 2000.

LANEUVILLE, O.; DORAIS, J.; COUTURE, R. Characterization of the effects produced by neurokinins and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. *Life Sci*, 42: 1295-305, 1988.

LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. *Eur J Pharmacol*, 324: 169-77, 1997.

LAWSON, S. N.; PERRY, M. J.; PRABHAKAR, E.; MCCARTHY, P. W. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. *Brain Res Bull*, 30: 239-43, 1993.

LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂-a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry*, 40: 28-36, 2001.

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

LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, I. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1077: 362-70, 1991.

LLORET, S. & MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*, 31: 949-56, 1993.

LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, 27: 725-33, 1989.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon*, 32: 41-55, 1994a.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem*, 269: 29867-73, 1994b.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; ANGULO, Y.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Tyr-->Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A(2) expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 19-26, 1999.

LOMONTE, B.; TARKAWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, 17: 93-105, 1993.

LONG-CHUAN, Y.; HARSSON, P.; LUNDEBERG, S.; LUNDENBERG, T. Effects of calcitonin gene-related peptide-m (8-37) on withdrawal responses in rats with inflammation. *Eur. J. of Pharmacol.*, 347: 275-282, 1998.

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*, 45: 308-11, 1996.

LUBER-NAROD, J.; KAGE, R.; LEEMAN, S. E. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor- α from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol*, 152: 819-24, 1994.

MA, Q. P. & WOOLF, C. J. Involvement of neurokinin receptors in the induction but not the maintenance of mechanical allodynia in rat flexor motoneurons. *J Physiol*, 486 (Pt 3): 769-77, 1995.

MA, Z.; WANG, X.; NOWATZKE, W.; RAMANADHAM, S.; TURK, J. Human pancreatic islets express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipase A₂ (iPLA₂) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA₂ gene on chromosome 22q13.1. *J Biol Chem*, 274: 9607-16, 1999.

MACIEJEWSKI-LENOIR, D.; CHEN, S.; FENG, L.; MAKI, R.; BACON, K. B. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol*, 163: 1628-35, 1999.

MALMBERG, A. B. & YAKSH, T. L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*, 257: 1276-9, 1992.

MALMBERG, A. B. & YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci*, 15: 2768-76, 1995.

MARAGANORE, J. M. & HEINRIKSON, R. L. The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. *J Biol Chem*, 261: 4797-804, 1986.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem*, 259: 13839-43, 1984.

MARCHETTINI, P.; LACERENZA, M.; MARANGONI, C.; PELLEGATA, G.; SOTGIU, M. L.; SMIRNE, S. Lidocaine test in neuralgia. *Pain*, 48: 377-82, 1992.

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*, 56: 259-65, 1991.

MARTIN, F. C.; CHARLES, A. C.; SANDERSON, M. J.; MERRILL, J. E. Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Res*, 599: 13-8, 1992.

MATZNER, O. & DEVOR, M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol*, 72: 349-59, 1994.

MELLER, S. T. Thermal and Mechanical Hyperalgesia. A distinct role for different excitatory amino acid receptors and signal transduction pathways? *APS Journal*, 3: 215-231, 1994.

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

MILLIGAN, E. D.; MEHMERT, K. K.; HINDE, J. L.; HARVEY, L. O.; MARTIN, D.; TRACEY, K. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res*, 861: 105-16, 2000.

MILLIGAN, E. D.; O'CONNOR, K. A.; NGUYEN, K. T.; ARMSTRONG, C. B.; TWINING, C.; GAYKEMA, R. P.; HOLGUIN, A.; MARTIN, D.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci*, 21: 2808-19, 2001.

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*, 23: 1026-1040, 2003a.

MILLIGAN, E. D.; VERGE, G.; ZAPATA, V.; CHACUR, M.; BIEDENKAPP, J.; O'CONNOR, K. A.; CHAPMAN, G.; GREEN, P. J.; TWINING, C.; MARTIN, D.; MAIER, S. F.; FOSTER, A. C.; NAEVE, G. S.; WATKINS, L. R. Fractalkine: a neuron-to-glia signal creating pathological pain. *enviado para publicação*, 2003b.

MILLS, C. D.; XU, G. Y.; JOHNSON, K. M.; MCADOO, D. J.; HULSEBOSCH, C. E. AIDA reduces glutamate release and attenuates mechanical allodynia after spinal cord injury. *Neuroreport*, 11: 3067-70, 2000.

MONCADA, S. & HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J*, 9: 1319-30, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-42, 1991.

MORENO, J. J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Actions*, 36: 258-63, 1992.

- MORONI, F.; COZZI, A.; LOMBARDI, G.; SOURTCHEVA, S.; LEONARDI, P.; CARFI, M.; PELLICCIARI, R. Presynaptic mGlu1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex. *Eur J Pharmacol*, 347: 189-95, 1998.
- MOURA DA SILVA, A.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. I. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*, 29: 713-9, 1991.
- MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. *Biochem Pharmacol*, 48: 1-10, 1994.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I.; NAKAMURA, H.; YOKOYAMA, Y.; MORI, H.; INOUE, K. Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂. *FESB Lett.*, 268: 113-6, 1990.
- MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A₂. *Crit Rev Immunol*, 17: 225-83, 1997.
- MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I.; INOUE, K. Phospholipase A₂ in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology. New York: CRC Press, v.5: 93-124, 1995.
- NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 117: 407-412, 1996.
- NAKAZATO, Y.; SIMONSON, M. S.; HERMMAN, W. H.; KONIECZOWSKI, M.; SEDOR, J. R. Interleukin-1 alpha stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A₂. *J. Biol Chem.*, 266: 14119-27, 1991.
- NARITA, M.; OHSAWA, M.; MIZOGUCHI, H.; AOKI, T.; SUZUKI, T.; TSENG, L. F. Role of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C pathway in delta-opioid receptor-mediated antinociception in the mouse spinal cord. *Neuroscience*, 99: 327-31, 2000.
- NASSTROM, J. B.; SCHNEIDER, S. P.; PERL, E. R. N-methyl-D-aspartate (NMDA) depolarizes glutamate-insensitive neurones in the superficial dorsal horn. *Acta Physiol Scand*, 144: 483-4, 1992.
- NEHLS, D. G.; KURUMAJI, A.; PARK, C. K.; MCCULLOCH, J. Differential effects of competitive and non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists on glucose use in the limbic system. *Neurosci Lett*, 91: 204-10, 1988.
- NEVALAINEN, T. J.; HAAPAMAKI, M. M.; GRONROOS, J. M. Roles of secretory phospholipases A (2) in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta*, 1488: 83-90, 2000.
- NISHIHARA, I.; MINAMI, T.; UDA, R.; ITO, S.; HYODO, M.; HAYAISHI, O. Effect of NMDA receptor antagonists on prostaglandin E₂-induced hyperalgesia in conscious mice. *Brain Res*, 677: 138-44, 1995.

NOWYCKY, M. Voltage-gated ion channels in dorsal root ganglion neurons. In: *Sensory neurons: diversity, development and plasticity*, A. S. Scott (Ed.), New York, Oxford University Press 97-115, 1992.

NUNEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A (2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon*, 39: 1587-94, 2001.

OBATA, K. & NOGUCHI, K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci*, 74: 2643-53, 2004.

OKA, S. & ARITA, H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J. Biol. Chem.*, 266: 9956-60, 1991.

OKANO, K.; KURAISHI, Y.; SATOH, M. Involvement of spinal substance P and excitatory amino acids in inflammatory hyperalgesia in rats. *Jpn J Pharmacol*, 76: 15-22, 1998.

OKU, R.; SATOH, M.; FUJII, N.; OTAKA, A.; YAJIMA, H.; TAKAGI, H. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res*, 403: 350-4, 1987.

OSBORNE, M. G. & CODERRE, T. J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 126: 1840-6, 1999.

O'SHAUGHNESSY, C. T. & CONNOR, H. E. Investigation of the role of tachykinin NK₁, NK₂ receptors and CGRP receptors in neurogenic plasma protein extravasation in dura mater. *Eur J Pharmacol*, 263: 193-8, 1994.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*, 37: 411-45, 1999.

OZAKTAY, A. C.; KALLAKURI, S.; CAVANAUGH, J. M. Phospholipase A₂ sensitivity of the dorsal root and dorsal root ganglion. *Spine*, 23: 1297-306, 1998.

PARADA, C. A.; VIVANCOS, G. G.; TAMBELI, C. H.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; FERREIRA, S. H. 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*, 100: 2923-8, 2003a.

PARADA, C. A.; YEH, J. J.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Transient attenuation of protein kinase Cε can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, 120: 219-26, 2003b.

PARAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur J Biochem*, 253: 452-61, 1998.

PEREA, G. & ARAQUE, A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris*, 96: 199-207, 2002.

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*, 232: 255-61, 1993.

PICKARD, R. T.; STRIFLER, B. A.; KRAMER, R. M.; SHARP, J. D. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 274: 8823-31, 1999.

PIN, J. P. & DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34: 1-26, 1995.

PIPERNO, M.; HELLIO LE GRAVERAND, M. P.; REBOUL, P.; MATHIEU, P.; TRON, A. M.; PERRIN, G.; PESCHARD, M. J.; RICHARD, M.; VIGNON, E. Phospholipase A₂ activity in herniated lumbar discs. Clinical correlations and inhibition by piroxicam. *Spine*, 22: 2061-5, 1997.

POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Bradykinin B₁ and B₂ receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 126: 649-656, 1999.

POON, A. & SAWYNOK, J. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain*, 74: 235-45, 1998.

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*, 96: 7640-4, 1999.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz J Med Biol Res*, 34: 449-61, 2001.

PREMKUMAR, L. S. & AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408: 985-90, 2000.

PRUZANSKI, W.; SAITO, S.; STEFANSKI, E.; VADAS, P. Comparison of group I and II soluble phospholipases A₂ activities on phagocytic functions of human polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. *Inflammation*, 15: 127-35, 1991.

PRUZANSKI, W. & VADAS, P. Phospholipase A₂ and inflammation. *Ann. Rheum. Dis.*, 48: 962-3, 1989.

QUEIROZ, L. S. & PETTA, C. A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 26: 247-53, 1984.

QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23: 341-5, 1985.

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

REEH, P. W. Chemical excitation and sensitization of nociceptors. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: Urban, L.119-131, 1994.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*, 46: 551-99, 1994.

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

REN, K. & DUBNER, R. NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. *Neurosci Lett*, 163: 22-6, 1993.

REN, K.; WILLIAMS, G. M.; HYLDEN, J. L.; RUDA, M. A.; DUBNER, R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 219: 235-43, 1992.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENT, J.; SIGLER, P. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J Biol Chem*, 260: 11627-34, 1985.

REUSS, M. H.; REUSS, S. Nitric oxide synthase neurons in the rodent spinal cord distribution, relation to substance P fibers, and effects of dorsal rhizotomy. *J. Chem. Neuroanat*, 21: 181-86, 2001.

RIEDEL, W. & NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*, 60: 404-15, 2001.

RIZZO, M. T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration. *Blood*, 96: 3809-15, 2000.

ROBINSON-WHITE, A. & STRATAKIS, C. A. Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci*, 968: 256-70, 2002.

ROSENBERG, P. Natural Toxins. Oxford 129-174, 1986.

ROTHSCHILD, A. M. & ROTHSCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology: Snake Venoms*, (Ed.), Berlin, Lee, C. Y. ed., Springer, 52: 591-629, 1979.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENZKE, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium ion independent

membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry*, 31: 12424-30, 1992.

SAAL, J. A.; SAAL, J. S.; HERZOG, R. J. The natural history of lumbar intervertebral disc extrusions treated nonoperatively. *Spine*, 15: 683-6, 1990.

SAEGUSA, H.; MATSUDA, Y.; TANABE, T. Effects of ablation of N- and R-type Ca (2+) channels on pain transmission. *Neurosci Res*, 43: 1-7, 2002.

SAKURADA, T.; MANOME, Y.; KATSUMATA, K.; UCHIUMI, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Naloxone-reversible effect of spantide on the spinally mediated behavioural response induced by neurokinin-2 and -3 receptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 346: 69-75, 1992.

SALT, T. E. & BINNS, K. E. Contributions of mGlu1 and mGlu5 receptors to interactions with N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses and nociceptive sensory responses of rat thalamic neurons. *Neuroscience*, 100: 375-80, 2000.

SALTER, M. W. & HENRY, J. L. Responses of functionally identified neurones in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P, neurokinin A and physalaemin. *Neuroscience*, 43: 601-10, 1991.

SAMAD, T. A.; MOORE, K. A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J. V.; WOOLF, C. J. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410: 471-5, 2001.

SAMMONS, M. J.; RAVAL, P.; DAVEY, P. T.; ROGERS, D.; PARSONS, A. A.; BINGHAM, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res*, 876: 48-54, 2000.

SATO, K.; KIIYAMA, H.; PARK, H. T.; TOHYAMA, M. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. *Neuroreport*, 4: 1263-5, 1993.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol*, 347: 1-11, 1998.

SAWYNOK, J. & LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*, 69: 313-40, 2003.

SAWYNOK, J.; ZARRINDAST, M. R.; REID, A. R.; DOAK, G. J. Adenosine A3 receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol*, 333: 1-7, 1997.

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

SCHALKWIJK, C.; PFEILSCHIFTER, J.; MARKI, F.; VAN DEN BOSCH, H. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 174: 268-75, 1991.

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

SCROGGS, R. S. & FOX, A. P. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol*, 445: 639-58, 1992.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A.; DE SOUZA, G. E.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, 28: 261-273, 1990.

SEROU, M. J.; DECOSTER, M. A.; BAZAN, N. G. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res*, 58: 593-8, 1999.

SEYBOLD, V. S.; GALEAZZA, M. T.; GARRY, M. G.; HARGREAVES, K. M. Plasticity of calcitonin gene related peptide neurotransmission in the spinal cord during peripheral inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 73: 1007-14, 1995.

SEYBOLD, V. S.; MCCARSON, K. E.; MERMELSTEIN, P. G.; GROTH, R. D.; ABRAHAMS, L. G. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. *J Neurosci*, 23: 1816-24, 2003.

SHARP, J. D.; WHITE, D. L.; CHIOU, X. G.; GOODSON, T.; GAMBOA, G. C.; MCCLURE, D.; BURGETT, S.; HORSKINS, J.; SKATRUD, P. L.; SPORTSMAN, J. R.; BECKER, G. W.; KANG, L. H.; ROBERTS, E. F.; KRAMER, R. M. Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, 266: 14850-3, 1991.

SIX, D. A. & DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A (2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1488: 1-19, 2000.

SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; HAAS, G. H. 1982.

SLUKA, K. A. Blockade of N- and P/Q-type calcium channels reduces the secondary heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 287: 232-7, 1998.

SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J*, 259: 315-24, 1989.

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

SNYDER, S. H. & DAWSON, T. M. Nitric oxide and related substances as neural messengers. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.*, F. E. Bloom & D. J. Kupfer (Ed.), New York, Raven Press 609-618, 1995.

SOARES, A. M.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch Biochem Biophys*, 373: 7-15, 2000a.

- SOARES, A. M.; GUERRA, S. I. Q. M. R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A (2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys*, 378: 201-9, 2000b.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. Biometry. New York 859, 1981.
- SONG, M. S.; SHIN, K. A.; KANG, J. S.; LEE, C. H.; SHIN, I. C.; LEE, S. J.; KOH, H. C. The involvement of nitric oxide on the adenosine A (2) receptor-induced cardiovascular inhibitory responses in the posterior hypothalamus of rats. *Neurosci Lett*, 326: 41-5, 2002.
- SOUSA, A. M. & PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*, 897: 9-19, 2001.
- STELLA, N.; TENCE, M.; GLOWINSKI, J.; PREMONT, J. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci*, 14: 568-75, 1994.
- STREIT, W. J.; GRAEBER, M. B.; KREUTZBERG, G. W. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1: 301-7, 1988.
- STREIT, W. J. & KINCAID-COLTON, C. A. The brain's immune system. *Sci Am*, 273: 54-5, 58-61, 1995.
- SVENSSON, C. I. & YAKSH, T. L. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 553-83, 2002.
- SWEITZER, S. M.; COLBURN, R. W.; RUTKOWSKI, M.; DELEO, J. A. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res*, 829: 209-21, 1999.
- SWEITZER, S.; MARTIN, D.; DELEO, J. A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 103: 529-39, 2001.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51: 159-212, 1999.
- TAIWO, Y. O. & LEVINE, J. D. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res*, 537: 372-4, 1990.
- TANELIAN, D. L. & BROSE, W. G. Neuropathic pain can be relieved by drugs that are use-dependent sodium channel blockers: lidocaine, carbamazepine, and mexiletine. *Anesthesiology*, 74: 949-51, 1991.
- 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*, 28: 449-59, 2003a.

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

TEIXEIRA, M. J. & FIGUEIRÓ, J. A. B. Dor no contexto multidisciplinar. In: *Dor: anatomia e fisiopatologia de condições álgicas*, M. Jr. (Ed.), Fascículo II: 1-27, 2003.

THOMPSON, S. W.; DRAY, A.; URBAN, L. Injury-induced plasticity of spinal reflex activity: NK₁ neurokinin receptor activation and enhanced A- and C-fiber mediated responses in the rat spinal cord in vitro. *J Neurosci*, 14: 3672-87, 1994.

TRAUB, R. J. The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. *Pain*, 67: 151-61, 1996.

TREBIEN, H. A. & CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents and Actions*, 26: 292-00, 1989.

TREDE, R. D. & COLE, J. D. Dissociated secondary hyperalgesia in a subject with a large-fibre sensory neuropathy. *Pain*, 53: 169-174, 1993.

TU, A. T. *Venoms: Chemistry and molecular biology*. New York: John Wiley & Sons 1977.

URBAN, M. O. & GEBHART, G. F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7687-92, 1999.

VALENTIN, E. & LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1488: 59-70, 2000.

VALERIO, R. M.; BRAY, A. M.; CAMPBELL, R. A.; DIPASQUALE, A.; MARGELLIS, C.; RODDA, S. J.; GEYSEN, H. M.; MAEJI, N. J. Multipin peptide synthesis at the micromole scale using 2-hydroxyethyl methacrylate grafted polyethylene supports. *Int J Pept Protein Res*, 42: 1-9, 1993.

VAN DEN BERGH, C. J.; SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49]phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. *Eur. J. Biochem*, 176: 353-57, 1988.

VAN SCHARRENBURG, G. J.; PUIJK, W. C.; EGMOND, M. R.; VAN DER SCHAFT, P. H.; DE HAAS, G. H.; SLOTBOOM, A. J. Effects of substitution of the absolutely invariant glutamine-4 and phenylalanine-5 in bovine pancreatic phospholipase A₂ on enzymatic activity and substrate binding properties. *Biochemistry*, 21: 1345-52, 1982.

VANE, J. R. & BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Res.*, 47: 578-587, 1998.

VANEGAS, H. & SCHAIBLE, H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain*, 85: 9-18, 2000.

VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon*, 25: 501-15, 1987.

VITAL-BRAZIL, O. Farmacologia do canal de sódio: modo de ação de toxinas. *Memórias do Instituto Butantan*, 38: 324-328, 1986.

WAJIMA, Z.; HUA, X. Y.; YAKSH, T. L. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res*, 877: 314-21, 2000.

WALKER, K.; BOWES, M.; PANESAR, M.; DAVIS, A.; GENTRY, C.; KESINGLAND, A.; GASPARINI, F.; SPOOREN, W.; STOEHR, N.; PAGANO, A.; FLOR, P. J.; VRANESIC, I.; LINGENHOEHL, K.; JOHNSON, E. C.; VARNEY, M.; URBAN, L.; KUHN, R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. *Neuropharmacology*, 40: 1-9, 2001a.

WALKER, K.; REEVE, A.; BOWES, M.; WINTER, J.; WOTHERSPOON, G.; DAVIS, A.; SCHMID, P.; GASPARINI, F.; KUHN, R.; URBAN, L. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*, 40: 10-19, 2001b.

WALKER, K. M.; URBAN, L.; MEDHURST, S. J.; PATEL, S.; PANESAR, M.; FOX, A. J.; MCINTYRE, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*, 304: 56-62, 2003.

WANG, J. P. & TENG, C. M. Roles of PMN leucocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw oedema induced by two phospholipase A₂ enzymes from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J Pharm Pharmacol*, 44: 300-5, 1992.

WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FACA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 21: 134-40, 2001.

WASNER, G.; BARON, R.; JANIG, W. Dynamic mechanical allodynia in humans is not mediated by a central presynaptic interaction of A beta-mechanoreceptive and nociceptive C-afferents. *Pain*, 79: 113-9, 1999.

WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7710-3, 1999.

WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. Beyond neurons: Evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological Reviews*, 82: 981-1011, 2002.

WATKINS, L. R. & MAIER, S. F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*, 2: 973-85, 2003.

WATKINS, L. R.; MARTIN, D.; ULRICH, P.; TRACEY, K. J.; MAIER, S. F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain*, 71: 225-235, 1997.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*, 24: 450-5, 2001.

WAXMAN, S. G.; KOCSIS, J. D.; BLACK, J. A. Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol*, 72: 466-70, 1994.

WEBB, B. L.; HIRST, S. J.; GIEMBYCZ, M. A. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol*, 130: 1433-52, 2000.

WILLINGALE, H. L.; GARDINER, N. J.; MCLYMONT, N.; GIBLETT, S.; GRUBB, B. D. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol*, 122: 1593-604, 1997.

WILLIS, W. D. Mechanical Allodynia. *APS Journal*, 2: 23-33, 1993.

WILLIS, W. D. & WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, 14: 2-31, 1997.

WOOLF, C. J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306: 686-8, 1983.

WOOLF, C. J. & COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 7723-30, 1999.

WOOLF, C. J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R. E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 355: 75-8, 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*, 6: 1433-42, 1986.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*, 20: 329-37, 1999.

YAKSH, T. L.; DIRIG, D. M.; CONWAY, C. M.; SVENSSON, C.; LUO, Z. D.; ISAKSON, P. C. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E₂ is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci*, 21: 5847-53, 2001.

YAMAMOTO, T. & NOZAKI-TAGUCHI, N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth Analg*, 94: 962-7, table of contents, 2002.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; SAKASHITA, Y. Spinal N-acetyl- α -linked acidic dipeptidase (NAALADase) inhibition attenuates mechanical allodynia induced by paw carrageenan injection in the rat. *Brain Res*, 909: 138-44, 2001.

YAMAMOTO, T. & SAKASHITA, Y. COX-2 inhibitor prevents the development of hyperalgesia induced by intrathecal NMDA or AMPA. *Neuroreport*, 9: 3869-73, 1998.

YOSHIMURA, M. & JESSELL, T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol*, 430: 315-35, 1990.

YOU, H. J.; CHEN, J.; MORCH, C. D.; ARENDT-NIELSEN, L. Differential effect of peripheral glutamate (NMDA, non-NMDA) receptor antagonists on bee venom-induced spontaneous nociception and sensitization. *Brain Res Bull*, 58: 561-7, 2002.

YOUNG, M. R.; BLACKBURN-MUNRO, G.; DICKINSON, T.; JOHNSON, M. J.; ANDERSON, H.; NAKALEMBE, I.; FLEETWOOD-WALKER, S. M. Antisense ablation of type I metabotropic glutamate receptor mGluR1 inhibits spinal nociceptive transmission. *J Neurosci*, 18: 10180-8, 1998.

ZAMBELLI, V. O. Efeito nociceptivo induzido por uma FLA₂-Lys49: avaliação do mecanismo de ação através do uso de mutações pontuais de Bothropstoxina-1. *Monografia* - Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

ZANCHET, E. M. Efeito hipernociceptivo induzido pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*: caracterização dos mecanismos periféricos e centrais. *Doutorado* - Instituto de Ciências Biomédicas- Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ZANCHET, E. M.; LONGO, I.; CURY, Y. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanoids in pain facilitation induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Res*, 1021: 101-11, 2004.

ZHANG, L. P.; CHEN, Y.; CLARK, B. P.; SHER, E.; HIGH, K. N. W. The role of type 1 metabotropic glutamate receptor in the generation of dorsal root reflexes induced by acute arthritis of the spinal infusion of 4-aminopyridine in the anesthetized rat. *Journal of Pain*, 1: 2000.

ZHENG, J. H. & CHEN, J. Differential roles of spinal neurokinin 1/2 receptors in development of persistent spontaneous nociception and hyperalgesia induced by subcutaneous bee venom injection in the conscious rat. *Neuropeptides*, 35: 32-44, 2001.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S. M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuroreport*, 7: 895-900, 1996.

ZHOU, Y.; LI, G. D.; ZHAO, Z. Q. State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. *J Neurochem*, 85: 571-80, 2003.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-10, 1983.