

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ÊNFASE EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE**

THAÍS RIBEIRO CRIVELINI

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO
PEPTÍDEO ANÁLOGO A CROTALFINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO**

**SÃO PAULO
2018**

THAÍS RIBEIRO CRIVELINI

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO
PEPTÍDEO ANÁLOGO A CROTALFINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo - USP, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas com Ênfase
em Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Yara Cury, Ph.D. – Instituto Butantan

Co-orientadora: Gisele Picolo, Ph.D. – Instituto Butantan

Colaboradores: Flávia Santa Celícola, Ph.D. – Instituto Butantan

Ana Marisa Chudzinki-Tavassi, Ph.D. – Instituto Butantan

Denis Servant, Ph.D. – DRF/IBITECS, CEA, França

**SÃO PAULO
OUTUBRO - 2018**

Àqueles que dedicaram suas vidas de corpo e alma para me criar. Me proporcionaram apoio em todas as etapas, foram meu porto seguro nos momentos de desespero, me sustentaram mesmo nos momentos difíceis. Me ensinaram o amor, o carinho e a perseverança. Devo grande parte do meu sucesso à vocês. À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Yara Cury, pela oportunidade de estudar sob sua orientação, por ter me auxiliado a alcançar um maior crescimento pessoal, pela confiança depositada em mim e por ser um exemplo de calma e paciência. A Dra. Gisele Picolo, minha co-orientadora, por sempre estar disposta a me ajudar, discutir e melhorar o projeto. A Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi pela colaboração e oportunidade de participação no MBA em Gestão da Inovação em Saúde.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro e institucional, assim como agradeço o Instituto Butantan pela oportunidade de estágio.

Aos criadores, coordenadores e a todos os professores que participaram ativamente da formulação desse curso. Sem a força de vontade de cada um de vocês, para fazer o curso de Ciências Biomédicas crescer cada vez mais, nada disso seria possível! Agradeço pela insistência de professores excelentes em dar o melhor de si para educar de verdade, alguns marcaram minha formação não só pelo conteúdo teórico, mas pelo comprometimento com a docência.

A Flavia Santa-Cecília, primeiramente pelo acolhimento desde o primeiro dia em que cheguei no laboratório, com seu jeitinho mineiro de ser que me ganhou logo de início, pela simpatia e simplicidade. Também pela amizade e convivência que tornaram o meu dia-a-dia mais leve e agradável, por me auxiliar em cada passo deste projeto e principalmente, por estar sempre disposta a me ajudar e discutir cada detalhe do projeto.

A todos que fazem parte do Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS) do Instituto Butantan, pela convivência agradável, pelos momentos em que precisei de ajuda e fui socorrida, pelas risadas e cafés fresquinhos que salvaram o meu dia.

Agradeço principalmente aos meus pais, pelo auxílio ao longo da minha formação, não só financeiro, mas também por terem confiado em mim, por terem colocado suas expectativas esperando o melhor sempre. Nada do que eu alcancei até hoje seria possível sem o apoio emocional que vocês me proporcionaram, sem os valores incrivelmente enriquecedores que me ensinaram e sem o exemplo de superação e garra pra encarar o mundo que me serviu de inspiração para buscar meus sonhos.

Ao Yves, um homem que tenho orgulho de chamar de irmão, meu espelho desde pequena, sempre me serviu de inspiração, esteve sempre disposto a me ajudar no que fosse necessário, compartilhando um pouco do seu vasto conhecimento e experiência de vida. Eu não seria a mesma pessoa sem a tua presença, sem a tua companhia e o carinho imenso que a gente compartilha desde pequenos.

Ao meu melhor amigo e companheiro, que acompanhou minha jornada de perto, desde bem antes de entrar na faculdade. Agradeço muito por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, compartilhando comigo, ao longo dos anos, dessa tua calma e paz interior, fazendo com que a minha vida seja mais feliz e certamente me ajudando a me levantar após minhas derrotas. Grande parte do meu crescimento pessoal veio da nossa convivência juntos, hora vivendo perto, hora vivendo longe, mas o importante é que superamos as barreiras que apareceram e nos fortalecemos.

Aos meus amigos/irmãos, que se tornaram minha família em Ribeirão Preto, me ajudaram nos momentos mais desesperadores, compartilharam não apenas suas vidas comigo, mas também risadas inesquecíveis e momentos incríveis em que me senti plenamente feliz. Posso afirmar com toda a certeza do mundo, que vocês fizeram toda a diferença nesses 4 anos, me ensinaram a construir um lar em uma cidade desconhecida, me mostraram que não precisa de mais nada quando se está em boa companhia e desejando o sucesso um do outro.

RESUMO

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. As dores, especialmente a dor crônica, que acomete cerca de 30% da população mundial adulta, representam problema crescente de saúde pública, por serem debilitantes, constantes e resistentes às terapias disponíveis no mercado. Dessa forma, existe a necessidade do desenvolvimento de estudos visando ampliar a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na dor, bem como o desenvolvimento de novas terapias. Nesse contexto, A Crotalfina (CNF), um peptídeo inicialmente caracterizado e isolado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, tem apresentado atividades promissoras. Este peptídeo induz ação analgésica potente e de longa duração, mediada pela ativação de receptores periféricos canabinóides e opióides. Em estudos preliminares, visando investigar a relação estrutura-atividade da CNF, definir seu farmacóforo e a menor porção ativa deste peptídeo, foi observada, utilizando modelo experimental de hiperalgesia acarretada por carragenina, atividade antinociceptiva para um análogo sintético da crotalfina, o CNFx. Assim, o objetivo do presente trabalho foi ampliar a caracterização do efeito do composto CNFx e os mecanismos envolvidos nesta ação, comparativamente ao efeito da molécula líder (crotalfina). Os resultados mostraram que o análogo, na dose 25 µg/kg induz resposta antinociceptiva de mesma magnitude que a crotalfina na dose 54,3 µg/kg e também apresenta maior duração de ação (6 dias), quando comparado à molécula líder em modelo de dor aguda (induzida por PGE₂). Adicionalmente, por meio da utilização de antagonistas seletivos ou específicos de receptores, foi possível evidenciar que o análogo apresenta o mesmo mecanismo canabinóide/opióide detectado para a crotalfina, neste modelo de hiperalgesia. Além disso, o CNFx na dose de 75 µg/kg apresenta efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática ocasionada por constrição do nervo isquiático (CCI).

Palavras-chave: crotalfina; análogo da crotalfina; efeito antinociceptivo.

ABSTRACT

Pain, as defined by the International Association for the Study of Pain (IASP) is "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage". Chronic pain represents a growing public health problem, since it is frequently debilitating, intense and constant. Furthermore, chronic pain tends to be very difficult to manage by current pharmacological therapies and it is estimated that chronic pain affects 30% of adults in the world. Therefore, it is important to understand the mechanisms involved in pain, as well as the development of more effective treatments. Crotalaphine (CNF) is a novel molecule endowed with analgesic activity, first identified and isolated from the venom of the South America rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Crotalaphine induces a potent and long lasting antinociceptive action, mediated by activation of cannabinoid and opioid receptors. Our group, in collaboration with the Institute of Biology and Technology Saclay (IBITECS-DRF)/Center of Atomic Energy (CEA) in France, have been carrying out studies on structure-activity relationship aiming at defining crotalaphine's pharmacophore and solve its 3D structure. In these studies, one of the analogues that was tested (CNFx) presented, in initial studies, a potent and long lasting antinociceptive effect when orally administrated in a model of hyperalgesia induced in mice, by carrageenin. Based on these preliminary data, the aim of this work was to further characterize the antinociceptive effect of compound CNFx, evaluating the time-course of the analgesic activity and also, the mechanisms involved in this effect (by the use of selective opioid and cannabinoid receptors antagonists). The lead molecule, crotalaphine, was used as positive control. The results have shown that the CNFx, when administrated in a dose of 25 µg/kg, induces antinociception in the model of hyperalgesia induced by PGE₂, similar to that induced by crotalaphine (54,3 µg/kg) and presents a longer effect (6 days) as compared to the lead molecule (5 days). Studies on the mechanisms involved in the antinociceptive effect of the analogue have indicated the involvement of cannabinoid and opioid receptors. Furthermore, the CNFx (75 µg/kg) showed antinociceptive effect when evaluated in an experimental model of neuropathic pain induced by chronic constriction of rat sciatic nerve.

Keywords: crotalaphine; crotalaphine analogue; antinociceptive effect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Sequência de Aminoácidos da CNF;
- Figura 2: Padronização da dose de crotalfina (CNF);
- Figura 3: Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória;
- Figura 4: Efeito do CNFx na presença ou ausência da PGE₂;
- Figura 5: Comparação do efeito antinociceptivo da crotalfina e seu análogo, para as diferentes doses testadas;
- Figura 6: Análise da duração do efeito do CNFx;
- Figura 7: Envolvimento de receptores canabinóides no efeito antinociceptivo do CNFx;
- Figura 8: Envolvimento de receptores opioides no efeito antinociceptivo do CNFx;
- Figura 9: Envolvimento da dinorfina A no efeito antinociceptivo do CNFx;
- Figura 10: Análise do quadro de neuropatia;
- Figura 11: Avaliação do efeito da crotalfina e seu análogo em modelo de dor neuropática.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
SNC - Sistema Nervoso Central
DRG - gânglio da raiz dorsal da medula espinal
GABA - ácido gama-aminobutírico
PGE₂ - prostaglandina E₂
AMPc - adenosina monofosfato cíclico
k, δ - receptores opióides do tipo *kappa* (k) e *delta* (δ)
CNF - crotalfina
kDa - kilodalton
CB₂ - receptores canabinóides
°C – graus Celcius
CEUAIB - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
ng - nanogramas
μl - microlitros
μg - microgramas
ml - mililitros
CCI - constrição crônica do nervo isquiático
cm - centímetros
g/s – gramas por segundo
μg/kg – microgramas por quilogramas de peso
DMSO - dimetilsulfóxido
via i.pl. – via intraplantar
v.o – via oral
Nor – BNI - Norbinaltorfimina
AM630 - antagonista seletivo de receptores canabinóides CB₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Dor - Considerações Gerais	12
1.2 Agentes indutores de hipernocicepção	17
1.3 Crotalfina	18
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Modelo experimental de hiperalgesia inflamatória	24
3.3 Modelo experimental de dor neuropática	25
3.4 Avaliação da hiperalgesia em ratos	25
3.5 Tratamentos Farmacológicos	26
3.5.1 Crotalfina (CNF) (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil)	26
3.5.2 Análogo da crotalfina CNFx	26
3.5.3 Antagonistas e Anticorpos	27
3.6 Delineamento Experimental in vivo	28
I. Padronização da dose de Crotalfina (CNF)	28
II. Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória	28
III. Efeito antinociceptivo do CNFx na presença ou ausência da PGE ₂	29
IV. Comparação do efeito antinociceptivo da crotalfina e seu análogo, para as diferentes doses testadas	29
V. Análise da duração do efeito do CNFx	29
VI. Análise do mecanismo de ação do CNFx	30

VII.	Análise do efeito antinociceptivo do CNFx em modelo de dor crônica	
	31	
3.7	Análise Estatística	32
4.	RESULTADOS	33
I.	Padronização da Dose de Crotalfina (CNF)	33
II.	Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória	34
III.	Efeito antinociceptivo do CNFx na presença ou ausência da PGE ₂	
	35	
IV.	Comparação do efeito antinociceptivo da crotalfina e seu análogo, para as diferentes doses testadas	36
V.	Análise da duração do efeito do CNFx	37
VI.	Análise do mecanismo de ação do CNFx	39
VII.	Análise do efeito antinociceptivo do CNFx em modelo de dor neuropática	42
5.	DISCUSSÃO	45
5.1	Padronização da dose da crotalfina	45
5.2	Desenvolvimento do CNFx	45
5.3	Efeito Antinociceptivo do CNFx	46
5.4	Comparação do análogo com a crotalfina	47
5.5	Mecanismos e tempo de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do análogo	48
5.6	Modelo de dor crônica neuropática	49
6.	CONCLUSÕES	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor - Considerações Gerais

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), define essa sensação de dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial”. Assim, pode-se dizer que a dor é a “percepção desagradável de uma sensação nociceptiva” (noci: nocivo; cepção: recepção); já a nocicepção é a definição do mecanismo pelo qual os estímulos periféricos nocivos ou de dano são transmitidos ao Sistema Nervoso Central (SNC). Dessa forma, a dor inclui não apenas a percepção consciente de um evento sensorial, mas também a interpretação cognitiva e resposta emocional associada à experiência da dor (Julius & Basbaum, 2001; Sandkuhler, 2009). Dessa forma, a caracterização da dor deve levar em consideração seus diferentes aspectos e a forma como é processada, levando em conta a natureza da dor – fisiológica ou patológica.

A dor é uma experiência humana universal que a curto prazo serve como um sinal de alerta para a proteção contra uma lesão específica, ou pode ocorrer após ferimento ou injúria (Deuis Jennifer R. et al., 2017). A função da dor nestes casos é interromper de forma imediata qualquer estímulo de injúria ao local anteriormente lesionado, para evitar maiores danos durante o processo de cicatrização ou recuperação (Deuis Jennifer R. et al., 2017). A relevância desta resposta protetora é mais evidente nos indivíduos que sofrem de uma condição genética rara que resulta na ausência de dor ou incapacidade de experimentar a percepção desagradável de um estímulo nocivo. A falta da resposta de dor pode levar a frequentes ferimentos nestes indivíduos, que consequentemente se expõem a situações de alto risco e frequentemente vem a óbito muito cedo (Deuis Jennifer R. et al., 2017).

Estímulos nocivos de diversas modalidades são transmitidos por um conjunto de fibras especializadas que possuem terminações sensoriais livres, os chamados nociceptores, presentes nos tecidos periféricos e que tem a função de codificar os estímulos nocivos para que essa informação chegue até o SNC. Os neurônios que compõem esse primeiro sinal são pseudounipolares, possuem um axônio que se dirige a região periférica, um corpo celular localizado no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) e outro axônio que se dirige ao SNC. Os neurônios aferentes primários são os responsáveis pela detecção do estímulo nociceptivo, condução do impulso da periferia até corno dorsal da medula onde fazem a primeira sinapse do sistema de transmissão da dor e levam a informação para neurônios secundários (transmissão sináptica) (Schaible, HG. & Richter, 2004). Na medula espinal, onde ocorre a primeira sinapse, o estímulo é conduzido até o tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral para serem interpretados como uma informação dolorosa (Schaible, HG. & Richter, 2004).

Existem diferentes tipos de fibras, dentre elas, se destacam as fibras desprovidas de mielina ou de baixa velocidade de condução (tipo C), também caracterizadas como nociceptores polimodais, uma vez que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos; e as fibras mielinizadas denominadas A δ , que conduzem mais rapidamente os impulsos elétricos e são subdivididas em duas classes: tipo I (nociceptores mecânicos de alto limiar), que respondem bem a estímulos mecânicos e químicos, mas que respondem a temperaturas relativamente altas ($>50^{\circ}\text{C}$) e tipo II, que possuem menor limiar de ativação pelo calor, mas apresentam limiar alto para estímulos mecânicos (Basbaum et al, 2009). As propriedades físico-químicas dos diversos estímulos nocivos tais como calor, frio extremo, pressão e estímulos nocivos químicos, são convertidas em atividade elétrica

por meio de sensores específicos. Essa atividade elétrica é amplificada pelos canais de sódio dependentes de voltagem, para gerar potenciais de ação (Basbaum et al, 2009). As fibras aferentes nociceptivas transmitem os estímulos nocivos até o corno dorsal da medula espinal, onde ocorre a sinapse com os neurônios de segunda ordem, e antes que essa informação chegue até o cérebro, ocorre uma modulação (inibitória e/ou excitatória) até que ela seja interpretada como um estímulo doloroso (Rohini Kuner, 2010).

Pode-se denominar dor aguda como como um evento de início rápido, bem definido e de rápida duração e está associada a lesões teciduais em resposta a um estímulo nocivo, que pode ter sido induzido por traumas, inflamação, infecções, entre outras causas e desaparece com a resolução do processo (Chen Z., et al., 2017; Xiao X & Zhang YQ, 2018). Tradicionalmente define-se um quadro de dor crônica, quando um processo doloroso ainda persevera mesmo após a resolução de sua causa, ou seja, dor sem valor biológico aparente que persiste além do período comum esperado para o processo de cicatrização (3 meses). Porém, as definições convencionais não levam em consideração o complexo conjunto de mecanismos e suas distinções nos processos de dor fisiológica (aguda) e patológica (crônica) assim como a transição de uma para a outra (Morlion B, et al., 2018).

A dor crônica possui um enorme impacto negativo na qualidade de vida, disposição, produtividade e força de trabalho, além de gerar um grande gasto em saúde (Morlion B, et al., 2018). Este quadro está associado à lesão prolongada, processos patológicos crônicos ou injúria do SNC e pode resultar da alteração das vias nociceptivas, incluindo mudanças na expressão de receptores, transmissores e canais iônicos. A dor crônica representa crescente problema de saúde pública, é frequentemente debilitante, intensa, constante e muitas vezes, resistente às terapias

disponíveis (Cohen & Mao, 2014). Além disso, estima-se que a dor crônica afete cerca de 30% dos adultos em todo o mundo, fazendo-se necessária a busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos que não causem resistência, como as disponíveis atualmente no mercado (Johannes et al., 2010, Ji et al., 2014).

A dor crônica compreende vários tipos de dor, incluindo dor inflamatória crônica, dor do câncer e dor neuropática (Dworkin et al., 2010; Kalso et al., 2005), caracterizando-se pela presença de hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo previamente doloroso), dor espontânea (resposta dolorosa mesmo na ausência de um estímulo) e alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente não dolorosos, como o toque) (Woolf & Mannion, 1999; Austin & Moalem Taylor, 2010).

Do ponto de vista fisiológico, existe uma diferença clara entre processo nociceptivo de dor – que se origina no tecido em resposta ao estímulo de um nociceptor – e o processo de dor neuropática – que tem origem tanto no sistema periférico quanto no SNC como resultado de um dano na fibra nervosa ou inflamação. Em ambos os casos, os estímulos nociceptivos são gerados via neurônios e enviados para a medula espinal por meio de neurotransmissores excitatórios – aumentam a dor (glutamato) e/ou inibitórios – reduzem a dor (ácido gama-aminobutírico [GABA]). A sensibilização periférica ou central pode resultar no aumento dos estímulos nociceptivos que serão interpretados e podem modificar a percepção da dor (Morlion B, et al., 2018).

Como resultado de uma inflamação ou lesão, ocorrem alterações no sistema nociceptivo – nociceptores – com a consequente sensibilização de seus terminais. Este processo é caracterizado pela hipersensibilidade e aumento da resposta a estímulos químicos, térmicos ou mecânicos e atividade espontânea do neurônio (geração de potenciais de ação espontâneos, alterações na expressão e tráfego de

proteínas nos corpos celulares) que resulta na alteração da organização estrutural das sinapses na medula espinal (Morlion B, et al., 2018). Alterações similares também ocorrem a nível da medula espinal e cérebro, envolvendo neurônios centrais e também células da glia, de forma que tais alterações promovam a facilitação de respostas a estímulos periféricos. Neste caso, o limiar basal capaz de gerar dor sofre uma redução na sua amplitude e duração o que resulta na maior percepção da dor. Clinicamente, quando estímulos táteis que não causavam dor anteriormente se tornam dolorosos, diz-se que o paciente possui quadro de alodinia ou então quando o paciente experimenta dor mais intensa do que geralmente esperada para determinado estímulo, caracteriza-se o processo de hiperalgesia (Morlion B, et al., 2018).

Estes dados em conjunto, apontam para a importância da realização de estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, que possibilitem a ampliação do conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos nos processos nociceptivos, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos, com maior eficácia e menor intensidade de efeitos adversos. Os estudos de dor em humanos são de difícil performance, extremamente subjetivos e limitados por questões éticas, levando ao inevitável uso de animais, que apesar de não apresentarem a capacidade de comunicar verbalmente a ocorrência de dor, quando submetidos a um estímulo reconhecidamente nociceptivo, exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos (Sandkuhler, 2009).

Modelos experimentais comportamentais de avaliação de dor em animais, tem sido amplamente utilizados para o estudo dos mecanismos envolvidos na nociceção e seu controle. A partir da avaliação de parâmetros já bastante definidos e aceitos

para estes modelos, é possível inferir que um animal está experimentando uma resposta nociceptiva. Portanto, o termo nocicepção engloba respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, dissociado do caráter cognitivo-afetivo da resposta (Wieseler-Frank et al., 2004).

1.2 Agentes indutores de hipernocicepção

Existem diferentes métodos para a indução da hipernocicepção utilizados experimentalmente, sendo um deles realizado por meio de agentes que aumentam a sensibilidade à dor, ou seja, agentes indutores de hipernocicepção. A escolha deste agente deve levar em consideração o modelo experimental de hiperalgesia a ser utilizado, o método de avaliação de hipernocicepção e também o modelo animal escolhido.

A carragenina e a prostaglandina E₂ (PGE₂) têm sido utilizados como agentes indutores de hipernocicepção pois atuam na via inflamatória, sendo um agente inflamatório e um mediador inflamatório, respectivamente. A carragenina induz uma sensibilização de nociceptores, ou seja, atua como um componente periférico e também possui componente central com a participação de circuitos centrais de dor. A prostaglandina atua também na sensibilização de nociceptores de forma a reduzir o limiar de dor e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal. Esta sensibilização ocorre por meio da ativação de mensageiros secundários da inflamação, tais como adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e proteínas quinases (PKA e PKC). A fosforilação subsequente de canais dependentes de sódio e inibição de canais dependentes de potássio são responsáveis pela alteração do potencial de repouso que leva à redução do limiar nociceptivo e aumento de excitabilidade da membrana (Verri-Jr et al., 2006).

A hipernocicepção pode ser classificada de acordo com a sua duração (imediata, tardia, intermitente ou persistente), esta classificação está relacionada à intensidade e tipo de estímulo. Em modelos experimentais que utilizam o método de pressão de pata conforme descrito por Randall e Selitto (1957), a aplicação de um estímulo mecânico evoca um comportamento nociceptivo de retirada de pata que pode ser detectado minutos ou horas após a administração do agente indutor de hiperalgesia. Quando utilizada a PGE₂ via intradérmica o tempo de sensibilização é de 15 minutos após a administração, enquanto que a via subcutânea causa um efeito mais tardio de hipernocicepção, sendo seu pico de ação detectado após 3h de administração (Verri-Jr et al., 2006).

1.3 Crotalfina

Os estudos que levaram à descoberta da crotalfina tiveram sua origem no início do século passado, com a observação de que o veneno de determinadas espécies de cobras era capaz de induzir um efeito analgésico em seres humanos assim como em modelos experimentais de dor aguda. Dentre eles, o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel, se destacou como potencial objeto de estudo para análise de suas propriedades (Brasil, 1934; 1950).

Como resultado destes estudos, mostrou-se que a administração oral do veneno em camundongos ou ratos (200 – 1600 µg/kg) induz efeito antinociceptivo mediado pela ativação de receptores opioides do tipo *kappa* (k) e/ou *delta* (δ) (Giorgi et al., 1993; Picolo et al., 1998; Picolo; Giorgi; Cury, 2000; Picolo et. al., 2003; Picolo & Cury, 2004). A ativação destes receptores juntamente com a ativação periférica da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais de potássio dependentes de ATP, caracterizam mecanismo molecular importante para o efeito antinociceptivo

periférico do veneno (Giorgi; Cury, 2000; Picolo et. al., 2003; Picolo & Cury, 2004).

Além disso, apesar do envolvimento de receptores opióides, o efeito antinociceptivo do veneno em modelo de hipernocicepção induzida por carragenina não apresentou relação com sintomas caracterizados por síndrome de abstinência (Brigatte et.al., 2001).

Uma vez que resultados promissores indicando potente efeito antinociceptivo e de longa duração do veneno crotálico, quando avaliado em modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (Giorgi; Cury, 2000; Brigatte et.al., 2001; Picolo et. al., 2003; Picolo & Cury, 2004), foi realizado o processo de purificação e caracterização do composto responsável por tal efeito. Os estudos de purificação levaram à identificação da crotalfina (CNF), um peptídeo de 14 aminoácidos, contendo uma ponte dissulfídica e um ácido piroglutâmico (<E F S P E N C Q G E S Q P C>), com aproximadamente 1,5 kDa. A CNF foi isolada e quimicamente caracterizada do veneno crotálico da cascavel, dando origem à sequência mostrada na Figura 1. A sequência é idêntica à cadeia γ da crotapotina, a subunidade não tóxica, não enzimática e acídica da crotoxina, principal neurotoxina presente no veneno crotálico (Aird et al., 1990; Bon et al., 1989).

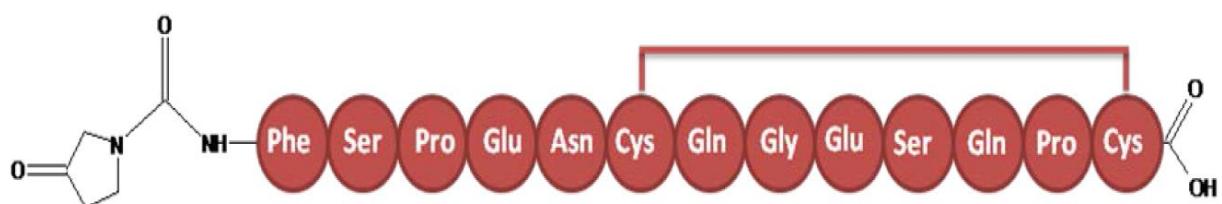


Figura 1 – Sequência de Aminoácidos da CNF – Fonte: Velhote FB, PhD Thesis, 2013.

A CNF, administrada em baixas doses por via oral, intravenosa ou intraplantar, exibe potente efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor aguda e crônica. Esse efeito é de longa duração, sendo observado por 2-3 dias após a administração de uma única dose, em modelo experimental de câncer ósseo ou de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático, respectivamente, (Gutierrez VP, PhD Thesis, 2013; Gutierrez et al, 2008), e de até 5 dias quando utilizada em modelo de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (Konno et al., 2008).

Embora a estrutura química não se assemelhe a nenhum peptídeo opióide conhecido, os estudos revelam que o efeito antinociceptivo da CNF é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo *kappa* e/ou *delta* (Konno et al, 2008; Gutierrez et al., 2008). Ademais, estudos realizados utilizando modelo inflamatório agudo induzido por carragenina, demonstraram a participação, no efeito analgésico da CNF, de receptores canabinóides CB₂ e subsequente liberação de dinorfina A, um agonista endógeno de receptores κ-opióides. Estes dados em conjunto, demonstram interação entre os sistemas opióide e canabinóide no mecanismo de ação deste peptídeo (Machado et al, 2014).

Quando administrada perifericamente, no modelo de sensibilização por prostaglandina E₂ (PGE₂) ou constrição do nervo isquiático de ratos, a CNF, da mesma forma que os agonistas opióides, altera a conformação tridimensional dos receptores opióides presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no nervo safeno isolado da pata de ratos, indicando a ativação desses receptores pelo peptídeo (Zambelli et al. 2014). Adicionalmente, a CNF destaca-se pela ausência do aparecimento de tolerância ao seu efeito antinociceptivo e por não induzir o desenvolvimento de hiperalgesia tardia (Pereira LM & Cury Y), após o uso prolongado

(Gutierrez et al., 2008), e também pela ausência de alterações na motilidade gastrointestinal (dados não publicados), diferentemente do que acontece com fármacos opioides como a morfina (Angst MS, Clark JD 2006).

Em estudo envolvendo concentrações nanomolares de CNF, demonstrou-se a ativação e dessensibilização de canais TRPA1, sendo esse mecanismo essencial para o efeito antinociceptivo demonstrado em modelos *in vivo*. Os dados deste estudo suportam a hipótese de que os mecanismos relacionados ao efeito antinociceptivo da CNF estão atrelados à ativação de canais TRPA1 que possivelmente levam ao aumento de cálcio que consequentemente serve de gatilho para a translocação de receptores opioides até a membrana da célula nervosa. Dessa forma, o aumento da expressão destes receptores opioides levam ao aumento da capacidade de ligação de opioides endógenos, contribuindo para o efeito antinociceptivo da CNF (Bressan et. al., 2016).

Tendo em vista os diversos estudos realizados com a CNF e a dificuldade em definir os mecanismos diretos de seu efeito, a busca pela determinação de seu farmacóforo e relação estrutura-atividade se fez necessária. Para atingir tais objetivos e determinar a menor sequência ativa da crotalina, vêm sendo realizada uma colaboração entre o Laboratório Especial de Dor e Sinalização em e o DRF/ Centro de Energia Atômica (CEA) da França. Com base no exposto, diferentes tipos de peptídeos análogos da CNF foram sintetizados e testados em modelo de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos (dados não publicados). Foram sintetizados 8 análogos que correspondem tanto à uma porção da molécula líder (crotalina), como também compostos que sofreram modificação pontual de apenas um aminoácido – substituição por alanina (repetindo este processo para outros aminoácidos da cadeia da CNF).

Inicialmente, avaliou-se o efeito da CNF sintetizada pelo CEA, administrada por via oral, comparando com o efeito da CNF sintetizada pela empresa American Peptide Company Inc, EUA. Os resultados mostraram que ambas as moléculas inibem a hiperalgesia induzida em camundongos, pela carragenina, por todo o período de observação (3 e 72 h), confirmando a longa duração da ação antinociceptiva do peptídeo. O estudo com os análogos mostrou que os aminoácidos F, N, P e Z (Fenilalanina, Asparagina, Prolina e Glutamina) são fundamentais para o efeito antinociceptivo do peptídeo (dados não publicados). Ainda, dados preliminares utilizando um peptídeo análogo denominado CNFx (uma vez que esse análogo é objeto de depósito de patente, a sua sequência não está sendo informada neste documento), mostraram que este análogo apresenta potente efeito antinociceptivo e de longa duração. Dessa forma, tornou-se importante ampliar a avaliação do efeito antinociceptivo do composto CNFx em outros modelos experimentais de dor e confirmar o mecanismo canabinóide/opiôide já conhecido para a molécula mãe (crotalfinina).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo do análogo da crotalina CNFx em modelo de dor inflamatória aguda (hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂), determinando a curva dose-resposta, duração de ação e os mecanismos farmacológicos envolvidos nesta ação, com o intuito de comparar a atividade do análogo à da molécula líder crotalina. Além disso, visando avaliar o potencial terapêutico, comparativamente à crotalina, foi investigado o efeito antinociceptivo do análogo CNFx em modelo experimental de dor crônica neuropática (constrição do nervo isquiático de ratos).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito antinociceptivo do peptídeo sintético CNFx, administrado via oral, por meio de estudos dose-resposta e a duração deste efeito, em modelo de hiperalgesia inflamatória acarretada em ratos por prostaglandina E₂;
- b) Avaliar o envolvimento dos sistemas canabinóide e opióide no efeito antinociceptivo do CNFx, por meio do uso de antagonistas seletivos e específicos destes receptores e de anticorpos anti-peptídeos opióides endógenos;
- c) Avaliar o efeito analgésico do peptídeo CNFx utilizando modelo de dor crônica neuropática acarretada pela constrição do nervo isquiático de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os estudos envolvendo modelo comportamental de avaliação de dor, foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 180-200 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os ensaios experimentais foram realizados entre as 9:00 e 16:00 h. Estes animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C}\pm1$) e ciclo claro-escuro (12/12h). Todos os procedimentos estão de acordo com as orientações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), além disso, foram feitos os devidos esforços para reduzir o número de animais a serem utilizados. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob protocolo de número 5000011217.

3.2 Modelo experimental de hiperalgesia inflamatória

A hiperalgesia foi induzida nos animais, por meio da injeção intraplantar de prostaglandina PGE₂ (100 ng/ 50μl) na pata posterior direita. O limiar de dor dos animais foi avaliado antes e 3 h após a injeção do estímulo, utilizando-se o teste de pressão da pata de ratos conforme descrito por Randall e Selito (1957).

Inicialmente, uma solução estoque de PGE₂ foi preparada, dissolvendo-se 500 μg de prostaglandina E₂ em 1 ml de etanol. No momento do uso, essa solução estoque foi novamente diluída em salina estéril, para a obtenção da dose de 100 ng/pata de PGE₂.

3.3 Modelo experimental de dor neuropática

O modelo experimental de dor neuropática utilizado neste estudo - constrição crônica do nervo isquiático (CCI) - foi descrito em ratos (Bennett GJ and Xie YK, 1988) e também em camundongos (Benbouzid M et al., 2008). Os animais foram primeiramente submetidos à anestesia inalatória (isoflurano a 2%). O pelo da região da coxa traseira foi retirado, realizou-se a assepsia da pele da superfície da coxa traseira dos animais; em seguida foi realizada incisão de 0,5 cm paralela ao fêmur e 1,5 cm anterior ao fêmur, e o músculo femoral divulsionado, expondo o ramo principal do nervo isquiático. Em seguida, foram realizadas quatro amarraduras de fio de sutura (Catgut Cromado) ao redor do ramo principal do nervo isquiático, de forma a comprimir levemente o nervo. As ramificações tibial, sural e peroneal comum do nervo isquiático permaneceram intactas e preservadas. Em seguida, o músculo e a pele foram suturados com fio de sutura adequado. Os grupos experimentais controle foram compostos por animais falsamente operados (Sham), ou seja, foi realizada incisão na pele, divulsionamento do músculo femoral e exposição do nervo isquiático de modo similar ao grupo CCI, porém sem qualquer realização de amarradura desse nervo, apenas a manipulação do nervo. A seguir, o músculo e a pele foram suturados.

3.4 Avaliação da hiperalgesia em ratos

A avaliação da hiperalgesia em ratos foi realizada utilizando o modelo de pressão da pata de ratos conforme descrito por Randall e Selito (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar nociceptivo é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado antes

(medida basal) e 3 h após a administração de prostaglandina em modelo de hiperalgesia inflamatória; ou antes e 3, 7, 14 e 15 dias após a constrição do nervo isquiático (modelo de dor crônica neuropática). Os resultados foram analisados por meio da comparação das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.5 Tratamentos Farmacológicos

3.5.1 Crotalfina (CNF) (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil)

O peptídeo foi obtido por síntese em fase sólida, utilizando estratégia Fmoc (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil), pureza 98%. A CNF foi mantida a -20°C e diluída em salina estéril para a administração por via oral (nas doses de 25; 50; 54,3 e 75 µg/kg) no momento do uso. Para a determinação da dose de CNF a ser utilizada, foi realizada uma padronização, a partir de dados anteriores obtidos pelo nosso grupo, mostrando a efetividade deste peptídeo em modelos experimentais de nocicepção (Zambelli et al. 2014).

3.5.2 Análogo da crotalfina CNFx

Molécula análoga à crotalfina, cuja sequência de aminoácidos corresponde apenas a uma porção da molécula líder, foi sintetizada e fornecida pelo Centro de Energia Atômica – CEA, França. O CNFx foi administrado sempre por via oral. Uma vez que este análogo é objeto de depósito de patente, a sua sequência não está sendo informada no presente documento. O análogo foi mantido a -20°C e diluído em salina estéril para a administração no momento do uso. Neste estudo, foi realizada curva dose (2,5; 5 e 25 µg/kg) - e tempo-resposta em modelo de hiperalgesia

inflamatória. Além disso, utilizou-se o análogo nas concentrações 50, 75 e 100 µg/kg em modelo de dor crônica neuropática.

3.5.3 Antagonistas e Anticorpos

Neste estudo, foi avaliado, para o análogo CNFx, o envolvimento dos sistemas canabinóide e opióide no efeito antinociceptivo, uma vez que estes sistemas estão envolvidos no efeito da Crotalfina. Para tanto, foi investigado o envolvimento, por meio do uso de antagonistas seletivos e específicos, de receptores canabinóides CB₂, opióides do tipo κ e, por meio da utilização de anticorpo, o envolvimento da dinorfina A endógena. Os antagonistas e anticorpo estão descritos abaixo:

- **AM630**, antagonista seletivo de receptores canabinóides CB₂ (Sigma-Aldrich, USA), reconstituído em DMSO e posteriormente diluído em água destilada, e administrado por via i.pl. (50 µg por pata, em 50 µl - Machado *et al*, 2014), 30 minutos antes do análogo da crotalfina (CNFx).
- **Norbinaltorfimina (Nor – BNI)**, antagonista específico de receptor opióide do tipo κ (Sigma-Aldrich, USA), reconstituído em DMSO e posteriormente diluído em salina e administrado por via i.pl. (50 µg/50 µl), administrado imediatamente antes do análogo da crotalfina (CNFx); (Zambelli *et al*, 2014).
- **Anticorpo anti-dinorfina A** (Sigma-Aldrich, USA), foi utilizado para analisar a participação do peptídeo endógeno dinorfina. O anticorpo foi diluído em salina e administrado por via i.pl. (1 µg/50µl por pata) (Machado et al, 2013), 15 minutos antes do análogo da crotalfina (CNFx). Estudos anteriores mostraram que a dinorfina A é a molécula fundamental para o efeito antinociceptivo da CNF (Machado *et al*, 2014).

3.6 Delineamento Experimental in vivo

I. Padronização da dose de Crotalfina (CNF)

Estudos prévios foram realizados para o delineamento das doses de crotalfina (CNF) a serem utilizadas neste trabalho. Esta etapa foi necessária, uma vez que as doses de crotalfina utilizadas atualmente pelo grupo, nos diferentes ensaios experimentais de dor, tiveram que ser aumentadas, em relação às doses inicialmente padronizadas. As razões para essa alteração ainda não são totalmente conhecidas, mas houve mudança da empresa que sintetiza a CNF, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para esta alteração. Dessa forma, foram realizados experimentos, testando-se as doses de 25 e 50 µg/Kg do peptídeo. Neste experimento, a PGE₂ foi administrada por via intraplantar, em ratos, e a CNF por via oral, 2 h após a PGE₂. Animais tratados com salina por via oral, nas mesmas condições experimentais, foram utilizados como controle.

II. Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória

Neste estudo, foram avaliadas três doses do análogo. Para tanto, 40 animais foram sensibilizados por injeção intraplantar de prostaglandina E₂ e divididos em 4 grupos, que foram então tratados, por via oral com: salina (grupo controle); CNFx - dose 2,5 µg/Kg; CNFx - dose 5 µg/Kg e CNFx - dose 25 µg/Kg. A hiperalgesia foi determinada 3 h após a injeção do eicosanoide.

III. Efeito antinociceptivo do CNFx na presença ou ausência da PGE₂

Baseado em dados anteriores, mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalfina só é detectado na presença de um estímulo lesivo (Zambelli et al., 2014), foi presentemente realizado um estudo adicional para avaliar o efeito do análogo sobre o limiar nociceptivo dos animais, na presença ou ausência da injeção intraplantar de PGE₂. A PGE₂ ou salina foram administradas por via intraplantar, e o análogo, por via oral, 2 h após a PGE₂ ou salina. O limiar nociceptivo foi determinado antes e 3 h após a injeção do eicosanoide ou salina.

IV. Comparação do efeito antinociceptivo da crotalfina e seu análogo, para as diferentes doses testadas

Para este estudo, foi determinada a concentração molar dos peptídeos, baseado nos efeitos encontrados nos estudos citados acima. Da mesma maneira como descrito nos experimentos anteriores, a PGE₂ foi administrada por via intraplantar, enquanto o análogo e a crotalfina, por via oral, 2 h após a PGE₂. A hiperalgesia foi determinada antes e 3 h após a injeção do eicosanoide.

V. Análise da duração do efeito do CNFx

De acordo com dados obtidos anteriormente pelo grupo, mostrando que a crotalfina apresenta efeito antinociceptivo de longa duração (até 5 dias) (Konno et al., 2008), avaliamos presentemente, a duração da ação antinociceptiva do análogo. Neste estudo, todos os animais foram tratados com o CNFx, por via oral, na dose de 25 µg/Kg e divididos em 04 grupos (grupos 24, 72, 120 e 144 h após a administração do análogo – 05 animais por grupo), para posterior avaliação da hiperalgesia. Para cada tempo analisado, um grupo adicional de 5 animais tratados com salina (grupo

controle), nas mesmas condições experimentais, foi também utilizado. Três horas antes de cada tempo (ou seja, 21, 69, 117 e 141 h após a administração do análogo), a prostaglandina E₂ foi administrada por via intraplantar e a hiperalgesia determinada na terceira hora após a injeção do eicosanoide. Este protocolo está baseado no protocolo utilizado para a crotalfina, de acordo com Konno *et al.* (2008).

A partir dos resultados nessa primeira série de experimentos, fez-se necessária a realização de uma segunda etapa de ensaios para a análise do efeito do CNFx em 120, 144 e 168 h após os tratamentos. Essa segunda etapa foi realizada da mesma maneira que a primeira, sendo que o total de animais tratados inicialmente com o análogo foi de 20 animais e mais 20 tratados com salina (controles). Três horas antes de cada tempo (ou seja, 117, 141 e 165 h), prostaglandina foi administrada por via intraplantar e a hiperalgesia determinada na terceira hora após a injeção do eicosanoide.

VI. Análise do mecanismo de ação do CNFx

Baseado em dados anteriores mostrando que o efeito da crotalfina, no modelo de hiperalgesia inflamatória é mediado por receptores canabinóide do tipo CB2, liberação de dinorfina A e ativação de receptores κ-opioides (Machado *et al.*, 2014), avaliamos presentemente o envolvimento dos sistemas canabinóide e opioide da ação do análogo. Para a análise do mecanismo de ação do CNFx, o experimento foi dividido em 3 etapas, cada uma utilizando um antagonista/anticorpo diferente. Cada experimento foi constituído por 4 grupos experimentais, a saber: grupo salina; grupo tratado com CNFx; grupo tratado com CNFx + antagonista de receptor opióide do tipo κ ou canabinóide do tipo CB2, ou anticorpo anti-dinorfina A; grupo salina + antagonista de receptor opióide do tipo κ ou canabinóide do tipo CB2, ou anticorpo anti-dinorfina

A. Neste experimento, a PGE₂ foi administrada por via intraplantar e o CNFx, por via oral, 2 h após a PGE₂. Os antagonistas foram administrados por via intraplantar - sendo o antagonista do receptor κ (Nor-BNI) ou o antagonista do receptor CB₂ (AM630), injetados, respectivamente, imediatamente antes ou 30 minutos antes do análogo. Nos experimentos utilizando o anticorpo anti-dinorfina A, este foi administrado 15 minutos antes do análogo. A hiperalgesia foi determinada 3 h após a injeção do eicosanoide.

VII. Análise do efeito antinociceptivo do CNFx em modelo de dor crônica

Neste experimento foram utilizados 25 animais, em que 20 animais foram submetidos a cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) e divididos em 4 grupos experimentais, a saber: grupo tratado com salina, grupo tratado crotalfina (dose 75 µg/Kg; grupo tratado com CNFx (dose 75 µg/Kg); grupo tratado com CNFx (dose 100 µg/Kg). Os 5 animais restantes correspondem aos animais ‘falsamente operados’ (Sham). Estes animais foram classificados em um 5º grupo de animais ‘sham’, que receberam salina, por via oral, como tratamento. Os tratamentos foram realizados no 14º dia pós cirurgia. A hiperalgesia foi determinada antes da cirurgia (limiar basal) e no 3º, 7º, 14º dias após cirurgia. No 14º dia, a hiperalgesia foi avaliada antes e 1 h após os tratamentos. Para avaliar a duração do efeito antinociceptivo do CNFx, a presença de hiperalgesia foi determinada também no 15º dia do pós-operatório, correspondendo ao período de 24 h após o tratamento com o análogo.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) por grupo de cinco animais. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), associada ao teste de Tukey. Quando comparados dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Tais análises estatísticas assim como a construção dos gráficos foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc., EUA).

4. RESULTADOS

I. Padronização da Dose de Crotalfina (CNF)

Conforme descrito anteriormente no protocolo experimental, foram testadas as doses de 25 e 50 µg/kg da crotalfina. É possível observar no gráfico abaixo (Figura 2), que a administração intraplantar de PGE₂ e tratamento com salina acarretou diminuição significativa do limiar nociceptivo, quando comparado à medida inicial, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Por outro lado, o tratamento dos animais com a crotalfina (CNF), em ambas as doses testadas, acarretou reversão da hiperalgesia induzida pela PGE₂. Não foi detectada diferença significativa no efeito antinociceptivo de ambas as doses do peptídeo.

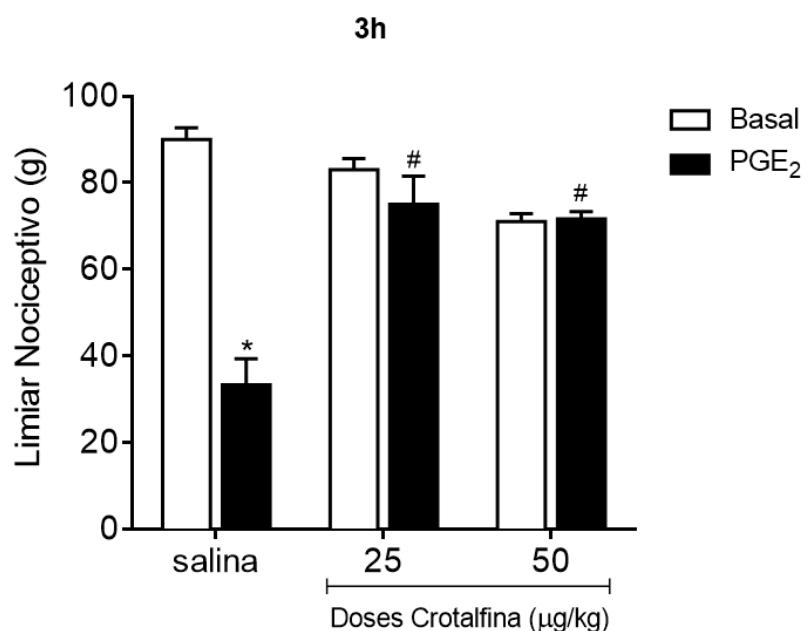


Figura 2 - Padronização da dose de crotalfina (CNF). Ratos foram submetidos à administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. Duas horas após a injeção, os animais foram submetidos aos tratamentos: salina (v.o.; controle); CNF (25 µg/kg, v.o.) e CNF (50 µg/kg, v.o.). O limiar nociceptivo foi avaliado pelo modelo de pressão da pata conforme descrito por Randall e Selito (1957) antes e 3 h após a injeção da PGE₂. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. * p<0.05; quando comparado ao seu basal e # p< 0.05; quando comparado ao grupo salina pós-PGE₂.

II. Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória

O protocolo experimental foi realizado como descrito anteriormente e todos os animais foram injetados com PGE₂. Como apresentado na Figura 3, o tratamento dos animais com salina, por via oral (grupo controle), não interferiu com a hiperalgesia acarretada pela prostaglandina E₂. Por outro lado, o tratamento com o análogo da crotalofina, em todas as doses testadas, reverteu a hiperalgesia causada pelo eicosanoide. Os resultados mostram ainda que, para a dose de 25 µg/kg, o CNFx, além de reverter a hiperalgesia, acarretou aumento significativo do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal.

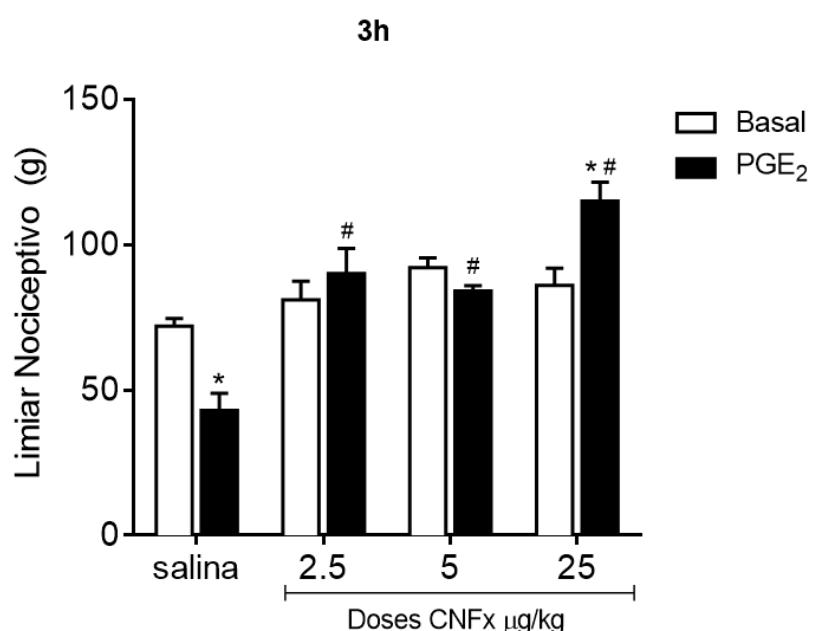


Figura 3 - Análise dose-resposta antinociceptiva do CNFx em modelo de dor inflamatória. Ratos foram submetidos à administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. Duas horas após a injeção, os animais foram submetidos aos tratamentos com salina (v.o.; controle); CNFx (2.5µg/kg, v.o.); Nter (5µg/kg, v.o.) e Nter (25µg/kg, v.o.). O limiar nociceptivo foi avaliado pelo modelo de pressão da pata conforme descrito por Randall e Selito (1957) antes e 3 h após a injeção da PGE₂. Os dados foram expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo. *p< 0.05; quando comparado ao seu basal e #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina pós-PGE₂.

III. Efeito antinociceptivo do CNFx na presença ou ausência da PGE₂

Os resultados apresentados na figura 4 mostram que a administração intraplantar de salina não interfere com limiar nociceptivo dos animais, quando comparado ao valor basal. Por outro lado, a injeção de prostaglandina acarreta diminuição significativa deste limiar, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. A administração oral do peptídeo CNFx (25 µg/kg) reverteu a hiperalgesia causada pelo eicosanoide, mas não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo dos animais, no grupo tratado com salina, por via i.pl.

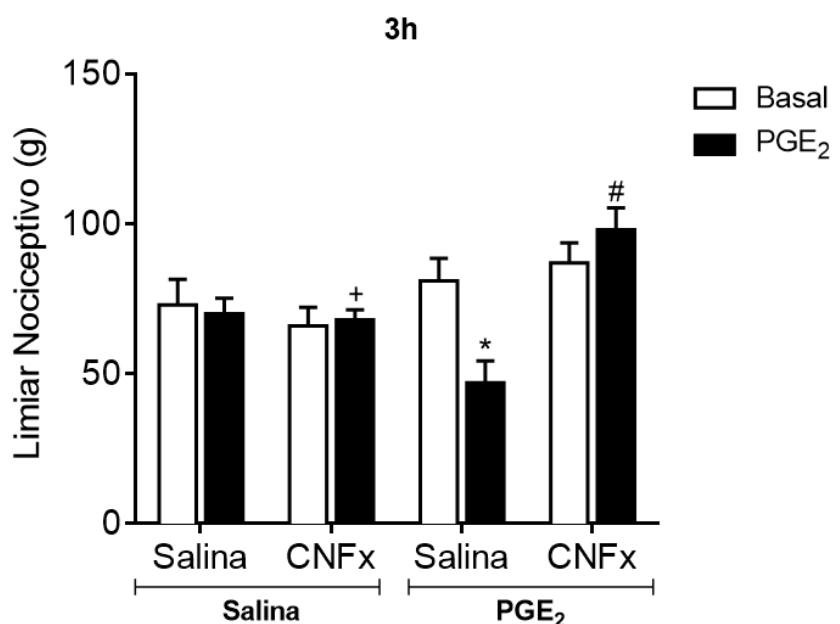
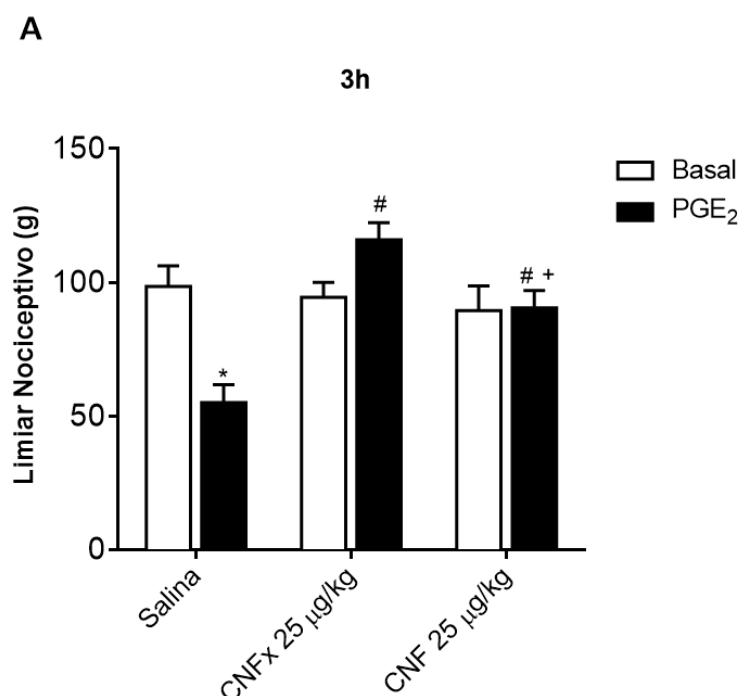


Figura 4 – Efeito antinociceptivo do CNFx na presença ou ausência da PGE₂. Ratos foram submetidos a administração intraplantar (i.pl; pata posterior direita) de salina ou PGE₂ (100 ng/pata). Duas horas após esta injeção, os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: salina (v.o.; controle); CNFx (25 µg/kg, v.o.). A hiperalgesia foi avaliada pelo modelo de pressão da pata de ratos, conforme descrito por Randall e Selito (1957), aplicado antes e 3 h após a injeção da PGE₂. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo. *p< 0.05; quando comparado ao seu basal; #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina pós-PGE₂ e +p< 0.05 quando comparado ao grupo CNFx pós-PGE₂.

IV. Comparação do efeito antinociceptivo da crotalfina e seu análogo, para as diferentes doses testadas

Inicialmente avaliamos o efeito antinociceptivo da dose de 25 µg/Kg de crotalfina e do análogo. Como apresentado na Figura 5A, ambos os peptídeos, nesta dose reverteram a hiperalgesia acarretada pela PGE₂. Adicionalmente foi observada diferença significativa entre o efeito da crotalfina e do análogo. Assim realizamos um experimento adicional, avaliando o efeito de ambas as moléculas administradas na mesma concentração molar (análogo: 25ug/Kg; crotalfina: 54,3 µg/Kg - Figura 5B). Para estas doses, ambos os peptídeos reverteram a hiperalgesia acarretada pela PGE₂ e induziram também, aumento do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal.



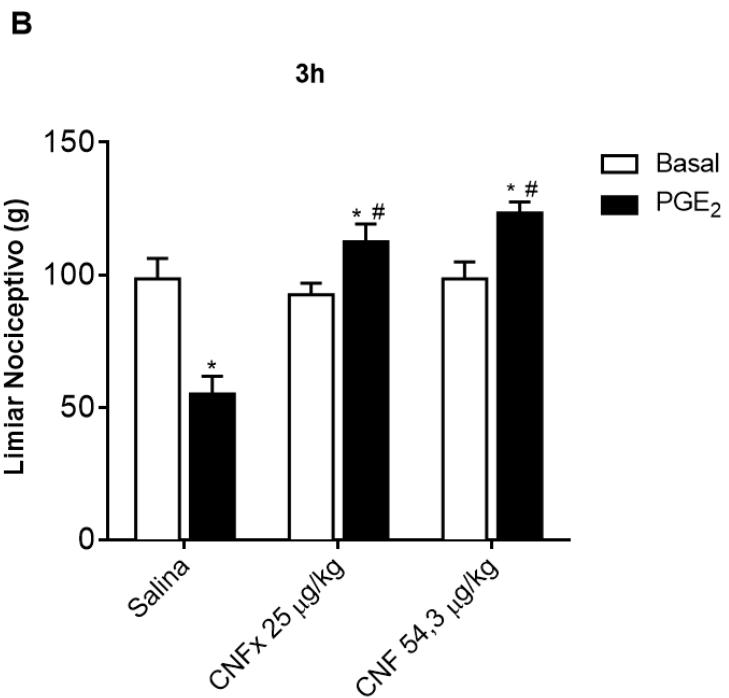
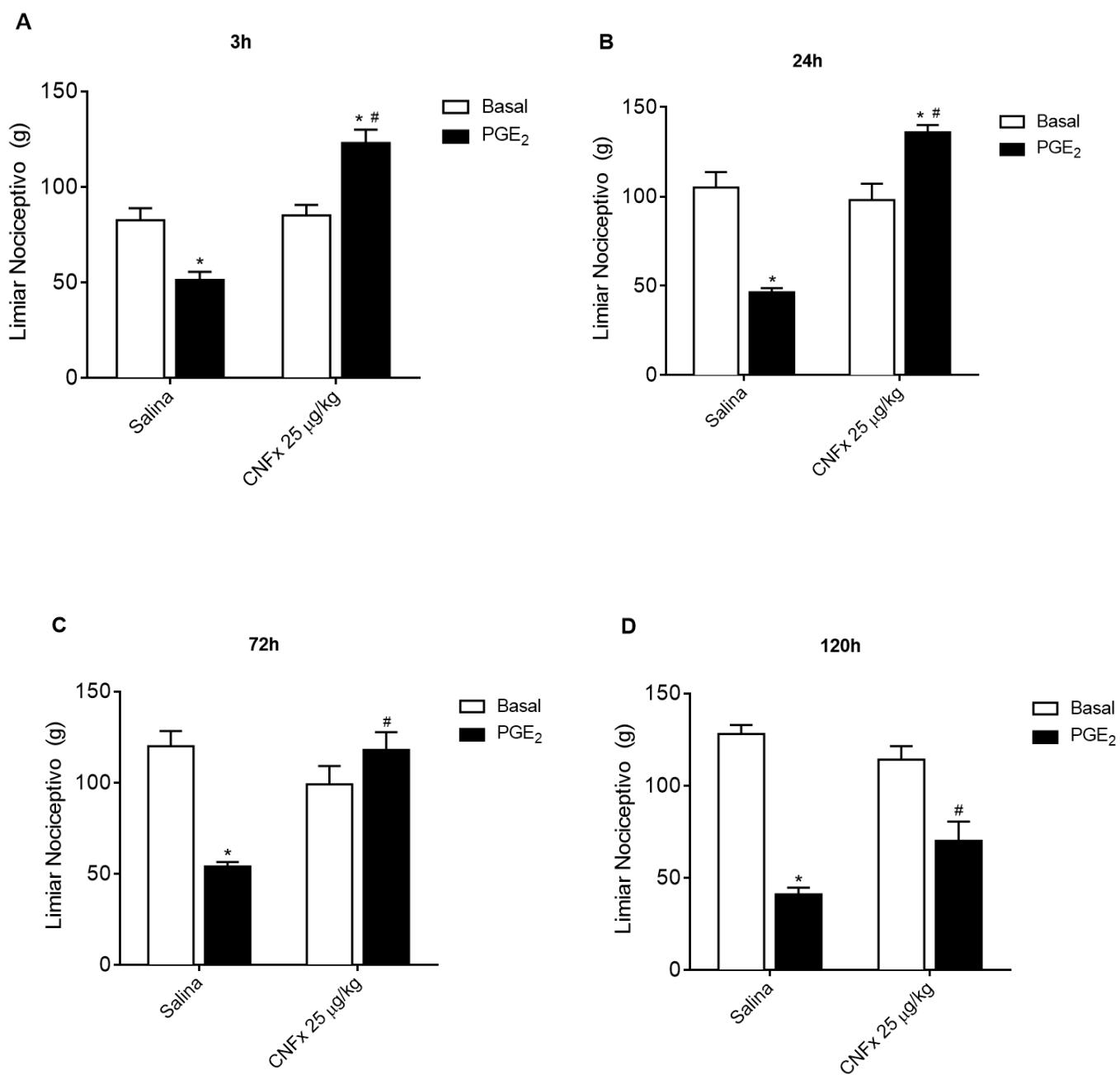


Figura 5 – Comparação do efeito antinociceptivo da crotalina e seu análogo (CNFx), para as diferentes doses testadas. Ratos foram submetidos a administração intraplantar (i.pl; pata posterior direita) de PGE₂ (100 ng/pata). Duas horas após esta injeção, os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: salina (v.o.; controle); CNFx (25 µg/kg, v.o.) e CNF (25 µg/kg, v.o.) (**Painel A**) ou salina (v.o.; controle); CNFx (25 µg/kg, v.o.) e CNF 54,3 µg/kg, v.o.) (**Painel B**). A hiperalgesia foi avaliada pelo modelo de pressão da pata de ratos, conforme descrito por Randall e Selito (1957), aplicado antes e 3 h após a injeção da PGE₂. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 8 animais por grupo, *p< 0.05; quando comparado ao seu basal e #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina pós-PGE₂ e +p< 0.05 quando comparado ao grupo CNFx pós-PGE₂.

V. Análise da duração do efeito do CNFx

Para este estudo, o efeito antinociceptivo do CNFx foi avaliado nos tempos de 1, 24, 72, 120, 144 e 168 h após o tratamento com o análogo. Estes períodos foram escolhidos baseado nos dados anteriores obtidos com a crotalina, neste modelo (Konno et al., 2008; Zambelli et al., 2014). Os resultados mostram que este efeito é detectado até 144 h após a administração do análogo (Figura 6 - Painéis A, B, C, D e E). Até o período de 72 h (Figura 6 – Painéis A, B, C), foi possível observar que o análogo reverteu totalmente a hiperalgesia causada pela PGE₂. A partir das 120 h detectou-se reversão significativa, porém parcial do efeito hiperalgésico do

eicosanoide (Figura 6 – Painéis D e E). O Painel F corresponde ao efeito do análogo após 168 h de sua administração, neste período não foi mais detectado efeito antinociceptivo para o análogo.



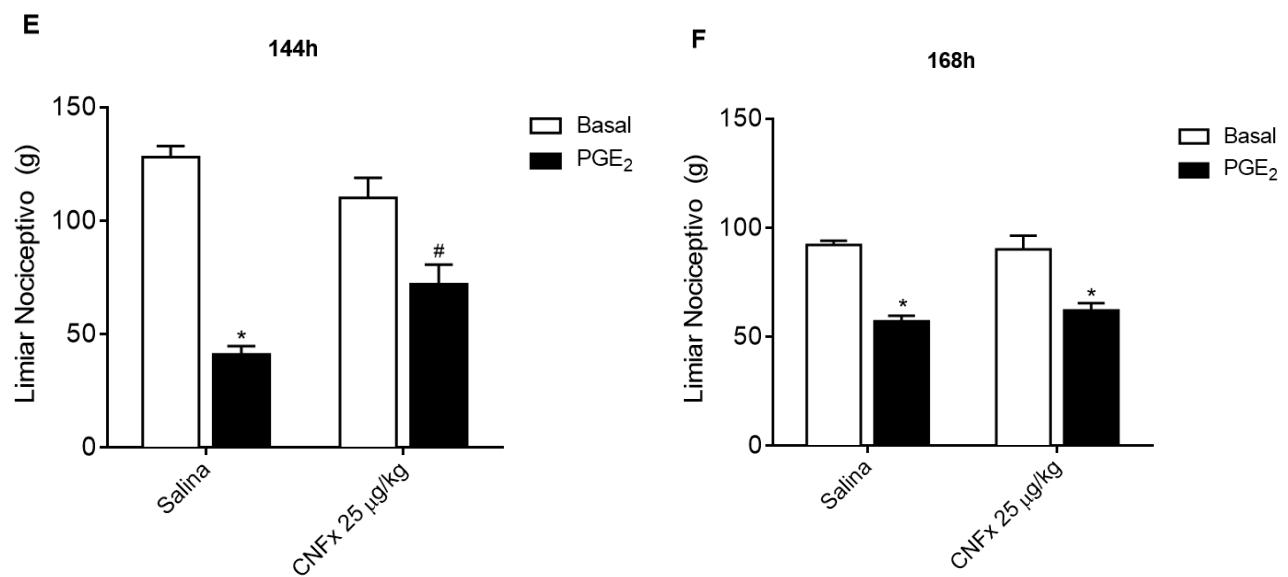


Figura 6 – Análise da duração do efeito do CNFx. Ratos foram submetidos a administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. A hiperalgesia foi avaliada pelo modelo de pressão da pata conforme descrito por Randall e Selito (1957). O teste foi aplicado antes e 3 h após a injeção da PGE₂. Para avaliação do efeito antinociceptivo, à exceção do período de 1 h (**Painel A**), o análogo foi administrado a animais naïve (sem nenhum tratamento). Para cada tempo avaliado (24 a 168 h; **Painéis B, C, D, E, F**), grupos distintos de animais tratados com o análogo, foram injetados com PGE₂, por via i.pl, 3 h antes de cada avaliação da hiperalgesia. Para o período de 1 h, (**Painel A**), o análogo foi administrado 2 h após a prostaglandina. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo, *p<0.05; quando comparado ao seu basal e #p<0.05; quando comparado ao grupo salina.

VI. Análise do mecanismo de ação do CNFx

Os dados apresentados na Figura 7, mostram, novamente, que a administração intraplantar de PGE₂ acarretou o desenvolvimento de hiperalgesia, a qual foi revertida pelo tratamento com o CNFx. O tratamento com o antagonista de receptores canabinóides do tipo CB2 (AM630) aboliu o efeito antinociceptivo do análogo, indicando o envolvimento destes receptores na ação do peptídeo.

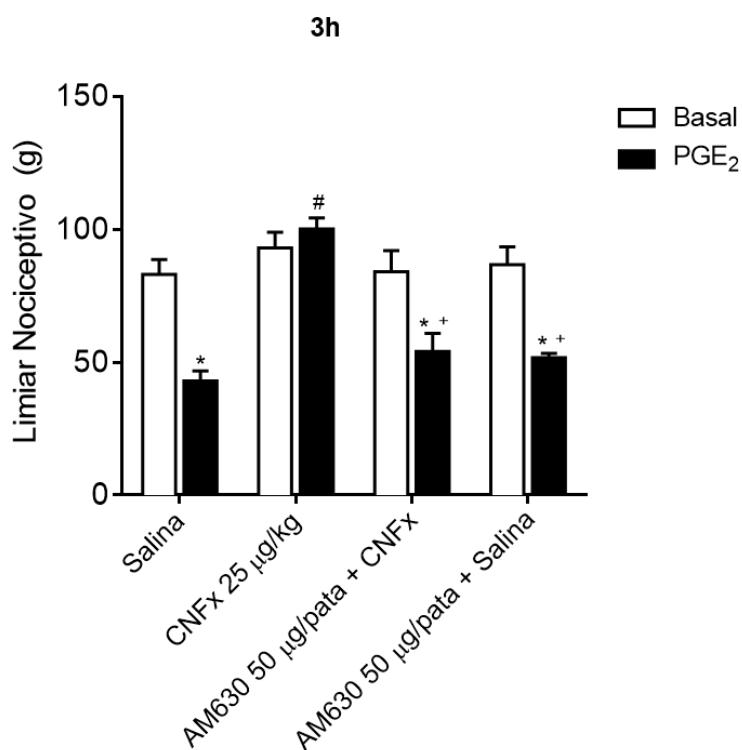


Figura 7 – Envolvimento de receptores canabinóides no efeito antinociceptivo do CNFx. Ratos foram submetidos à administração intraplantar de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. Duas horas após a injeção, os animais foram submetidos aos tratamentos com: salina (v.o., grupo controle); CNFx (25µg/kg, v.o.) e AM630 (50 µg/pata, i.pl.). O antagonista do receptor CB2 foi injetado 30 minutos antes do análogo. A hiperalgesia foi determinada 3h após a injeção do eicosanoide. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo, *p< 0.05; quando comparado ao seu basal; #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina e +p< 0.05 quando comparado ao grupo CNFx.

Os dados apresentados na Figura 8, mostram, novamente, que a administração intraplantar de PGE2 acarretou o desenvolvimento de hiperalgesia, a qual foi revertida pelo tratamento com o peptídeo análogo da crotalofina. Já o tratamento dos animais com o antagonista de receptores κ-opióides (Nor-BNI), inibiu o efeito antinociceptivo do análogo, sugerindo o envolvimento destes receptores opióides na antinocicepção acarretada pelo peptídeo.

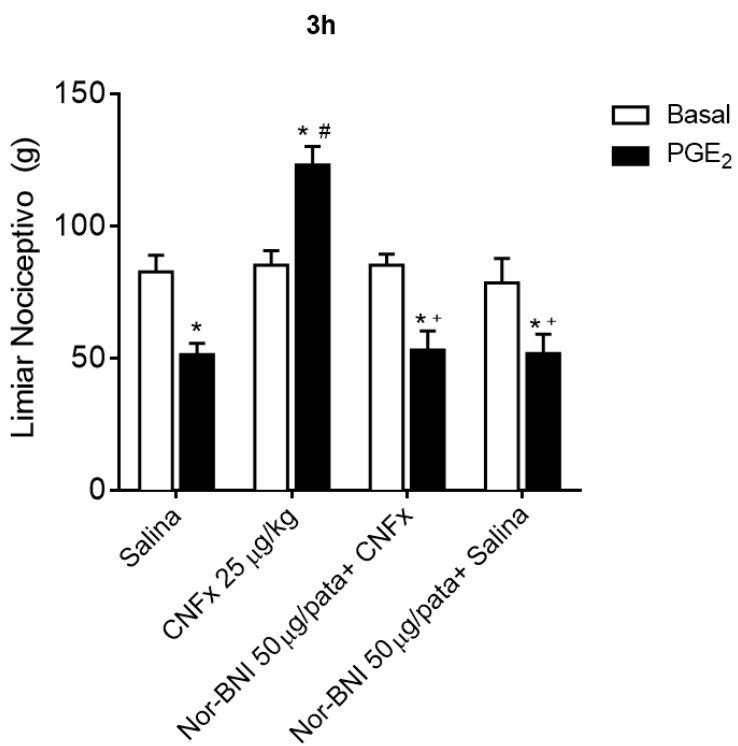


Figura 8 – Envolvimento de receptores opioides no efeito antinociceptivo do CNFx. Ratos foram submetidos à administração intraplantar de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. Duas horas após a injeção, os animais foram submetidos aos tratamentos com: salina (v.o., grupo controle); CNFx (25µg/kg, v.o.) e Nor-BNI (50 µg/pata, i.pl.). O antagonista do receptor opioide do tipo κ foi injetado imediatamente antes do análogo. A hiperalgesia foi determinada 3h após a injeção do eicosanoide. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo, *p< 0.05; quando comparado ao seu basal; #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina e +p< 0.05 quando comparado ao grupo CNFx.

Os dados apresentados na Figura 9, mostram, novamente, que a administração intraplantar de PGE₂ acarretou o desenvolvimento de hiperalgesia, a qual foi revertida pelo tratamento com o peptídeo análogo da crotalfinina. O tratamento, por via i.pl., com o anticorpo anti-dinorfina A, reverteu a antinociceção acarretada pelo análogo da crotalfinina, sugerindo que a liberação endógena desta dinorfina é importante para expressão desta ação antinociceptiva.

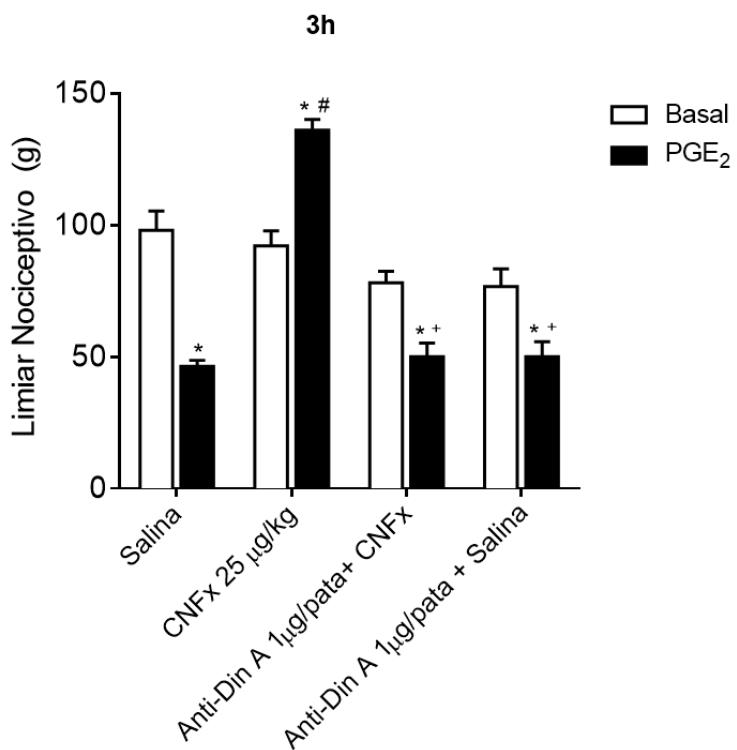


Figura 9 – Envolvimento da dinorfina A no efeito antinociceptivo do CNFx. Ratos foram submetidos à administração i.pl. de PGE₂ (100 ng/pata) na pata posterior direita. Duas horas após a injeção, os animais foram submetidos aos tratamentos com: salina (v.o., grupo controle); CNFx (25µg/kg, v.o.) e anti-dinorfina A (1µg/pata, i.pl.). O anticorpo foi injetado 15 minutos antes do análogo. A hiperalgesia foi determinada 3h após a injeção do eicosanoide. Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo, *p< 0.05; quando comparado ao seu basal; #p< 0.05; quando comparado ao grupo salina e ++p< 0.05 quando comparado ao grupo CNFx.

Nos grupos controles adicionais, constituídos por animais tratados com PGE₂ e o antagonista de receptor ou anticorpo, foi observado que nenhum destes tratamentos interferiu, per se, com a hiperalgesia acarretada pelo eicosanoide (Figuras 7, 8 e 9).

VII. Análise do efeito antinociceptivo do CNFx em modelo de dor neuropática

Os dados apresentados na figura 10 demonstram a evolução da hipernocicepção (caracterizada pela redução do limiar nociceptivo), avaliada a partir do 3º dia após cirurgia, e que persistiu pelo menos até o 14º dia. Animais falso-

operados (SHAM, utilizados como controle), não apresentaram alteração significativa do limiar nociceptivo, em relação a medida basal, durante todo o período de observação.

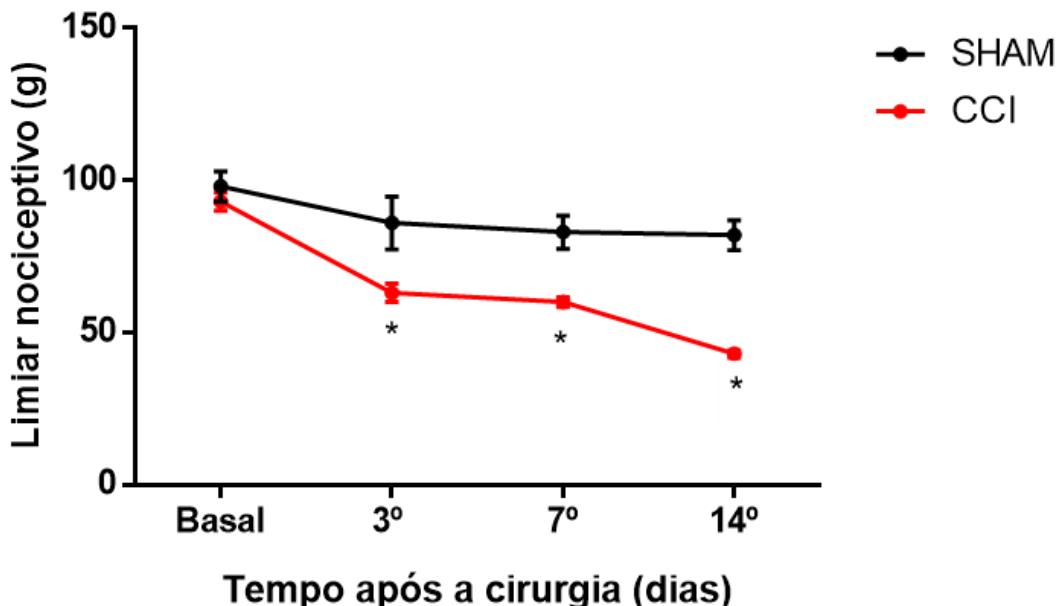


Figura 10 – Análise do quadro de neuropatia. Ratos foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI). A hiperalgesia foi avaliada pelo modelo de pressão da pata conforme descrito por Randall e Selito (1957) antes da cirurgia (medida basal) e também após 3, 7 e 14 dias da cirurgia (CCI). Animais falso-operados (SHAM) foram utilizados como controles. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M de 5 animais por grupo, * $p < 0.05$; quando comparado ao seu basal.

Os resultados demonstrados na Figura 11 correspondem ao efeito dos tratamentos após 14 dias da cirurgia de constrição do nervo isquiático. A administração de salina (controle), por via oral, aos animais falso-operados (sham) não interferiu com o limiar nociceptivo. A administração de salina, por via oral, aos animais submetidos a CCI, não interferiu com a hipernocicepção causada pela cirurgia. Por outro lado, dados ainda iniciais, mostraram que a administração de crotalofina a esses animais (CNF 75 µg/Kg), reverteu a hipernocicepção causada pela ligadura do nervo isquiático. Em relação ao peptídeo CNFx, foram avaliadas 2 doses

- 75 e 100 ug/Kg. Os resultados mostraram que apenas a dose de 75 µg/Kg foi capaz de causar efeito antinociceptivo.

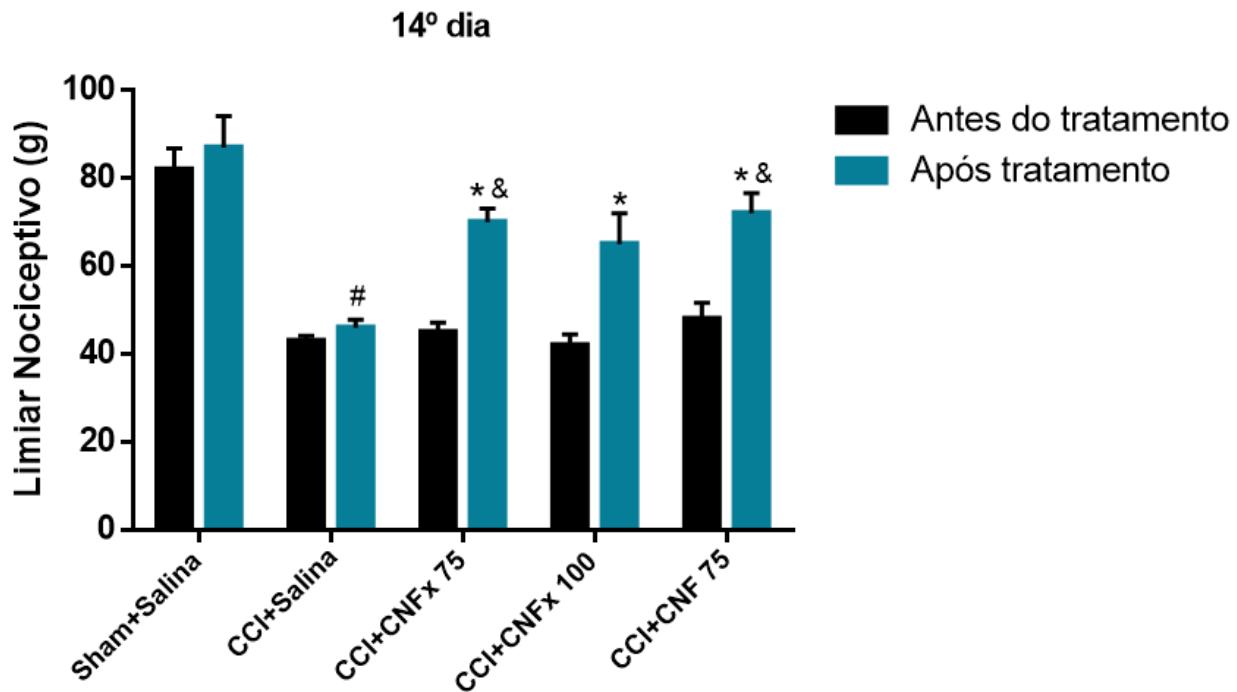


Figura 11 – Avaliação do efeito da crotalina e seu análogo em modelo de dor neuropática. Ratos foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCl). A hiperalgésia foi avaliada no 14º dia pelo modelo de pressão da pata conforme descrito por Randall e Selito (1957) antes e após os tratamentos. Os animais foram submetidos aos tratamentos com: salina (v.o., grupo controle); CNFx (75 e 100 µg/kg, v.o.) e crotalina (75 µg/kg, v.o.). Os dados estão expressos como média ± E.P.M de 5 animais por grupo, * $p< 0.05$; quando comparado ao antes do tratamento dentro do mesmo grupo; # $p< 0.05$; quando comparado ao grupo Sham+Salina pós-tratamento e & $p< 0.05$ quando comparado ao grupo CCl+Salina pós-tratamento.

5. DISCUSSÃO

5.1 Padronização da dose da crotalfina

O presente trabalho teve como um de seus objetivos analisar o efeito antinociceptivo do peptídeo sintético CNFx e para tal, comparar este efeito com o da molécula líder (Crotalfina). Para que este objetivo fosse atendido, primeiramente fez-se necessário mostrar o efeito da molécula líder – CNF.

Com base no exposto, realizou-se uma padronização da dose de CNF. Ao início do estudo foi realizada uma análise tanto da literatura, das doses que já tinham sido utilizadas, como também uma pesquisa com outros pesquisadores do nosso grupo que utilizam a CNF, para estabelecer as melhores doses a serem utilizadas nos protocolos experimentais. Essa etapa foi necessária, uma vez que as doses de crotalfina utilizadas atualmente pelo grupo, nos diferentes ensaios experimentais de dor, tiveram que ser aumentadas, em relação às doses inicialmente padronizadas. As razões para essa alteração ainda não são totalmente conhecidas, mas houve mudança da empresa que sintetiza a CNF, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para esta alteração.

Dessa forma, como demonstrado na Figura 2, as doses de 25 e 50 µg/Kg da CNF foram testadas e ambas acarretaram reversão da hiperalgesia induzida pela PGE₂. Não foi detectada diferença significativa no efeito antinociceptivo de ambas as doses do peptídeo.

5.2 Desenvolvimento do CNFx

Conforme já citado anteriormente, o composto análogo utilizado derivou-se de um estudo preliminar realizado em colaboração com o Centro de Energia Atômica

(CEA) da França. A busca por um composto sintético e análogo da crotalfina se justifica pela possibilidade de obtenção de um peptídeo de tamanho menor – conferindo efetividade de seu efeito pela menor porção ativa – assim como redução dos custos para a síntese deste novo peptídeo. O composto análogo mostrou-se eficaz nos estudos preliminares e também nos experimentos aqui descritos, além disso, é alvo de depósito de patente e portanto, sua sequência e método de síntese não foram informados no presente documento.

O protocolo experimental inicial utilizando o CNFx envolveu a padronização da dose capaz de acarretar efeitos antinociceptivos já conhecidos para a crotalfina. Para tanto, foram testadas três doses diferentes do análogo (2,5; 5 e 25 µg/kg), e em todas as doses testadas, houve a reversão da hiperalgesia causada pelo eicosanoide. Os resultados mostraram ainda que, para a dose de 25 µg/kg, o CNFx, além de reverter a hiperalgesia, acarretou aumento significativo do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal (Figura 3) e por este motivo essa dose foi a escolhida para prosseguir nos demais experimentos.

5.3 Efeito Antinociceptivo do CNFx

Após demonstrar que o CNFx possui potente efeito antinociceptivo e baseando-se em dados anteriores, mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalfina só é detectado na presença de um estímulo inflamatório (Zambelli et al., 2014), nosso próximo passo foi avaliar o efeito do análogo sobre o limiar nociceptivo dos animais, na presença ou ausência da injeção intraplantar de PGE₂.

Os resultados mostraram que a administração oral do peptídeo CNFx (25 µg/kg) reverteu a hiperalgesia causada pelo eicosanoide, mas não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo dos animais, no grupo tratado com salina, por via i.pl. (Figura 4), ou

seja, da mesma maneira que observada pela molécula líder (crotalfina), o efeito do análogo só é detectado na presença de um estímulo lesivo (hiperalgesia induzida pela injeção de PGE₂).

5.4 Comparação do análogo com a crotalfina

Inicialmente foi utilizada a mesma dose (25 µg/kg) do análogo e da crotalfina para que fosse avaliado o efeito antinociceptivo destes peptídeos. Como demonstrado na Figura 5A, foi observada diferença significativa entre o efeito da crotalfina e do análogo para uma mesma dose. Assim, realizamos um experimento adicional, avaliando o efeito de ambas as moléculas administradas na mesma concentração molar.

Dessa forma, primeiramente calculou-se a concentração molar (C_{CNF_x}) do análogo, partindo-se da concentração que promoveu o seu melhor efeito (25 µg/kg) e utilizando-se as informações de massa (m_{CNF_x}), peso molecular (PM_{CNF_x}), e volume da solução utilizada para administração ($V_{Solução}$). Uma vez calculada a concentração molar do análogo, utilizou-se este valor para calcular a massa de crotalfina a ser utilizada no protocolo experimental (m_{CNF}) e assim obter o valor da dose utilizada (54,3 µg/kg - Figura 5B). Para estas doses (25 e 54,3 µg/kg para o análogo e crotalfina, respectivamente), ambos os peptídeos reverteram a hiperalgesia acarretada pela PGE₂ e induziram também, aumento do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal (Figura 5B). Para estas doses, não houve diferença significativa entre o efeito do análogo e da crotalfina.

$$C_{molar} = \frac{m(g)}{PM \times V(l)}$$

Modelo da fórmula utilizada para cálculo da dose de CNF partindo-se da concentração molar do composto análogo.

5.5 Mecanismos e tempo de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do análogo

Dados da literatura tem mostrado que a crotalina apresenta efeito de longa duração, sendo observado por 2-3 dias após a administração de uma única dose, em modelo experimental de câncer ósseo ou de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático, respectivamente, (Gutierrez VP, PhD Thesis, 2013; Gutierrez et al, 2008), e de até 5 dias quando utilizada em modelo de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (Konno et al., 2008).

Os nossos resultados mostraram que o análogo CNFx induz também efeito antinociceptivo de longa duração (até 6 dias), em modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂. Até o período de 72 h (Figura 6 – Painéis A, B, C), foi possível observar que o análogo reverteu totalmente a hiperalgesia causada pela PGE₂. A partir das 120 h (5 dias) detectou-se reversão significativa, porém parcial do efeito hiperalgésico do eicosanoide (Figura 6 – Painéis D e E).

Baseado em dados anteriores mostrando que o efeito da crotalina, no modelo de hiperalgesia inflamatória é mediado por receptores canabinóide do tipo CB₂, liberação de dinorfina A e ativação de receptores κ-opioides (Machado et al, 2014), avaliamos presentemente o envolvimento dos sistemas canabinóide e opioide da ação do análogo, por meio do uso de antagonistas seletivos do receptor κ (Nor-BNI) ou do receptor CB₂ (AM630) e anticorpo anti-dinorfina A. Os resultados desta análise do mecanismo de ação do CNFx mostraram que seu efeito envolve tanto receptores κ-opióides, como receptores canabinoídes CB₂ e também depende da liberação endógena de dinorfina A. Os dados em conjunto, demonstraram mais uma vez que o efeito do análogo é similar ao da crotalina.

5.6 Modelo de dor crônica neuropática

Uma vez confirmados os efeitos e mecanismo de ação do análogo em modelo de hiperalgesia inflamatória acarretada por injeção intraplantar de PGE₂, utilizou-se outro modelo de dor para dar continuidade aos estudos do efeito dessa molécula. Para o modelo de dor neuropática, utilizou-se do protocolo de constrição do nervo isquiático (CCI) e análise do limiar nociceptivo até o 14º dia após a cirurgia. Conforme apresentado na Figura 10, a hipernocicepção foi caracterizado pela redução do limiar nociceptivo observada a partir do 3º dia após cirurgia, que persistiu pelo menos até o 14º dia.

Os resultados ainda iniciais, apresentados na Figura 11, correspondem ao efeito dos tratamentos após 14 dias da cirurgia de constrição do nervo isquiático. As doses utilizadas em dados prévios do nosso grupo mostrando que em modelo experimental de dor neuropática, doses maiores da crotalina são necessárias para a reversão da hipernocicepção. A dose de 75 µg/Kg, tanto da crotalina como de seu análogo, apresentaram efeito antinociceptivo neste modelo.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e da discussão realizada, foi possível estabelecer algumas considerações finais para o presente trabalho. Tendo em vista que a dor, especialmente a crônica, acomete um grande número de indivíduos da população mundial e possui um enorme impacto negativo na qualidade de vida, disposição, produtividade e força de trabalho, além de gerar um grande gasto em saúde, é de extrema relevância e importância a busca por novas moléculas capazes de minimizar este problema. Além disso, o desenvolvimento de terapias que se mostrem eficazes e com menor índice de resistência e baixos sintomas relacionados a dependência pode trazer benefícios significativos para a porção da população que sofre de dor crônica. Apesar de ainda iniciais, os estudos envolvendo o composto análogo da crotalfina se mostraram promissores, uma vez que esta molécula demonstrou um potente efeito antinociceptivo tanto em modelo de dor aguda como em modelo de dor crônica.

Contudo, é importante destacar que os estudos com este composto análogo CNFx, no modelo de dor crônica, são ainda preliminares – há a necessidade de se avaliar a duração de ação e também confirmar os mecanismos envolvidos nesta ação, uma vez que dados anteriores de nosso grupo em mostrado que, em modelo de dor crônica, o efeito antinociceptivo da molécula líder - crotalfina é mediado pela ativação de receptores *kappa* e *delta* opioides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001
- Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev.* 2009
- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009
- Sandkuhler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev.* 2009
- Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 2010
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*. 2014
- Schaible, HG. & Richter, F. *Langenbecks Arch Surg*. 2004
- Johannes CB, Le TK, Zhou X, Johnston JA, Dworkin RH. The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J Pain*. 2010
- Ji R-R, Xu Z-Z, Gao Y-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews Drug discovery*. 2014
- Chen Z, Zhang Q, Tong APS, Manders TR, Wang J. Deciphering neuronal population codes for acute thermal pain. *J Neural Eng*. 2017

Xiao X, Zhang YQ. A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018

Morlion B, Coluzzi F, Aldington D, Kocot-Kepska M, Pergolizzi J, Mangas AC, Ahlbeck K, Kalso E. Pain chronification: what should a non-pain medicine specialist know? *Curr Med Res Opin*. 2018

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther*. 2006

Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, Langer S, Martin D, Green P, Fleshner M, Leinwand L, Maier SF, Watkins LR. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci*. 2004

Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, et al. Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clinic Proceedings*. 2010

Kalso E. Opioids for persistent non-cancer pain: A team approach and individualization of treatment are needed. *BMJ : British Medical Journal*. 2005

Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999

Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*. 2010

Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1993

Picolo G, Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. *Toxicon*. 1998

Picolo G, Giorgi R, Cury Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur J Pharmacol*. 2000

Picolo G, Cassola AC, Cury Y. Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur J Pharmacol*. 2003

Picolo G, Cury Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta-and kappa-opioid receptor agonist. *Life Sci*. 2004

Konno K, Picolo G, Gutierrez VP, Brigatte P, Zambelli VO, Camargo AC, Cury Y. Crotalaphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides*. 2008

Gutierrez VP, Konno K, Chacur M, Sampaio SC, Picolo G, Brigatte P, Zambelli VO, Cury Y. Crotalaphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. *Eur J Pharmacol*. 2008

Gutierrez VP, Zambelli VO, Picolo G, Chacur M, Sampaio SC, Brigatte P, Konno K, Cury Y. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive

K^+ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalaphine on neuropathic pain in rats. Behav Pharmacol. 2012

Brigatte P, Konno K, Gutierrez VP, Sampaio SC, Zambelli VO, Picolo G, Curi R, Cury Y. Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotalaphine in a rat model of cancer pain. Pharmacol Biochem Behav. 2013

Machado FC, Zambelli VO, Fernandes AC, Heimann AS, Cury Y, Picolo G. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalaphine. Br J Pharmacol. 2014

Bressan E, Touska F, Vetter I, Kistner K, Kichko TI, Teixeira NB, Picolo G, Cury Y, Lewis RJ, Fischer MJ, Zimmermann K, Reeh PW. Crotalaphine desensitizes TRPA1 ion channels to alleviate inflammatory hyperalgesia. Pain. 2016