

Flávia Souza Ribeiro Lopes

Avaliação do efeito central da crotalina na neuropatia periférica
induzida em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Flávia Souza Ribeiro Lopes

Avaliação do efeito central da crotalina na neuropatia periférica
induzida em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Gisele Picolo

São Paulo

2019

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

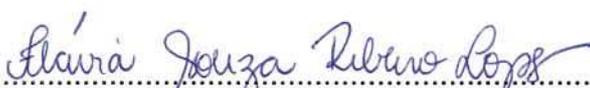
Eu, Flávia Souza Ribeiro Lopes, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

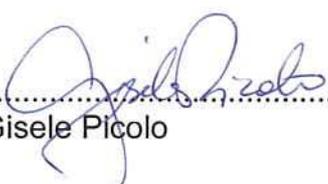
Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique: Avaliação de inserção de dados na patente e publicação.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2019.


.....
Aluna: Flávia Souza Ribeiro Lopes

De acordo: 
.....
Orientadora: Gisele Picolo

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

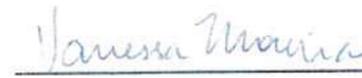
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: FLÁVIA SOUZA RIBEIRO LOPES

DATA DO EXAME: 03/05/2019

BANCA EXAMINADORA: Profas. Dras.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Gisele Picolo (Presidente)		(X)	()
Marucia Chacur		(X)	()
Vanessa Moreira		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X)

REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito central da crotalina na neuropatia periférica induzida em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 3380310317, sob a responsabilidade de **Gisele Picolo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 19/04/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of crotalphine effect on the peripheral neuropathy in mice", utilizing 396 isogenics mice (396 males), protocol number CEUA 3380310317, under the responsibility of **Gisele Picolo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/19/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2017 a 04/2019

Área: Lab. Especial de Dor E Sinalização

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 5 a 7 semanas

N: 396

Linhagem: C57BL/6

Peso: 19 a 22 g

Resumo: A dor é um problema mundial de saúde pública. Estimativas sugerem que 20% da população mundial adulta sofrem de diferentes tipos de dor e 10% são recém-diagnosticados com dor crônica a cada ano. A dor pode ser dividida em dois grandes grupos: aguda e crônica. Particularmente em relação à dor crônica, esta pode ter origem inflamatória e/ou decorrente de lesão nervosa, alterando o funcionamento do sistema sensorial (nocicepção) bem como a interface neuroimune. Apesar dos avanços das pesquisas, o seu tratamento ainda apresenta grandes dificuldades, pois mesmo com a administração dos medicamentos clinicamente disponíveis muitos pacientes relatam não apresentar reversão completa do quadro doloroso e são constantes os relatos dos seus efeitos adversos indesejáveis. Sendo assim, faz-se necessário o estudo de novas drogas para o tratamento desta patologia. Nesse sentido, os produtos naturais vêm sendo considerados uma rica fonte para o desenvolvimento de possíveis fármacos para o tratamento de dor. A Crotalina (CRF) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* que induz potente e prolongado efeito antinociceptivo, em modelos de dor aguda e crônica. Esse efeito é mediado pela liberação de opióides endógenos, particularmente dinorfina A, sendo essa liberação dependente de ativação direta do receptores canabinóides. O uso de canabinóides como tratamento para doenças do SNC vem sendo estudado, devido à eficácia no alívio dos sintomas associados a estas patologias, como a dor e inflamação. O objetivo deste projeto é avaliar o efeito da CRF na dor neuropática induzida pelo modelo de ligação parcial do nervo isquiático (PSNL), avaliando os mecanismos envolvidos na sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória sobre o processo de indução e manutenção da dor crônica.

Local do experimento: Salas para realização de ensaios comportamentais, no Laboratório Especial de Dor e Sinalização.

São Paulo, 02 de maio de 2017

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

São Paulo, 21 de novembro de 2018
CEUA N 3380310317

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Gisele Picolo
Área: Lab. Especial De Dor E Sinalização

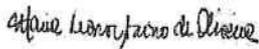
Título da proposta: "Avaliação do efeito central da crotalfina na neuropatia periférica induzida em camundongos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 001640)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 09/novembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No protocolo submetido anteriormente, solicitamos animais para realização do ensaio de determinação da ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, residentes da medula espinal pela técnica de Western blotting durante a instalação da neuropatia. Informamos que os ensaios foram realizados, porém a ativação das células não foi detectada nos grupos controles. Após sugestões de especialistas, estes ensaios serão repetidos, porém ao invés de utilizarmos a medula espinal total, será coletado apenas o corno dorsal da medula espinal da região ipsilateral à cirurgia, afim de refinamento da metodologia. Portanto, solicitamos um adicional para realização do seguinte ensaio: Determinação, da presença e ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, residentes da medula espinal pela técnica de Western blotting durante a instalação da neuropatia. Estes experimentos serão realizados em diferentes tempos, sendo estes 3º, 7º, 14º e 21º após a cirurgia. 6 animais naive 6 animais sham 6 animais PSNL 6 animais PSNL + CRF _____ Total: 24 camundongos Este experimento será repetidos 4 vezes pois a coleta será realizada em tempos diferentes. Portanto, 24 animais X 4 experimentos = 96 animais."

Comentário da CEUA: "".



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

À Deus, ao Universo, energias positivas e a tudo que me ajudou a conquistar mais esse sonho.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me ajudar e me incentivar a ir atrás dos meus objetivos e do que me faz feliz. Obrigada por serem meu alicerce, amo vocês.

A minha vó Heloá que me ensinou a amar os livros e os estudos desde pequena, por participar ativamente de todas as escolhas que fiz e faço na vida. Vó muito obrigada por ser meu porto seguro e ter me ensinado tantas coisas mas principalmente a dar um passo de cada vez para crescer através do conhecimento. Te amo muito!

Aos meus tios, Patrícia e Flávio por serem referências e inspirações na minha vida.

Ao meu namorado Bruno, por todas as vezes que segurou a minha mão quando duvidei do meu potencial e me lembrou dos meus porquês, e sobretudo por sempre acreditar em mim e me apoiar, te amo vidinha linda!

A minha orientadora Dra. Gisele Picolo, que eu admiro muito, que desde a iniciação científica aceitou me orientar e fez isso da melhor forma possível. Pela amizade, por tudo que me ensinou, pelos puxões de orelha, pelas correções em cima da hora, por ter me ajudado a crescer tanto como pessoa e como profissional. Muito obrigada Gi.

A Dra. Yara Cury que além da contribuição intelectual, me deu suporte emocional para encarar os desafios da pós-graduação. Yara sou muito grata a vida por ter colocado uma pessoa tão iluminada como você no meu caminho.

A Morena, Aline, Louise, Michelle e Van Zambelli por serem essenciais durante a minha caminhada, desempenhando um papel infinitamente maior do que colaboradoras deste projeto. Obrigada meninas pela amizade, pelo companheirismo e por me darem a oportunidade de aprender tanto com grandes cientistas. Vocês são incríveis e eu admiro muito vocês!

As minhas irmãs de coração, Babi e Bia que trouxeram para o ambiente de trabalho a sensação de estar em casa, de ter o almoço de domingo em família no dia a dia, e por sempre oferecerem o ombro para dividir o peso de toda e qualquer dificuldade, tornando a vida mais leve. Obrigada, obrigada, obrigada, mil vezes obrigada!

À todos os alunos e pós-docs do laboratório mesmo aqueles que já não fazem mais parte do grupo, aos funcionários e todos que fizeram parte da minha caminhada. Muito obrigada!

As minhas estrelinhas que hoje estão no céu, meus camundongos, que deram suas vidas para contribuir com a ciência. Tenho um imenso amor e carinho por cada um, estarão sempre em meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a quem agradeço pelo auxílio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

A todas as dificuldades e aos obstáculos que além de terem ensinado muitas coisas me tornaram uma pessoa mais forte.

A mim mesma, que por inúmeras vezes me senti incapaz e não acreditei no meu potencial. Ao final desta etapa aprendi que posso confiar em mim e acreditar que posso realizar meus sonhos, ou pelo menos tentar.

"Qualquer desejo do coração está ali para você descobri-lo e expressá-lo. O que quer que inspire você é um aspecto de você mesmo. [...] É simples assim. Goethe disse: Se podemos imaginar algo e crer nisso, então podemos alcançá-lo".

O Lado Sombrio dos Buscadores da Luz

RESUMO

LOPES, Flávia Souza Ribeiro. **Avaliação do efeito central da crotalfina na neuropatia periférica induzida em camundongos**. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019

A dor é considerada um problema de saúde pública. Estimativas sugerem que 20% da população mundial adulta sofre de diferentes tipos de dor. Particularmente em relação à dor crônica, esta pode ter origem inflamatória e/ou decorrente de lesão nervosa, alterando o funcionamento do sistema sensorial (nocicepção) bem como a interface neuroimune. Apesar dos avanços das pesquisas, o seu tratamento ainda apresenta grandes dificuldades, pois mesmo com a administração dos medicamentos clinicamente disponíveis muitos pacientes relatam reversão incompleta do quadro doloroso e são constantes os relatos dos seus efeitos adversos indesejáveis. A crotalfina (CRO) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* que induz potente e prolongado efeito antinociceptivo, em modelos de dor aguda e crônica. Em relação ao seu efeito periférico, sabe-se que ele ocorre pela liberação de opioides endógenos, particularmente dinorfina A, sendo essa liberação dependente de ativação de receptores canabinoides do tipo 2. No presente trabalho demonstramos que centralmente o efeito analgésico da crotalfina envolve a participação de receptores opioides *mu*, *kappa* e *delta* bem como opioides endógenos além da dinorfina A, como met-enkefalina e beta-endorfina. Além disso, nossos dados demonstraram a participação de receptores canabinoides CB₁ e CB₂ neste efeito, mas não de endocanabinoides. Verificamos ainda que células residentes do sistema nervoso central, particularmente micróglia, desempenham um papel importante no efeito analgésico central e que a crotalfina, ainda, reduz a liberação de interleucina 6 (IL-6) reforçando seu efeito sobre a resposta inflamatória.

Palavras-chave: Crotalfina. Neuropatia. Canabinoide. Opioide. PSNL.

ABSTRACT

LOPES, Flávia Souza Ribeiro. **Evaluation of the central effect of crotalphine on induced peripheral neuropathy in mice.** 2019. 69 p. Master's thesis (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2019

Pain is considered a public health problem. Estimates suggest that 20% of the adult worldwide population suffers from different types of pain. Particularly in relation to chronic pain, it may have inflammatory origin and / or to be due to nerve damage, altering the functionality of the sensory system (nociception) as well as the neuroimmune interface. Despite the advances of the research in this field, the treatment of pain still presents great difficulties, since even with the administration of the medicines clinically available, many patients report an incomplete reversal of the painful state and undesirable adverse effects. Crotalphine (CRO) is a synthetic peptide produced from the sequence of the natural analgesic factor isolated from the venom of the *Crotalus durissus terrificus* snake that induces potent and long-lasting antinociceptive effect in acute and chronic pain models. In relation to its peripheral effect, it is known that it occurs by the release of endogenous opioids, particularly dynorphin A, and this release is dependent on the activation of cannabinoid type 2 receptors. In the present work we demonstrate that the central analgesic effect of crotalphine involves participation of *mu*, *kappa* and *delta* opioid receptors as well as endogenous opioids release in addition to dynorphin A, such as met-enkephalin and beta-endorphin. In addition, our data demonstrated the participation of CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors in this effect, but there is no endocannabinoids involvement. We also verified that resident cells of the central nervous system, particularly microglia, play an important role in the central analgesic effect, and that crotalphine also reduces the release of interleukin 6 (IL-6), reinforcing its effect on the inflammatory response.

Keywords: Crotalphine. Neuropathy. Cannabinoid. Opioid. PSNL.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Dor	14
1.2 Crotalina	16
1.3 Analgésicos opioides	18
1.4 Canabinoide x opioide	20
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Delineamento experimental	24
3.3 Indução de neuropatia	25
3.4 Avaliação nociceptiva: Filamentos de <i>von Frey</i>	26
3.5 Western Blotting	27
3.6 Avaliação dos níveis de citocinas	28
3.7 Tratamentos farmacológicos	28
3.8 Administração intratecal	30
3.9 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Avaliação da hipernocicepção induzida pelo modelo de PSNL	31
4.2 Curva dose-resposta da crotalina na hipernocicepção induzida pelo modelo de neuropatia (PSNL) nas fases aguda e crônica	32
4.2.1 Curva dose-resposta da crotalina por via oral na hipernocicepção induzida pelo modelo de neuropatia (PSNL) nas fases aguda e crônica	32
4.2.2 Avaliação do efeito da crotalina em animais falso-operados.....	35
4.3 Avaliação do envolvimento de receptores opioides e canabinoides	37
4.3.1 Avaliação do envolvimento de receptores <i>mu</i> , <i>kappa</i> e <i>delta</i> opioide.....	38

4.3.2 Avaliação do envolvimento dos receptores CB ₁ e CB ₂ canabinoide	40
4.4 Avaliação da participação de opioides endógenos e endocanabinoides no efeito analgésico induzido pela crotalfina	42
4.4.1 Avaliação da participação de opioides endógenos no efeito da crotalfina	42
4.4.2 Avaliação da participação de endocanabinóides centrais no efeito da crotalfina.....	45
4.5 Investigação da participação de células glias no efeito analgésico da crotalfina	47
4.6 Avaliação da crotalfina na expressão de células glias na medula espinal de animais com neuropatia	49
4.7 Quantificação de citocinas da medula espinal de animais com neuropatia após o tratamento com a crotalfina	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A dor é considerada um instinto primitivo do ser humano e pode ser definida como uma experiência emocional e sensorial que está ligada ao dano tecidual real ou potencial, com o único propósito de notificar o mecanismo de defesa do corpo para reagir a um estímulo a fim de evitar maiores danos teciduais. A sensação de dor está associada à ativação de receptores que, quando ativados, dão início à geração de potenciais de ação. A percepção da dor envolve uma série de eventos sensoriais, desde a detecção do estímulo nociceptivo até a produção da resposta. Para que a percepção da dor ocorra, três estágios são essenciais: o primeiro estágio é a transdução do estímulo nociceptivo em potencial de ação, seguida pela transmissão deste estímulo da periferia ao corno dorsal, localizado na medula espinhal através do sistema nervoso periférico (SNP). A partir daí, este estímulo é transmitido para centros superiores no sistema nervoso central (SNC) onde a dor é processada e percebida (YAM et al., 2018).

Os tratamentos para dor neuropática incluem terapias farmacológicas, e não farmacológicas. Os tratamentos farmacológicos de primeira linha atualmente recomendados incluem antidepressivos e anticonvulsivantes. Entretanto, em alguns casos, apenas a terapia farmacológica não é capaz de controlar adequadamente a dor (XU; ZHANG; HUANG, 2016).

Nesse sentido, produtos naturais vem sendo amplamente estudados há anos para o desenvolvimento de possíveis fármacos para o tratamento de dor.

1.1 Dor

Têm-se como definição, de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor – IASP, que “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou em potencial, ou descrito em termos de tal dano”. De uma maneira simplista podemos classificar os processos dolorosos em dois grandes grupos: dor aguda e dor crônica. A dor aguda é resultante de lesões ocorridas no tecido, podendo assim desencadear uma reação inflamatória aguda, que, no entanto, possui função de proteção e tem período curto de duração, de segundos a dias (MILLAN, 1999) e fácil controle. Em relação à dor crônica, esta tem

característica patológica, é comumente de origem inflamatória e/ou decorrente de lesão nervosa e seu período de duração é prolongado, de meses a anos (MILLAN, 1999).

A dor crônica apresenta alterações sensoriais como hiperalgesia, designada pelo aumento da sensação dolorosa causada por um estímulo nocivo, e alodinia, sensibilidade em que um estímulo previamente inócuo passa a ser interpretado como doloroso, causando uma mudança qualitativa na sensação nociceptiva (BESSON, 1999; MILLAN, 1999). Esta condição não altera apenas a atividade do sistema neuronal, mas também envolve interações entre neurônios e células imunocompetentes, incluindo células endoteliais, macrófagos, células T e células gliais, que medeiam esta interação através de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (GOSSELIN et al., 2010; SCHOLZ; WOOLF, 2007). Esta relação pode ser melhor descrita como a interface neuroimune (GRACE et al., 2014).

A dor é um problema mundial, de saúde pública. Estimativas sugerem que 20% da população adulta sofra de algum tipo de dor e 10% são recém-diagnosticados com dor crônica a cada ano. Afeta todas as populações, independentemente da idade, sexo, renda, raça/etnia ou geografia (GOLDBERG; MCGEE, 2011), interferindo com diversos aspectos da vida do paciente, entre eles o sono, a recreação, ambiente familiar, atividades ocupacionais, atividades profissionais, sendo que alguns pacientes apresentam, ainda, graves sintomas de depressão. Apesar dos avanços das pesquisas relacionadas à dor crônica, o seu tratamento ainda apresenta grandes dificuldades. Os analgésicos usuais utilizados na clínica não apresentam efeito satisfatório no tratamento desta condição. Em vista disto outros medicamentos como gabapentinóides e antidepressivos vem sendo utilizados, mas muitos pacientes continuam apresentando dor mesmo com a administração destes medicamentos (TORRANCE et al., 2007). Sendo assim, os fármacos atualmente disponíveis não revertem o quadro doloroso completamente e ainda, acarretam diversos efeitos adversos (CARTER et al., 2014).

Modelos animais são fundamentais para a melhor compreensão da fisiopatologia da dor neuropática bem como para o desenvolvimento de uma terapia eficaz para seu manejo ideal. Nesse sentido, diversos modelos de neuropatia foram desenvolvidos para mimetizar as condições clínicas da dor com diversas etiologias (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011).

O modelo de ligação parcial do nervo isquiático (PSNL, do inglês, *partial sciatic nerve ligation*) foi descrito por Seltzer e colaboradores em 1990. Neste modelo os animais apresentam muitos sintomas que são observados na clínica (SELZER; DUDNER; SHIR, 1990). Além disso, após a lesão de um nervo periférico foi observado não apenas indicadores comportamentais de dor persistente, mas também uma cascata de eventos que resulta na liberação de mediadores inflamatórios bem como a expressão alterada de diversos tipos de células no local da lesão, no gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês, *dorsal ganglia root*) e na medula espinal (MALMBERG; BASBAUM, 1998).

De uma forma geral, a patogênese da dor neuropática envolve alterações na atividade dos sistemas neuronais, interações neuro-imunes mediadas por citocinas inflamatórias e quimiocinas. Entre as células imunes envolvidas nessas interações encontram-se os macrófagos e suas contrapartes do sistema nervoso central, a micróglia. Ainda, dependendo do tipo de lesão (traumática, metabólica, neurotóxica, infecciosa ou invasão tumoral), o perfil dos macrófagos ativados e da microglia em termos de tempo, local e subtipo pode variar substancialmente, devido à sua notável plasticidade que permite afinar sua fisiologia de acordo para sinais microambientais (RISTOIU, 2013).

Baseado nas informações descritas acima torna-se relevante investigar novas drogas para o tratamento da dor crônica. Sabe-se que componentes naturais tanto de origem vegetal como de origem animal vêm sendo amplamente estudados e tem sido considerados uma rica fonte para o desenvolvimento de possíveis fármacos para o tratamento de dor.

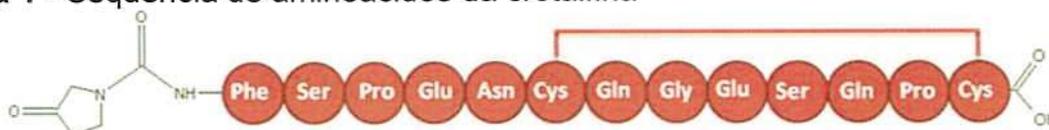
1.2 Crotalina

Dados do início do século passado já demonstravam que o veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) era utilizado como analgésico em seres humanos (BRAZIL, 1972, 1934). Apesar do efeito analgésico da crotoxina já ser conhecido, sabe-se que esta não induz antinocicepção quando administrada por via oral. Estudos experimentais realizados pelo nosso grupo com o intuito de confirmar e melhor caracterizar a atividade analgésica do veneno crotálico mostraram que a administração oral do veneno em camundongos ou ratos, induz antinocicepção

mediada pela ativação de receptores opioides do tipo κ e/ou δ (GIORGI et al., 1993; PICOLO et al., 1998; PICOLO et al., 2003; PICOLO et al., 2004; PICOLO et al., 2000). Subsequentemente à ativação dos receptores opioides, ocorre, periféricamente, ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais de K^+ dependentes de ATP, mecanismo molecular fundamental para o efeito antinociceptivo periférico do veneno (PICOLO; CURY, 2004; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000). Apesar da atividade opioide, o tratamento prolongado com o veneno crotálico não induz tolerância ao efeito antinociceptivo no modelo de hiperalgisia induzida por carragenina (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000) e não acarreta o aparecimento de sintomas que caracterizam uma síndrome de abstinência (BRIGATTE; HOFFMANN; BERNARDI, 2001). Foi também demonstrado que o efeito antinociceptivo do veneno crotálico é de longa duração, sendo detectado por até 72 horas, quando avaliado em modelo animal de neuropatia por constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ et al., 2008) e 120 horas, quando avaliado nos modelos de hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina ou prostaglandina E_2 (PGE_2) (BRIGATTE; HOFFMANN; BERNARDI, 2001; PICOLO; CURY, 2004; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000).

Baseado nestes dados, foram realizados estudos para a purificação, isolamento e caracterização do componente analgésico presente no VCdt. Assim foi identificada a crotalfina (CRO), substância capaz de reproduzir os efeitos observados para o veneno. A CRO é um peptídeo de 14 aminoácidos, contendo uma ponte dissulfídica e um ácido piroglutâmico. Este peptídeo apresenta similaridade com a cadeia gama da crotapotina, a sub-unidade não tóxica da forma heterodimérica da crotoxina, a principal neurotoxina do veneno crotálico (AIRD et al., 1990; BON et al., 1989; FAURE et al., 1991). Apesar da CRO apresentar efeito opioide, a sua estrutura química não se assemelha a nenhum peptídeo opioide conhecido (GUTIERREZ et al., 2008).

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da crotalfina



Fonte: Konno et al., 2008.

Estudos anteriores demonstraram também que em modelos de dor aguda e crônica, quando administrada em baixas doses por via oral, intraplantar ou intravenosa a crotalfina acarreta um potente efeito analgésico. Este efeito é de longa duração, de 2 a 3 dias após uma única dose, em modelos de câncer ósseo ou de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático e de até 5 dias quando utilizada em modelo de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E₂. Periféricamente, este efeito é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo *kappa* e/ou *delta* (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008).

Sobre seu mecanismo de ação, sabe-se que envolve a participação de receptores canabinoides do tipo 2 (CB₂) e subsequente liberação de dinorfina A, um agonista endógeno de receptores *kappa* opioides, sugerindo uma interação entre os sistemas opioide e canabinoide (MACHADO et al., 2014). Não foi observado, até o momento, o desenvolvimento de qualquer efeito adverso mesmo para o tratamento por 15 dias com a crotalfina (GUTIERREZ et al., 2008).

Estudos adicionais que avaliaram a modulação da crotalfina sobre o comportamento funcional de macrófagos residentes ou estimulados com LPS mostraram que o peptídeo inibe fagocitose, liberação de H₂O₂ e produção de óxido nítrico por estas células. Ainda, estimula a secreção de IL-1 β e modula a secreção de IL-6, aumentando sua secreção em macrófagos residentes e inibindo em macrófagos inflamatórios. Ainda, a crotalfina inibe a secreção de TNF- α , independentemente do estado de ativação dos macrófagos. Desta forma, a ação da crotalfina em células imunes, pode contribuir para uma ação anti-inflamatória (VELHOTE, 2013).

1.3 Analgésicos opioides

O ópio e seus derivados são usados há séculos, tanto de maneira medicinal como recreativa. Além disso, a descoberta de sementes de papoula fossilizadas datadas de 30 mil anos atrás sugerem o uso do ópio pelo homem de Neandertal. Em 1799, Friedrich Sertürner descobriu o principal ingrediente ativo do ópio e nomeou morfina e opioides (SERTÜRNER; SCHMITZ; ADAM, 2016).

A morfina e seus derivados são usados hoje para o tratamento da dor aguda e crônica e atuam sobre o sistema opioide endógeno, que não está apenas envolvido no estabelecimento do limiar de dor e no controle do processamento nociceptivo, mas também participa da modulação da função gastrointestinal, endócrina e autonômica, bem como possível papel na cognição (LAW; LOH, 2013). Além de opióides exógenos, opióides endógenos são capazes de modular estas mesmas funções. A atuação de opióides exógenos e endógenos se dá por ação em receptores opióides, que são receptores acoplados à proteína G.

Os receptores clássicos opióides são *mu* (μ ou MOR), *delta* (δ ou DOR) e *kappa* (κ ou KOR) e seus ligantes endógenos são derivados de quatro precursores: pro-encefalina, pro-opiomelancortina e pro-dinorfina. Os agonistas endógenos de receptores *kappa* são met-encefalina e leu-encefalina, clivados da pro-encefalina. A pro-dinorfina dá origem a dinorfina A agonista de receptores *kappa*. A pro-opiomelancortina codifica o β -endorfina, que tem atividade agonista em todos os três receptores opióides clássicos (BENARROCH, 2012). Por outro lado o precursor de endomorfina 1 e 2 agonista do receptor *mu* ainda é desconhecida (DHAWAN et al., 1996).

Com relação a localização, receptores *mu*, *kappa* e *delta* estão amplamente localizados no sistema nervoso central em áreas responsáveis pela integração sensorio-motora e funcionamento cognitivo e no sistema nervoso periférico em terminais nervosos sensoriais periféricos, bem como em outros tecidos não neurais, como o epitélio vascular ou queratinócitos (LESNIAK; LIPKOWSKI, 2011).

De forma geral a ativação de receptores opioides, resulta na redução da excitabilidade das células neuronais levando a diminuição da transmissão de impulsos nervosos junto com a inibição de liberação de neurotransmissores (ROECKEL et al., 2016).

Além do efeito analgésico, tem sido descrito ação anti-inflamatória para os opioides. Dados da literatura relatam que os opioides podem interferir em diferentes estágios do processo inflamatório e que algumas células como granulócitos, monócitos/macrófagos e linfócitos podem produzir e liberar peptídeos opioides. Ainda, dados demonstram que opioides inibem a produção e secreção de citocinas por macrófagos M1 (ZHANG et al., 2017), além de inibir a proliferação de células progenitoras de macrófagos (NINKOVIĆ; ROY, 2013). Os opioides interferem ainda

com a inflamação neurogênica, uma vez que os receptores opioides, quando ativados por seus agonistas endógenos ou exógenos, se acoplam a proteína Gi que por sua vez atua na redução da excitabilidade do neurônio e, subsequentemente na redução da liberação de substância P, resultando em efeitos anti-inflamatórios (STEIN; KÜCHLER, 2013).

Vale ressaltar que seu uso torna-se limitado devidos aos efeitos colaterais associados a seu uso, como por exemplo, depressão respiratória, dependência, sedação e euforia (BODNAR; KLEIN, 2004). Além disso, outro efeito muito comum observado após a administração de opioides é a hiperalgesia, o aumento da sensibilidade dolorosa, que pode ocorrer logo após seu uso, em baixas doses ou de forma tardia após o término do tratamento, e que pode contribuir para o desenvolvimento de tolerância. Em conjunto, o uso de fármacos opioides muitas vezes pode se tornar limitada (JENSEN et al., 2009). Considerando essas informações, tem sido relevante a busca por novos medicamentos com o menor número de efeitos colaterais.

1.4 Canabinoide x opioide

Dados da literatura demonstram o uso de canabinoides como tratamento para doenças associadas a alterações do SNC, devido a sua capacidade em aliviar sintomas associados a estas condições, como a dor e inflamação (BONFÁ; VINAGRE; FIGUEIREDO, 2008; ZUARDI, 2006). Os canabinoides podem ser divididos em três classes principais: fitocanabinoides (Δ^9 -tetrahydrocannabinol – THC, canabidiol e canabinol), endocanabinoide (anandamida e 2-aracdonilglicerol) e canabinoides sintéticos, que atuam em dois tipos de receptores, os receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁), encontrados principalmente no SNC, neurônios e células do sistema imune (GALIÈGUE et al., 1995; HERKENHAM, LYNN, LITTLE, JOHNSON, MELVIN, DE COSTA, 1990; HOWLETT et al., 2004; KATONA et al., 2000; PERTWEE, 2001), e do tipo 2 (CB₂), encontrados predominantemente no sistema periférico e células do sistema imunológico, tendo grande importância na mediação dos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios dos canabinoides (DEWEY; PODDAR; JOHNSON, 1978; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2007; MARTIN; LICHTMAN, 1998; MILLER; STELLA, 2008; ROM; PERSIDSKY, 2013).

A presença de interação funcional entre o sistema opioide e canabinoide tem sido demonstrada em várias respostas farmacológicas bem como pela aplicação terapêutica de uma co-administração de canabinoides e opioides para controlar a dor, modular o sistema imunológico e as emoções (PAROLARO et al., 2010).

Ambos receptores são acoplados a proteína de ligação Gi/G0 e sua ativação inibe a atividade da adenilil ciclase, bloqueia os canais de cálcio voltagem-dependentes, ativa os canais de potássio e estimula a cascata de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Devido a sua localização pré-sináptica, o principal efeito da ativação de receptores de canabinoides e opioides é a inibição da liberação de neurotransmissores (CHILDERS et al., 2006; MACKIE, 2008; WÖLFL et al., 2009).

Vários estudos demonstraram que receptores opioides e canabinoides podem interagir funcionalmente no SNC. Estas interações podem ser diretas, através da heteromerização do receptor, ou indiretas, por meio de sinais cruzados de sinalização que incluem liberação mediada por agonistas e/ou síntese de ligantes endógenos que podem ativar esses receptores (BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010).

Além disso, tanto os receptores canabinoides como os opioides são encontrados em áreas comuns e ainda estão co-localizados em regiões que controlam a nocicepção como núcleo talâmico centro-medial, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal e corno dorsal da medula espinal. Ainda estudos demonstraram que esses dois sistemas podem potencializar um ao outro, (CICHEWICZ, 2004; PAROLARO et al., 2010).

Dados da literatura relatam que agonistas de receptores canabinoides induzem a liberação de opioides endógenos, da mesma forma que agonistas opioides podem acarretar a liberação de encanabinoides (IBRAHIM et al., 2005; WELCH; EADS, 1999). Foi observado também que a naloxona, um antagonista opioide não seletivo, previne efeito analgésico de um agonista de receptores canabinoides do tipo 2 demonstrando o envolvimento de receptores opioides na analgesia induzida por canabinoides (SMITH; WELCH; MARTIN, 1994; WELCH; EADS, 1999). Além disso, o efeito dos canabinoides pode ser dependente da liberação de opioides endógenos (BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010; MARTIN; LICHTMAN, 1998; PAROLARO et al., 2010).

Baseado nos fatos de que (1) um dos sintomas importantes apresentados na indução de neuropatia por lesão nervosa periférica (PSNL) é a dor crônica, e que este sintoma é decorrente do aumento da resposta inflamatória periférica mas principalmente central, (2) que a crotalina acarreta analgesia potente e de longa duração tanto em modelos de dor aguda quanto crônica, (3) o mecanismo de ação periférico da crotalina foi anteriormente explorado, porém seu efeito central é desconhecido, torna-se relevante entender a ação da crotalina no processo de sensibilização central e sua possível ação sobre a resposta inflamatória induzida pela lesão de nervo periférico (PSNL).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da crotalina no modelo de PSNL, particularmente em relação a sua possível ação central ainda desconhecida, os mecanismos responsáveis por este efeito, bem como sua possível interação com células imunes. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

Avaliar o efeito da crotalina no controle da nocicepção induzida pelo modelo de neuropatia periférica (PSNL), verificando:

- Seu efeito sobre a hipersensibilidade durante as fases aguda e crônica da neuropatia;
- Sua possível interferência no desenvolvimento da neuropatia e cronificação da dor;
- O mecanismo de ação do seu efeito central quanto ao subtipo de receptores opioides e canabinoides envolvido.

Avaliar os possíveis efeitos no desenvolvimento da neuropatia periférica, quanto a:

- Envolvimento e a presença células gliais na medula espinal dos animais submetidos à cirurgia de PSNL;
- Produção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal, após a indução da neuropatia;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas diferentes técnicas descritas a seguir.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan (CEUA nº 3380310317), mantidos sem restrição hídrica ou alimentar em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} + 1$) e ciclo claro-escuro (12:12 h), em caixas de microambiente por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos.

3.2 Delineamento experimental

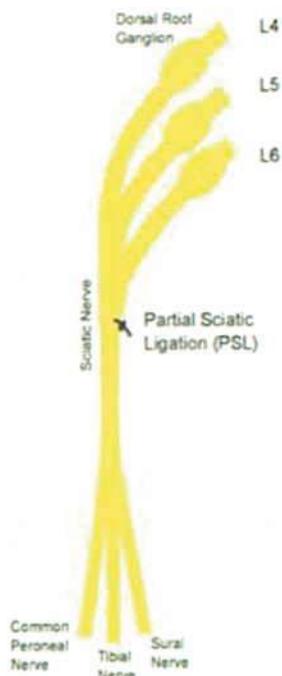
Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo central da CRO no modelo de PSNL. Inicialmente, investigamos a efetividade da crotalfina neste modelo. Para tanto, os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa por estimulação mecânica (item 3.4.1) antes e após cirurgia de ligação parcial do nervo isquiático (PSNL) conforme descrito no item 3.3. O tratamento com a CRO foi realizado, por via oral, conforme descrito no item 3.7, de duas maneiras: (1) tratamento na fase aguda da dor, a partir do 3º dia após a cirurgia ou (2) tratamento na fase crônica, a partir do 14º dia da cirurgia. Esses ensaios tiveram como objetivo avaliar se a CRO é efetiva tanto na fase aguda (preferencialmente inflamatória) como na fase crônica da dor (onde a neuropatia já está instalada), e também se o controle da fase aguda poderia interferir com a instalação da neuropatia, bem como a duração do efeito analgésico nos diferentes tempos. Uma vez que estudos anteriores do nosso grupo comprovaram que, periféricamente, a crotalfina é capaz de ativar receptores canabinoides do tipo CB_2 presentes no tecido da pata, e que esta ativação acarreta a liberação de dinorfina A, agonista endógeno de receptores *kappa*. Além disso, também foi demonstrado que a ação periférica da crotalfina difere em modelos de dor aguda e crônica, uma vez que em modelo de dor aguda sua ação é em receptores *kappa*, enquanto que em modelos de dor crônica

observa-se a participação de receptores opióides *kappa* e *delta*. Assim, investigamos quais receptores mediarão o efeito central da crotalfina. Para tanto, avaliamos a participação de receptores opióides *mu*, *kappa* e *delta* e de receptor canabinoide CB₁ e CB₂, através da injeção i.t. de antagonistas seletivos destes receptores (de acordo com o item 3.7.). Em seguida investigamos a participação de endocanabinoides e opioides endógenos presentes no SNC no efeito analgésico da crotalfina, através da injeção i.t. de anticorpos anti-opioides endógenos e de inibidores enzimáticos (de acordo com o item 3.7.). Para verificar o envolvimento de micróglia no efeito analgésico da crotalfina utilizamos um inibidor desta célula (de acordo com o item 3.7.). A participação de células gliais da medula espinal foram avaliadas por *Western blotting* de acordo com o descrito no item 3.5.. A quantificação de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal foi avaliada por ensaio imunoenzimático (item 3.6.)

3.3 Indução de neuropatia

A cirurgia do modelo de PSNL (do inglês, *partial sciatic nerve ligation*) foi realizada como descrito por Malmberg e Basbaum, em 1998 (MALMBERG; BASBAUM, 1998). Com o animal sob efeito de anestesia (1,5% Isofurano em oxigênio) e condições assépticas, o nervo isquiático foi exposto em região proximal da coxa. Para realização da lesão parcial, aproximadamente 1/3 a 1/2 do diâmetro do nervo isquiático foi fortemente amarrado com fio de sutura de seda 8.0 (figura 1). Na sequência a pele foi suturada com fio de sutura de seda 4.0. Os animais controle falso-operados (*Sham*) também foram submetidos a cirurgia, mas o nervo foi apenas manipulado e em seguida a pele foi suturada.

Figura 2 - Cirurgia de PSLN



Fonte: Calvo et al., 2012. Adaptada.

3.4 Avaliação nociceptiva: Filamentos de *von Frey*

Para avaliação de alodínia mecânica tátil foi utilizado o teste com filamentos de *von Frey*, que consiste em uma série logarítmica de 8 filamentos de náilon (Aesthesiomer Semmer-Weinster, Stoelting Co., EUA) com variação progressiva de pressão. O valor de cada filamento é dado em \log_{10} (gramas $\times 10^4$), tendo os seguintes valores 1,65, 2,36, 2,44, 2,83, 3,22, 3,61, 3,84 e 4,08 sendo seus valores em gramas 0,008 g, 0,02 g, 0,04 g, 0,07 g, 0,16 g, 0,4 g, 0,6 g e 1,0 g respectivamente. Os filamentos com peso superior a 4,08 não foram utilizados. A sensibilidade tátil foi avaliada através da aplicação de um estímulo de pressão leve e constante na região central da pata, necessário para determinar a retirada ou *flinch* da pata traseira. Os camundongos foram colocados sobre uma plataforma metálica perfurada (célula de 0,8 x 0,8 cm), elevada 30 cm da superfície, sobre a qual foi adaptada uma caixa acrílica transparente (8 x 8 x 18 cm) dividida em dez compartimentos iguais. Antes do teste os animais permaneceram nestas caixas por aproximadamente 20 minutos, até cessar a atividade exploratória.

O teste inicia-se com um filamento, de valor intermediário (0,16 g). Se o animal apresenta resposta positiva ao estímulo, o próximo filamento de menor diâmetro é testado; se o animal apresenta uma resposta negativa, o filamento de maior força é testado, e este procedimento será repetido até que o limiar seja determinado. Cada filamento será aplicado cinco vezes consecutivamente. O limiar nociceptivo mecânico foi definido como o filamento de menor diâmetro que provocar uma rápida retirada da pata, em pelo menos uma das cinco tentativas (TAL; BENNETT, 1994).

3.5 Western Blotting

Após os testes comportamentais e o tratamento com a CRO os animais sofreram eutanásia, em seguida o corno dorsal do segmento lombar ipsilateral e os gânglios da raiz dorsal localizados entre L3-L6 ipsilateral à lesão foram coletados. Para extração de proteína, as amostras foram homogeneizadas em um volume de 50 µL com RIPA *buffer* (R0278, Sigma-Aldrich, EUA) com coquetel inibidor de protease e fosfatase (1:300, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000g, por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, foi determinada a quantidade de proteína do sobrenadante pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As alíquotas de proteínas foram fervidas em tampão Laemmli e posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 e 12 %), em aparelho para minigel (Mini-Protean, Biorad, Brasil). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). As membranas foram bloqueadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente em TBS-T (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, e 0,1 % Tween 20) contendo 5 % de BSA ou em TBS-T contendo 5 % de agente de bloqueio (RPN2125, GE Healthing care, UK), depois lavadas 3 vezes de 5 minutos com 10 mL de TBS-T. Em seguida foram incubadas em TBS-T 5 % de BSA ou em TBS-T contendo 5 % de agente de bloqueio com anticorpos anti-iNOS (Ab49999, 1:1000, Abcam, EUA), anti-liver Arginase (Ab91279, 1 µg/mL, Abcam, EUA), anti-Iba-1 (Ab178847, 1:1000, Abcam, EUA, bloqueio realizado em TBA-T com 5% de agente de bloqueio) e anti-GFAP (D1F4Q, 1:1000, Cell Signaling, EUA, incubação em agente de bloqueio), *overnight* a 4 °C. Posteriormente as membranas foram lavadas

3 vezes por 5 minutos com 10 mL de TBS-T e então incubadas por 1 hora e 30 minutos com anti-IgG do animal produtor do respectivo anticorpo primário conjugado a peroxidase (1:5000, Abcam, EUA). As bandas foram visualizadas utilizando solução ECL (Pierce) em fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem (UVITEC Cambridge). A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa UVITEC Cambridge. A quantidade de proteína de membrana foi normalizada pela incubação da membrana com anticorpo para GAPDH (1:5000, Ab8245, Abcam, EUA) ou beta-actina (1:5000, A5316, Sigma Aldrich, EUA).

3.6 Avaliação dos níveis de citocinas

Após os testes comportamentais e o tratamento com a CRO os animais sofreram eutanásia, em seguida o segmento lombar ipsilateral foi coletado. Para extração de proteína, as amostras foram homogeneizadas em um volume de 80 μ L com PBS contendo 0,4 M de NaCl, 0,05 % de Tween, 10 mM de EDTA e coquetel inibidor de protease (1:300, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.000g, por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, foi determinada a quantidade de proteína do sobrenadante pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram determinados utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (respectivamente 559603 e 555240 BD OptEiA, San Diego, CA). A quantificação foi realizada no programa CurveExpert 1.4. O limite de detecção da curva foi de 31,3 pg/mL para L-1 β e 15,6 pg/mL para IL-6.

3.7 Tratamentos farmacológicos

- CRO (Proteimax, Brasil - Lote: P170717-HS595874), obtida por meio de síntese peptídica em fase sólida, através de estratégia Fmoc. A CRO foi administrada por via oral (p.o.) nas doses 5, 50 e 100 μ g/kg em 200 μ L.

Para avaliar a participação de receptores opioides, foram utilizados os seguintes antagonistas por via intratecal:

- CTOP (Sigma Aldrich, P5296), antagonista de receptor *mu* (150 ng/10 μ L/anima) (MIZOGUCHI et al., 2014).

- Nor-BNI (Sigma Aldrich, N1771) antagonista de receptor *kappa* (60 µg/10 µL/animal) (WANG et al., 2018).
- Naltrindol (Sigma Aldrich, N115) antagonista de receptor *delta* (10 µg /10 µL/animal) (OCHI; OHKUBO; MUTOH, 2002).

Para avaliar a participação dos receptores canabinoides, foram utilizados os seguintes antagonistas por via intratecal:

- AM251 (Sigma Aldrich, A6226), com seletividade para receptores CB₁ (10 µg /10 µL/animal) (CURTO-REYES et al., 2011).
- AM630 (Sigma Aldrich, SML0327) com seletividade para receptores CB₂ (2 µg/10 µL/animal) (EMER et al., 2018).

Para avaliar a participação de opioides endógenos foram utilizados anticorpos anti-opioides endógenos, administrados por via intratecal. Os seguintes anticorpos foram utilizados:

- Anticorpo anti-Met-Encefalina (Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA) (20 µg/10 µL/animal).
- Anticorpo anti-β-endorfina (Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA) (10 µg/10 µL/animal).
- Anticorpo anti-Dinorfina-A (Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA) (10 µg/10 µL/animal).

Para avaliar se a ação da crotalfina em receptores CB₁ e CB₂ ocorre indiretamente, pela liberação de endocanabinóides, utilizamos o Orlistat, um inibidor do diacilglicerol (precursor dos endocanabinóides, produzido a partir da hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de interferir com a antinocicepção induzida pela crotalfina, ou o MAFP (metil araquidonil fluorofosfonado), um inibidor da hidrolase amida de ácidos graxos (enzima que hidrolisa os endocanabinóides), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de potencializar a antinocicepção induzida pela crotalfina. Assim, foram administrados por via intratecal:

- Orlistat (Sigma Aldrich, O4139, EUA) (10 µg/10 µL/animal) (GREGG et al., 2012).
- Methyl arachidonyl fluorophosphonate - MAFP (Sigma Aldrich, M2939, EUA) (30 µg/ 10 µL/animal) (LUCAS et al., 2005)

Para verificar o envolvimento de células gliais no efeito analgésico da crotalfina, administramos por via intratecal um potente inibidor de ativação e proliferação de micróglia:

- Minociclina (Santa Cruz, CAS 13614-98-7, EUA) (10 nM/10 μ L/animal) (SANT' ANNA et al., 2016).

3.8 Administração intratecal

Para realização dos tratamentos farmacológicos por via intratecal, os animais foram mantidos sob efeito de anestesia (1,5% Isofurano em oxigênio) foi introduzida uma agulha (8 mm x 0,3 mm - 30G) acoplada a uma seringa (BD Ultra-Fine II) entre as vértebras L5-L6. Como indicativo da inserção correta no espaço subaracnoide, os animais realizam um movimento involuntário rápido com a cauda, o *flick*. Os compostos foram injetados apenas após a realização do *flick* pelos animais.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à de análise de variância One Way ANOVA ou Two-way ANOVA de medidas repetidas, seguidos do teste de Tukey ou Sidak. Foi utilizado o Programa GraphPad Prism 6. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A etapa inicial do projeto foi verificar o comportamento dos animais com a neuropatia induzida pelo PSNL bem como seu desenvolvimento. Em seguida buscamos investigar o mecanismo de ação central da crotalina afim de verificar se havia ou não uma diferença em relação ao que se sabia sobre. Por fim verificamos o envolvimento de células glia e a liberação de citocinas após o tratamento com a crotalina.

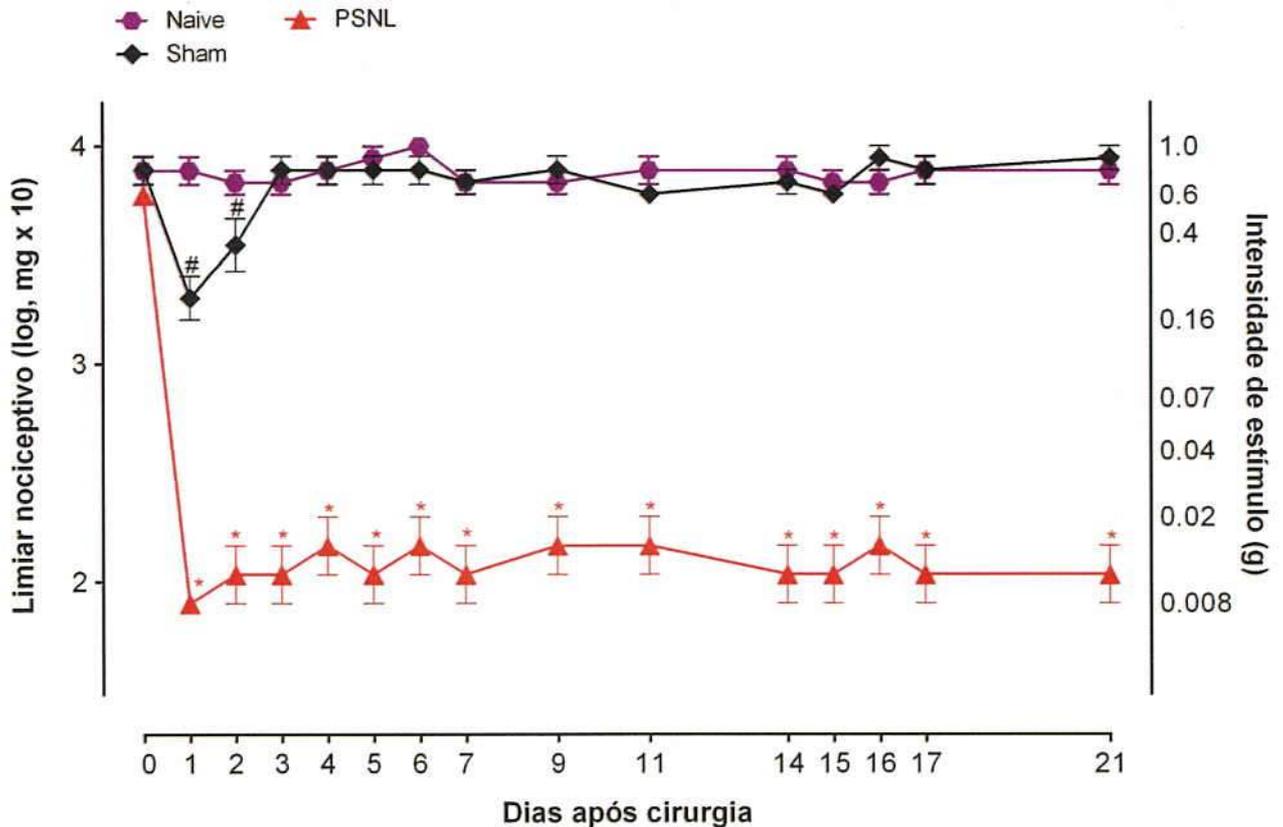
4.1 Avaliação da hipernocicepção induzida pelo modelo de PSNL

Para avaliar a instalação e duração da neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo isquiático, no dia 0 os animais foram submetidos ao teste comportamental antes, e durante os 21 dias após a cirurgia para indução da neuropatia. Como controles, foram utilizados animais falso-operados (*sham*) e animais *naive* (animais que não passaram por qualquer tipo de manipulação cirúrgica).

Os resultados demonstraram que, como esperado, os animais *naive* não apresentaram nenhuma alteração nociceptiva. Entretanto, os animais *sham* apresentaram redução leve do limiar nociceptivo no primeiro e segundo dia após a cirurgia retornando ao limiar basal no terceiro dia e que se manteve por todo período avaliado. Por outro lado, os animais com PSNL tiveram uma queda acentuada no limiar nociceptivo, ou seja, apresentaram dor, desde o primeiro dia após a cirurgia e que se manteve até 21º após a cirurgia (figura 3), corroborando dados demonstrados na literatura (MALMBERG; BASBAUM, 1998).

Considerando este resultado, foi determinado que o tratamento na fase aguda preferencialmente inflamatória seria realizado no 3º dia após a cirurgia e no 14º na fase crônica.

Figura 3 - Avaliação da hipernocicepção induzida pelo modelo de PSNL



Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos a cirurgia e foram avaliados utilizando os filamentos de von Frey por até 21 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM) $n=3-4$. Resultado representativo de 4 experimentos. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos *Sham* e *Naive*. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo *Naive*. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.2 Curva dose-resposta da crotalfina na hipernocicepção induzida pelo modelo de neuropatia (PSNL) nas fases aguda e crônica

Para determinar a dose de administração da crotalfina, foram testadas diferentes doses por via oral (p.o). A escolha das doses utilizadas para o ensaio da crotalfina via oral foi baseada em resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo (MACHADO et al., 2014).

4.2.1 Curva dose-resposta da crotalfina por via oral na hipernocicepção induzida pelo modelo de neuropatia (PSNL) nas fases aguda e crônica

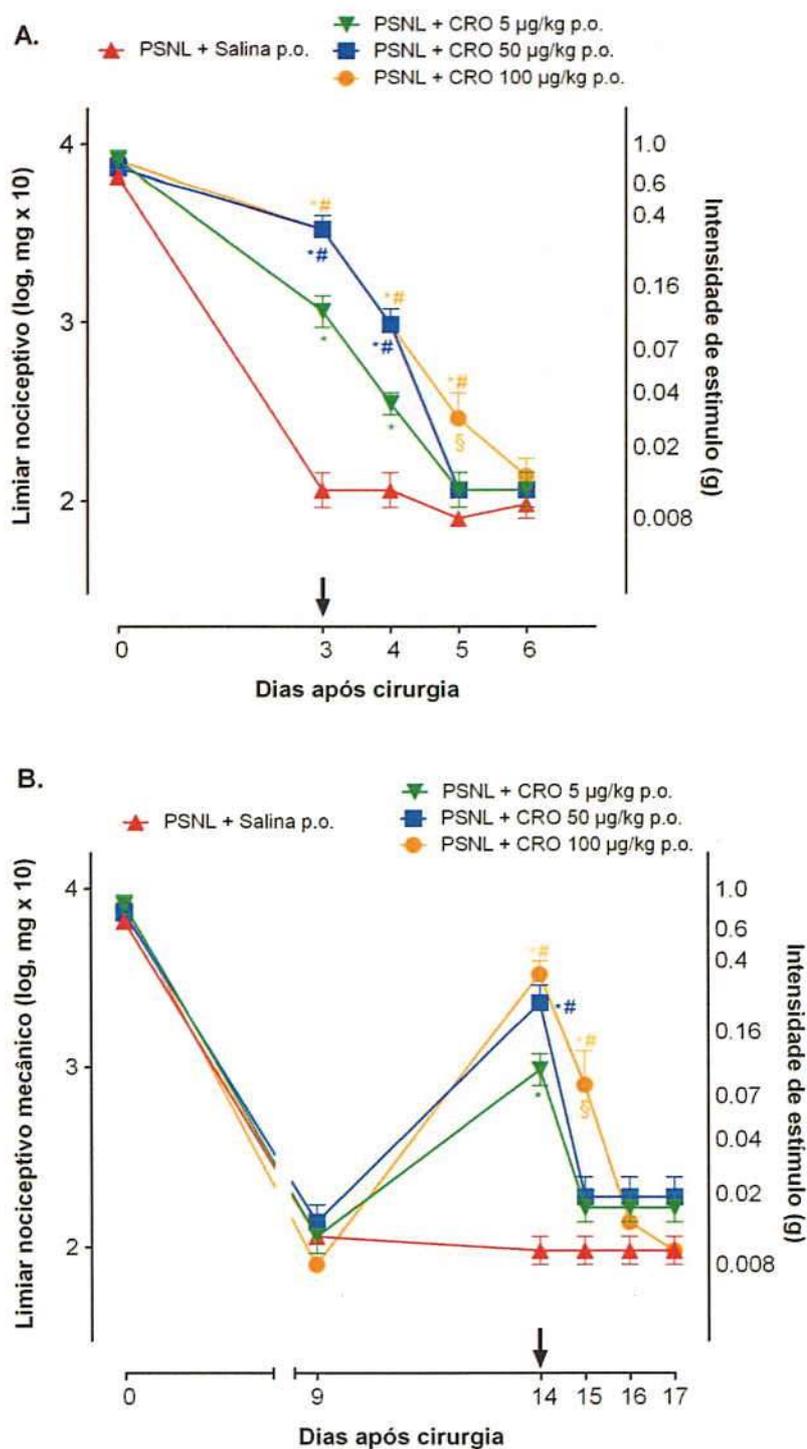
A crotalfina foi administrada por via oral no 3º dia após a indução da neuropatia (fase preferencialmente inflamatória) e os animais foram avaliados 1 hora

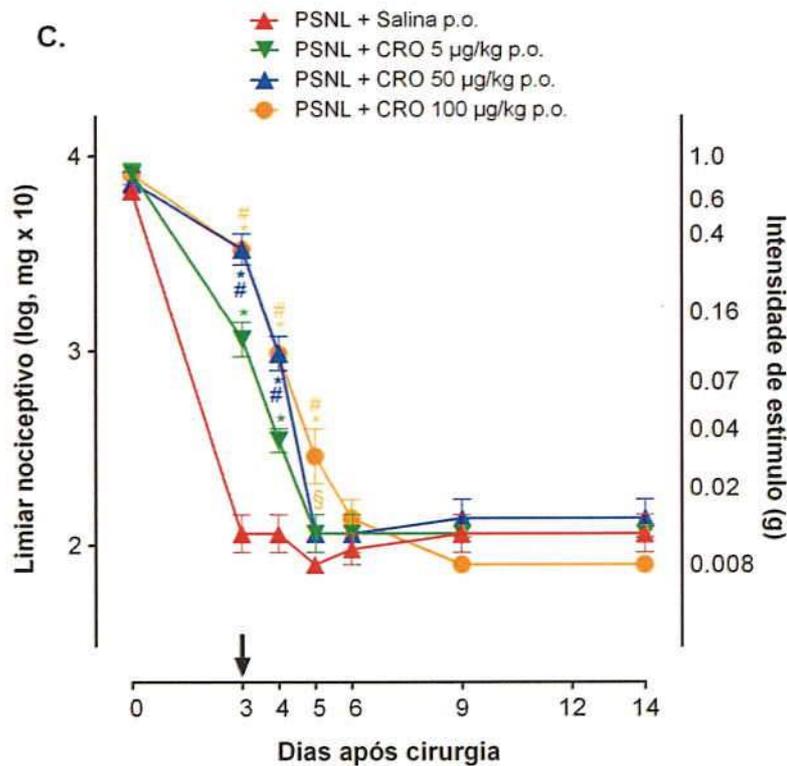
e a cada 24 h após o tratamento (figura. 4A). Foi observada que as doses de 5, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/200 \mu\text{L}$ reduziram parcialmente a dor induzida pelo modelo em relação a medida inicial e esta se mantém por até 24 horas, desaparecendo completamente, nas doses de 5 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o, 48 horas após o tratamento. Por outro lado, a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ainda manteve seu efeito analgésico parcial 48 horas após a administração.

O mesmo foi realizado no 14^o após a cirurgia, período em que a neuropatia já está instalada (figura 4B). Os resultados obtidos foram semelhantes ao observado durante a fase aguda da neuropatia. As doses de 5, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ induzem analgesia parcial na dor induzida pelo modelo de PSNL 1 hora após a administração. As doses de 5, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ não apresentam mais efeito 24 horas depois do tratamento. Em contrapartida, os animais tratados com a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresenta analgesia parcial até 24 horas após a administração.

Nossos resultados mostraram ainda que o controle da dor inflamatória na fase aguda da neuropatia não interfere com a instalação da fase crônica, uma vez que hipersensibilidade mecânica de mesma intensidade que os animais controle foi observada no 14^o dia em animais tratados previamente com crotalina no 3^o dia (figura 4C).

Figura 4 - Efeito da crotalina via oral na hipersensibilidade ao estímulo mecânico induzido pelo modelo de PSNL nas fases aguda e crônica.





Fonte: próprio autor.

Os animais foram tratados no 3º (A e C) e 14º (B) dia após a PSNL com a crotalina por via oral e uma hora após a administração os animais foram avaliados utilizando os filamentos de von Frey (A, B). Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM) $n=5$. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com grupo PSNL + Salina (A, B). # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo PSNL + CRO 5 µg/kg (A). § $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo PSNL + CRO 50 µg/kg (A). Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

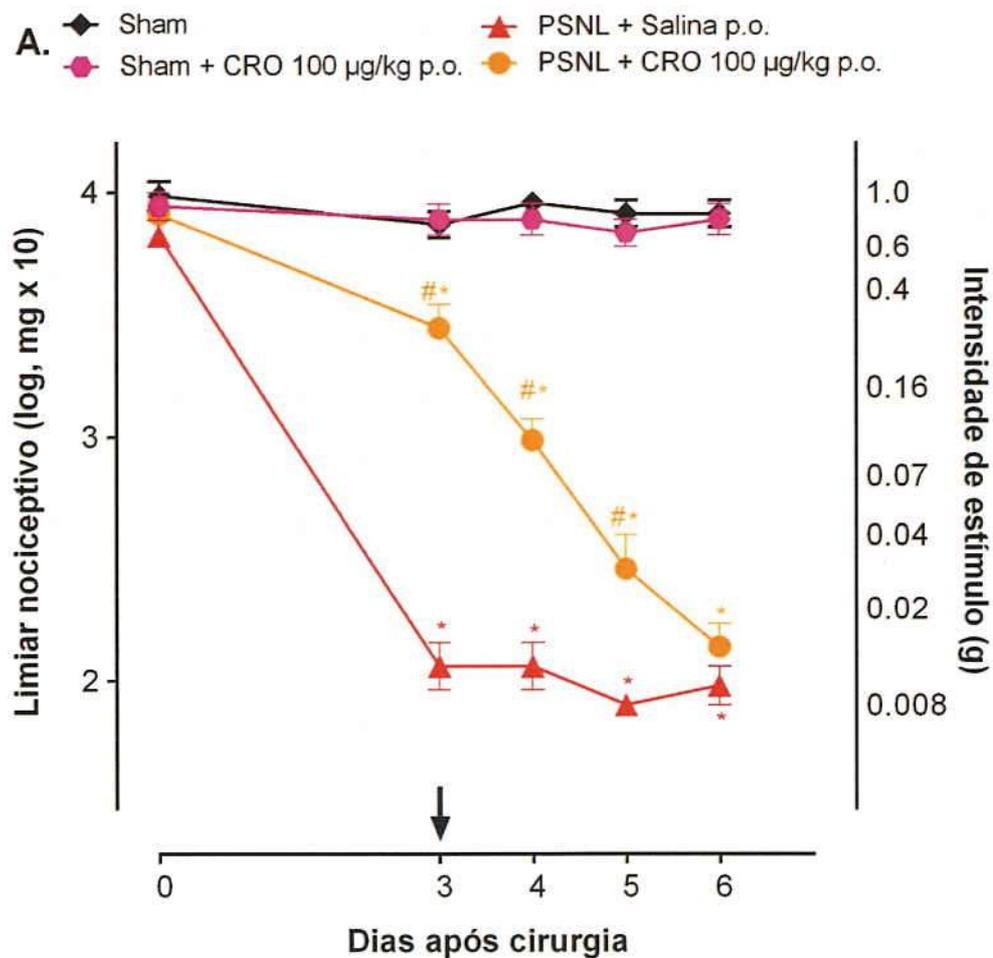
4.2.2 Avaliação do efeito da crotalina em animais falso-operados

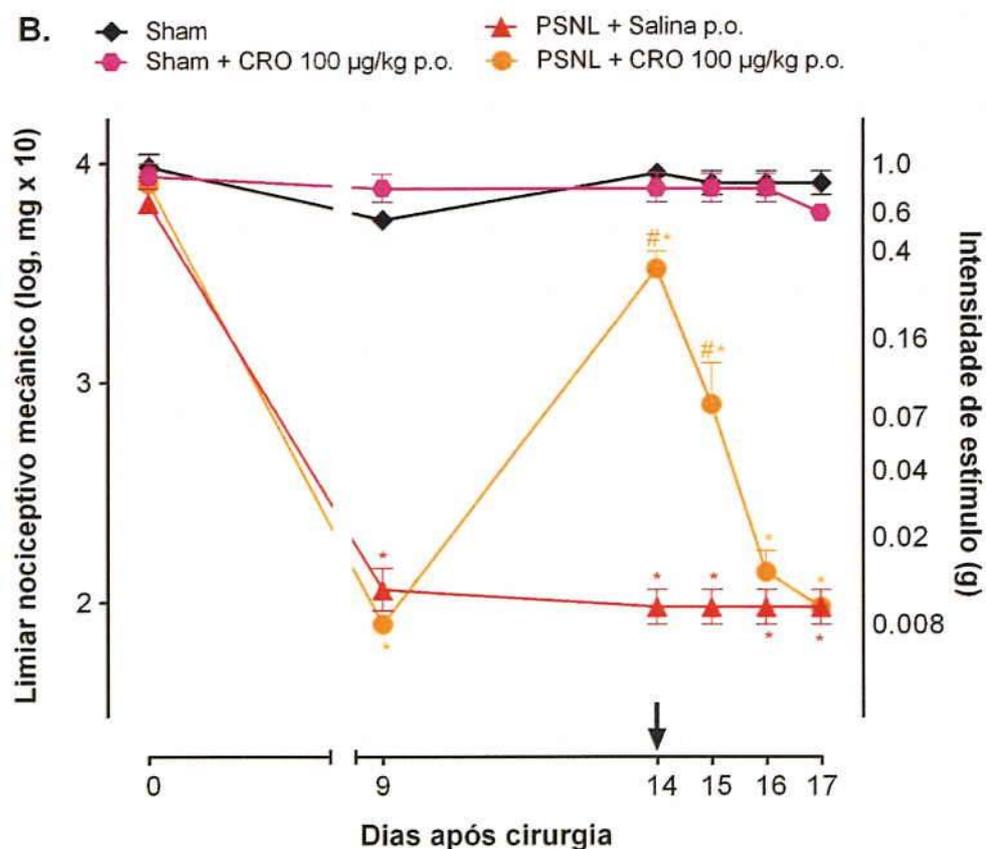
Estudos anteriores realizados pelo grupo demonstraram que em modelo de dor aguda inflamatória induzida por prostaglandina (PGE_2) a crotalina só induz efeito analgésico na presença de sensibilização (MACHADO et al., 2014; ZAMBELLI et al., 2014). Nesse sentido, investigamos se a crotalina poderia interferir com a sensibilidade de animais *sham*.

Para isso os animais foram submetidos à cirurgia e no 3º (figura 5A) ou no 14º dia (figura 5B) após a cirurgia foram tratados com crotalina e 1 hora após a administração foram avaliados. Os dados obtidos demonstraram que a crotalina não altera o limiar nociceptivo dos animais *sham*, confirmando que, independente do modelo utilizado seu efeito só é observado frente a sensibilização. Considerando

esses resultados os animais *sham* não foram mais utilizados nos experimentos subsequentes.

Figura 5 - Interferência da crotalina em animais *sham*





Fonte: próprio autor.

Os animais foram tratados no 3º (A) ou 14º (B) dia após a cirurgia de PSNL com a crotalfina por via oral e uma hora após a administração os animais foram avaliados utilizando os filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM) $n=5$. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com grupo os grupos *sham* e *sham* + CRO 100 µg/kg. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o grupo PSNL + Salina. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

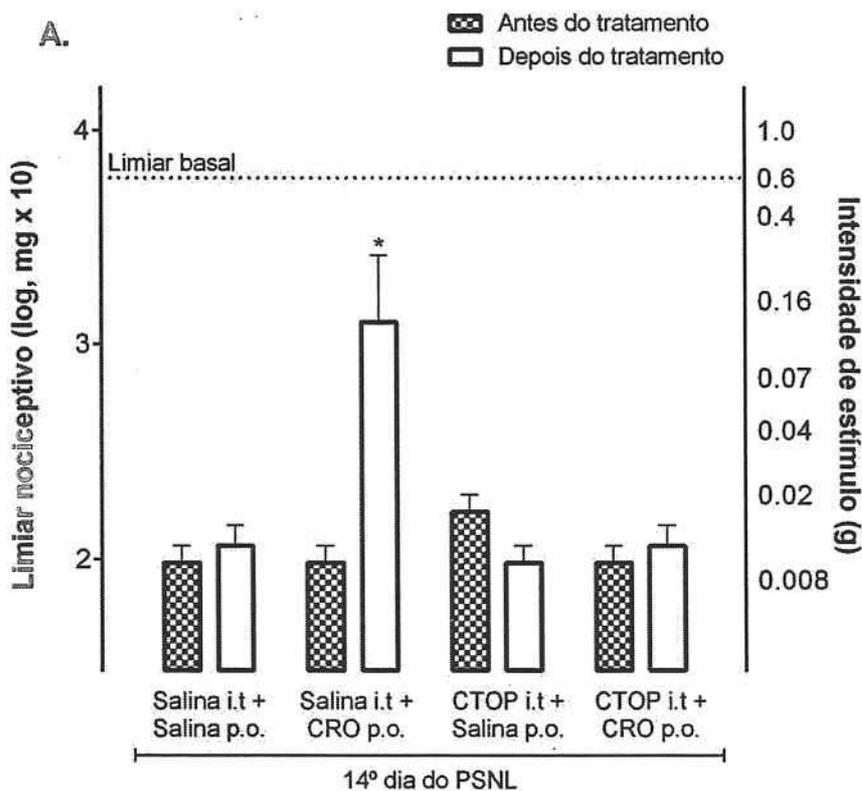
4.3 Avaliação do envolvimento de receptores opioides e canabinoides

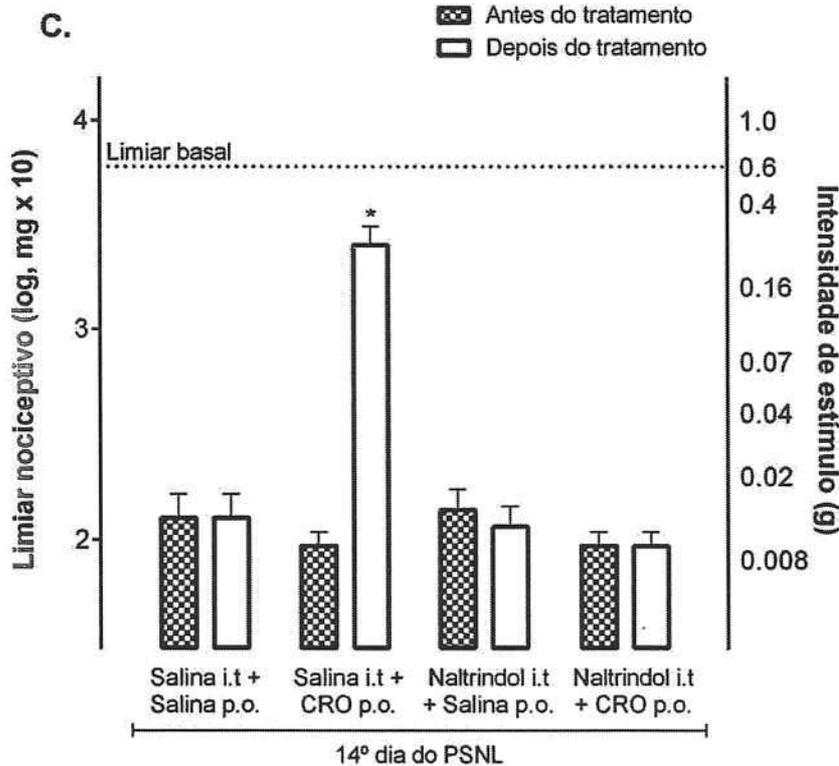
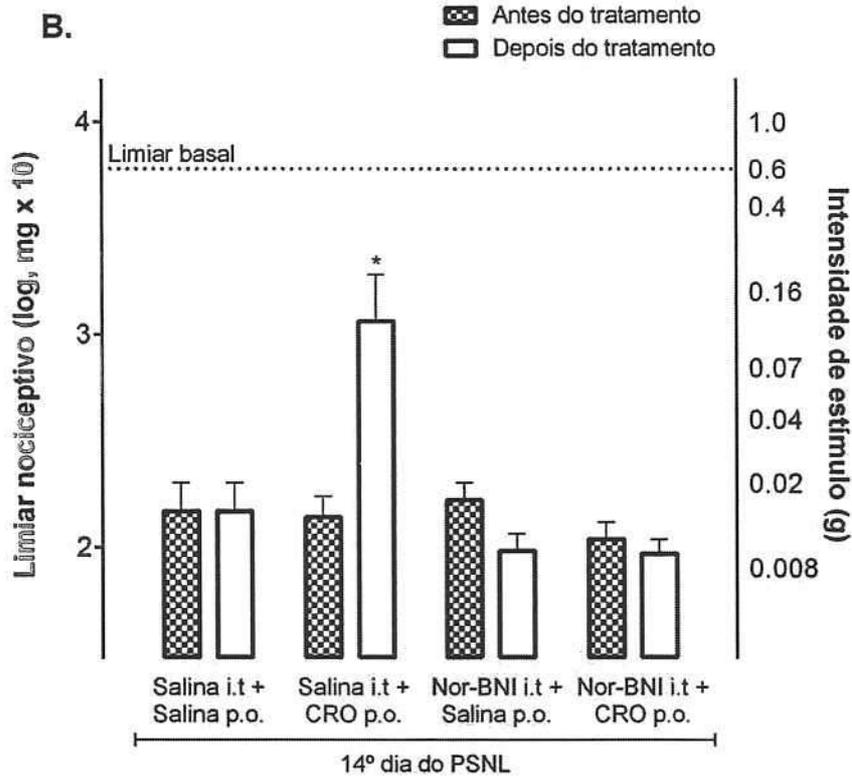
Com o intuito de avaliar os componentes centrais envolvidos no efeito da crotalfina, investigamos a participação de receptores opioides e canabinoides, uma vez que periféricamente já foi demonstrado que o efeito da crotalfina envolve receptores do tipo *kappa* e CB_2 . Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a cirurgia foram administrados, por via intratecal, os antagonistas dos receptores *mu*, *kappa* e *delta* opioides e antagonistas dos receptores CB_1 e CB_2 canabinoides e 10 minutos após os animais foram tratados com crotalfina por via oral. O limiar nociceptivo foi avaliado 1 hora depois da administração da crotalfina.

4.3.1 Avaliação do envolvimento de receptores *mu*, *kappa* e *delta* opioide

Os resultados obtidos demonstraram que como esperado a crotalina per se acarreta reversão do quadro doloroso em relação a medida inicial. Entretanto, os animais que receberam CTOP (antagonista de receptor *mu*, figura 6A), Nor-BNI (antagonista de receptor *kappa*, figura 6B) e Naltrindol (antagonista de receptor *delta*, figura 6C) por via intratecal não apresentaram o efeito analgésico da crotalina confirmando desta forma o envolvimento destes receptores centrais no efeito da crotalina.

Figura 6 - Avaliação do envolvimento de receptores *mu*, *kappa* e *delta* opioide





Fonte: próprio autor.

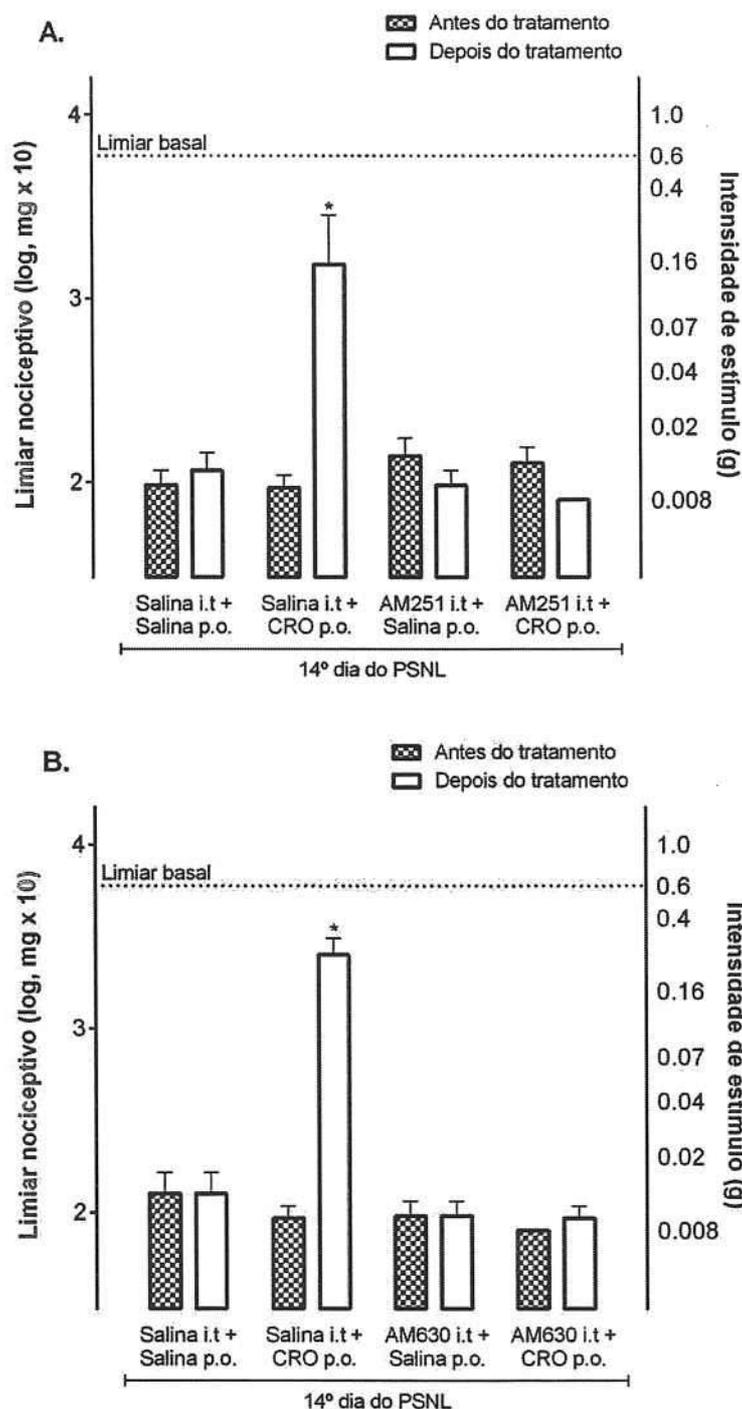
Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a indução da neuropatia foram administrados antagonistas seletivos para os receptores *mu* (A), *kappa* (B) e *delta* (C) opioides por via intratecal, 10 minutos após os animais foram tratados com a crotalina 100 µg/kg/200 µL (p.o.) e avaliados utilizando os filamentos de von Frey 1 h após. Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM). n=6. * p < 0,05 estatisticamente significante quando comparado com os grupos PSNL +

Salina i.t. e PSNL + antagonista i.t. antes e depois do tratamento. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Sidak.

4.3.2 Avaliação do envolvimento dos receptores CB₁ e CB₂ canabinoide

Os dados obtidos novamente demonstraram que como esperado a crotalfina acarreta reversão parcial do quadro doloroso induzido pelo modelo. No entanto, na presença de AM251, antagonista de CB₁ (figura 7A) e de AM630, antagonista de CB₂ (figura 7B) a analgesia acarretada pela crotalfina foi completamente bloqueada demonstrando que ambos os receptores também participam do efeito antinociceptivo da crotalfina.

Figura 7 - Avaliação do envolvimento de receptores CB₁ e CB₂ canabinoide



Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a indução da neuropatia foram administrados antagonistas de receptores CB₁ (A) e CB₂ (B) canabinoide por via intratecal, 10 minutos após foram tratados com a crotalina 100 µg/kg/200 µL (p.o.) e uma hora depois foram avaliados utilizando os filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média de (± EPM), n= 6. * p < 0,05 estatisticamente significante quando comparado com os grupos PSNL + Salina i.t. + Salina p.o. e PSNL + antagonista i.t. + Salina p.o. antes e depois do tratamento. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Sidak.

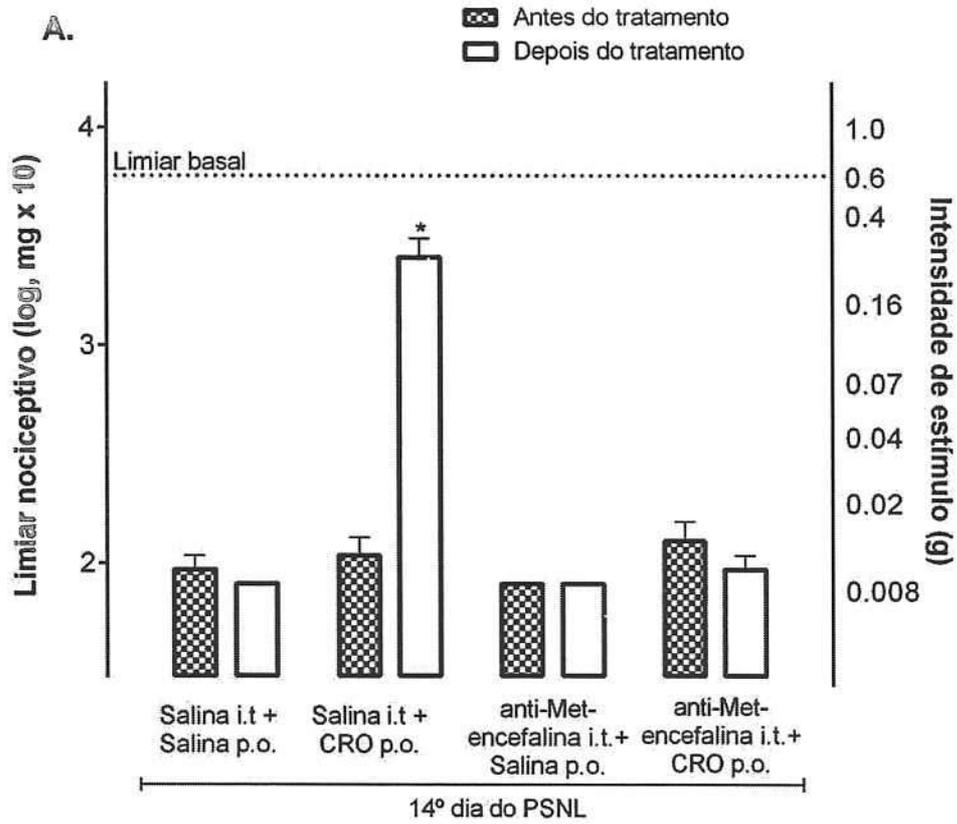
4.4 Avaliação da participação de opioides endógenos e endocanabinoides no efeito analgésico induzido pela crotalfina

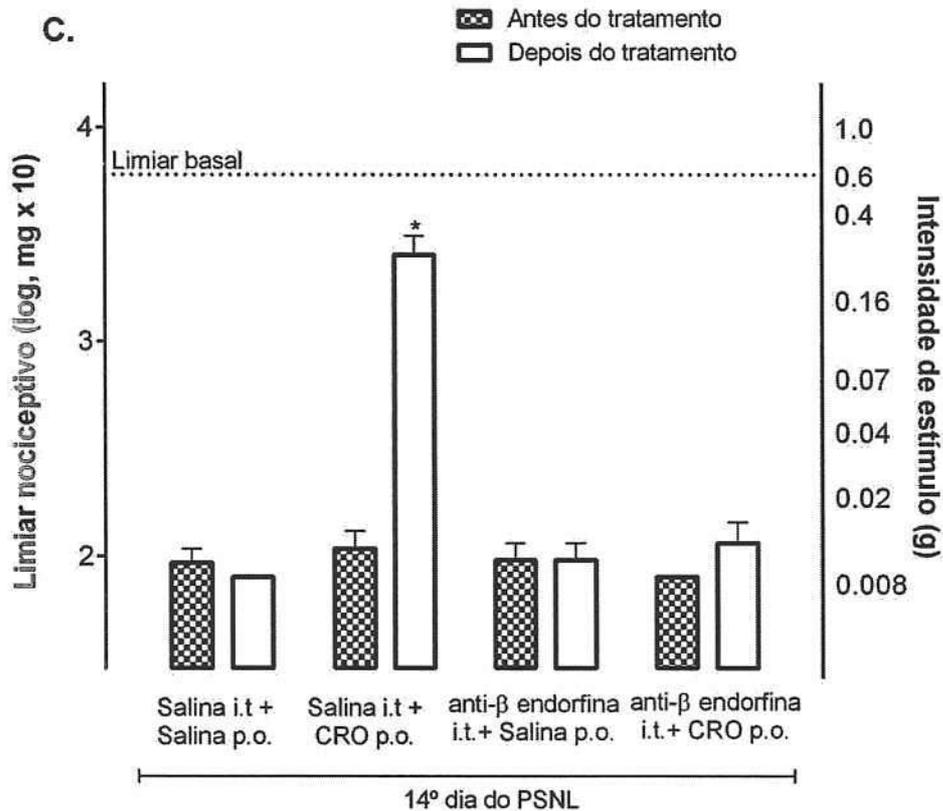
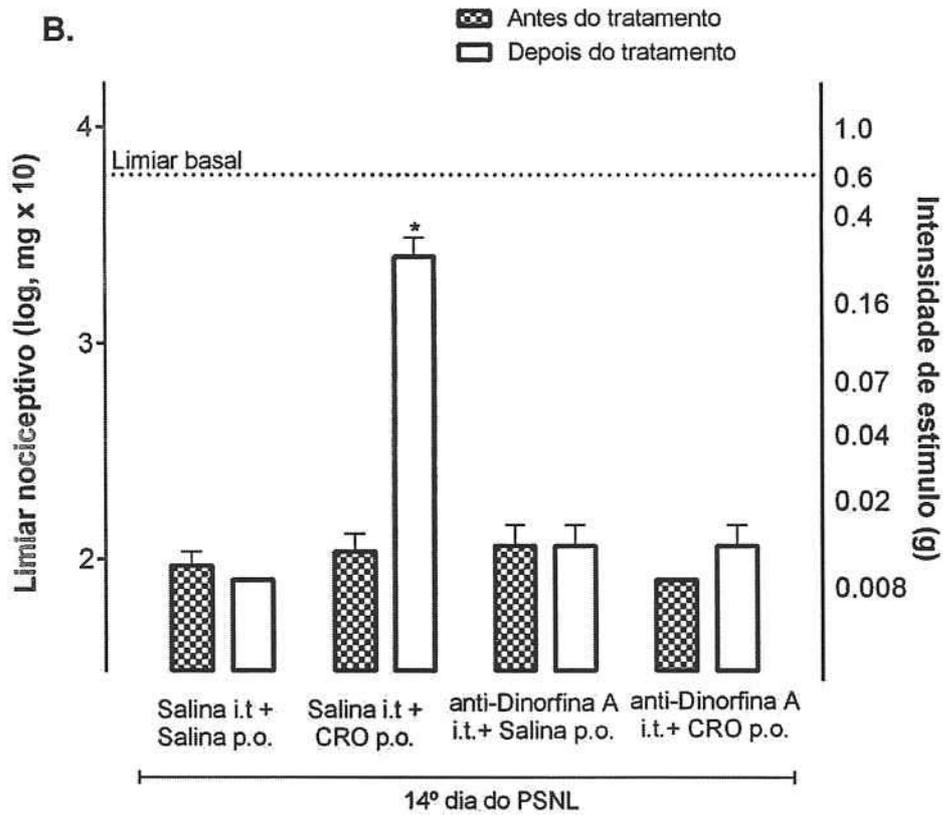
Considerando estudos preliminares que indicam que a crotalfina não ativa diretamente os receptores opióides ou canabinóides, uma vez que o peptídeo não é capaz de deslocar a naloxona marcada ($^{[3H]}$ naloxona) ou mesmo o agonista marcados não-seletivo de receptores CB_1 e CB_2 ($^{[3H]}$ CP55,490) em estudos de “binding” (dados não publicados), investigamos se o efeito em receptores opioides e canabinoides ocorreria de maneira indireta, pela liberação de opióides endógenos ou endocanabinoides.

4.4.1 Avaliação da participação de opioides endógenos no efeito da crotalfina

Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a cirurgia foi administrado por via intratecal anticorpos específicos para cada opioide endógeno, sendo eles anticorpo anti- Met-Encefalina (figura 8A), anticorpo anti- β -endorfina (figura 8B) e anticorpo anti- Dinorfina-A (figura 8C) e 30 minutos após os animais foram tratados com crotalfina por via oral. Os animais foram avaliados 1 hora após a administração da crotalfina. Os resultados demonstram que o efeito analgésico da crotalfina é dependente de opioides endógenos (Met-Encefalina, β -endorfina e Dinorfina-A) uma vez que todos os anticorpos revertem o efeito da crotalfina (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação do envolvimento de opioides endógenos





Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a indução da neuropatia foi administrado anticorpos específicos para cada opióide endógeno, anticorpo anti- Met-Encefalina na dose de 20 µg (A), anticorpo anti-β-endorfina na dose de 10 µg (B) e anticorpo anti- Dinorfina-A na dose de 10 µg (C) e 30 minutos após os animais foram tratados com crotalina 100 µg/kg/200 µL por via oral e uma hora depois da administração da crotalina o limiar nociceptivo foi avaliado utilizando

os filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM). $n= 6$. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo PSNL + Salina i.t. + Salina p.o. e PSNL + Anticorpos + Salina i.t.. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Sidak.

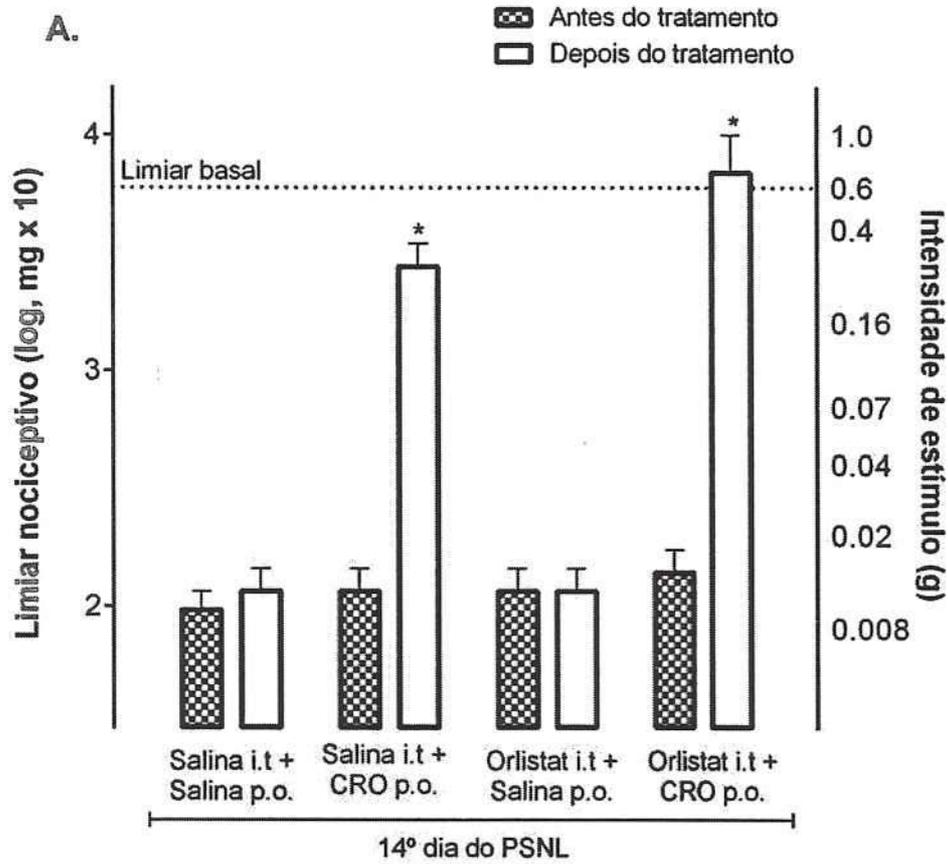
4.4.2 Avaliação da participação de endocanabinóides centrais no efeito da crotalfina

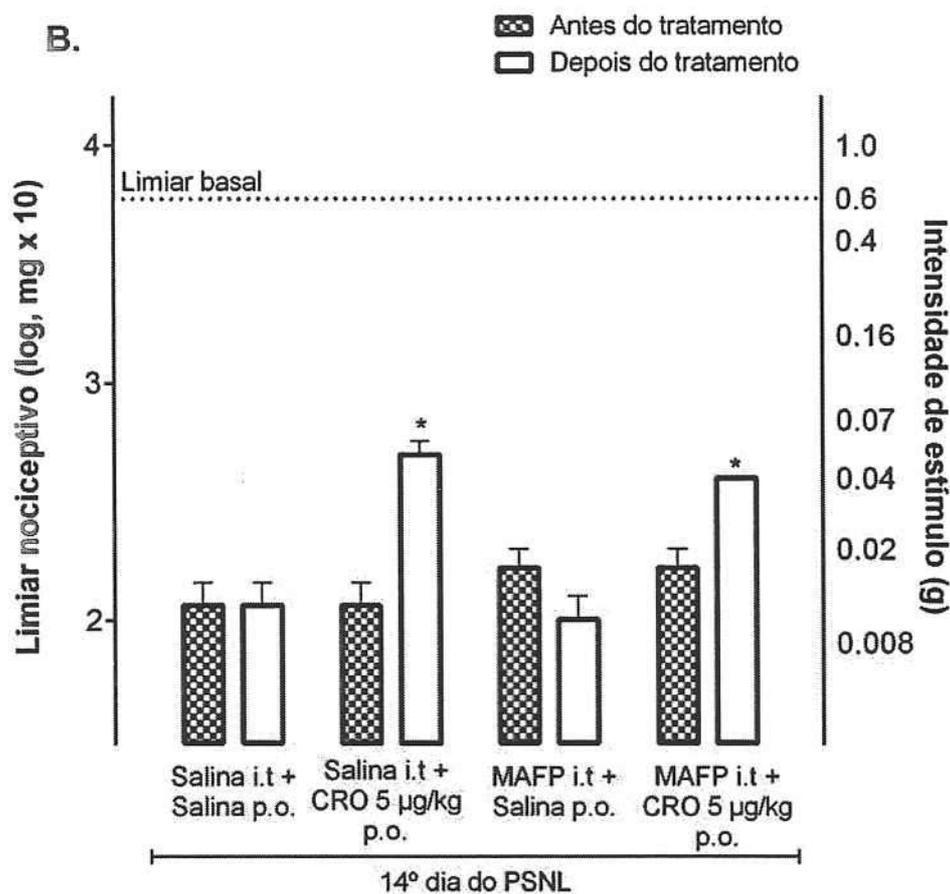
A participação de endocanabinóides no efeito da crotalfina foi avaliada utilizando o Orlistat, um inibidor do 2-aracdonoilglicerol (precursor dos endocanabinóides, produzido a partir da hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana) (ORTAR et al., 2008), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de interferir com a analgesia induzida pela crotalfina, e o MAFP (metil araquidonil fluorofosfonado), um inibidor da hidrolase amida de ácidos graxos (enzima que hidrolisa os endocanabinóides) (DEUTSCH et al., 1997), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de potencializar a antinocicepção induzida pela crotalfina.

Para isso, os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL e no 14º dia após a cirurgia foi administrado por via intratecal o Orlistat 30 minutos antes da crotalfina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/200 \mu\text{L}$ (figura 9A) ou MAFP 10 minutos antes da crotalfina 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/200 \mu\text{L}$ (figura 9B).

Os resultados obtidos demonstraram que o Orlistat não interfere com o efeito analgésico da crotalfina, bem como o MAFP não foi capaz de potencializar este efeito, sugerindo que os canabinóides endógenos não estão envolvidos na ação central da crotalfina (Figura 9).

Figura 9 - Envolvimento de endocanabinoides no efeito antinociceptivo da crotalfina





Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos à cirurgia de PSNL e no 14º dia após a indução da neuropatia foi administrado Orlistat (A) ou MAFP (B) em seguida os animais foram tratados com crotalfina por via oral e uma hora depois da administração da crotalfina o limiar nociceptivo foi avaliado utilizando os filamentos de von Frey. Os resultados são expressos pela média de (\pm EPM). $n = 6$. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos PSNL + Salina i.t. + Salina p.o. e PSNL + Orlistat/MAFP + Salina i.t. antes e depois do tratamento. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (A) ou Sidak (B).

4.5 Investigação da participação de células glias no efeito analgésico da crotalfina

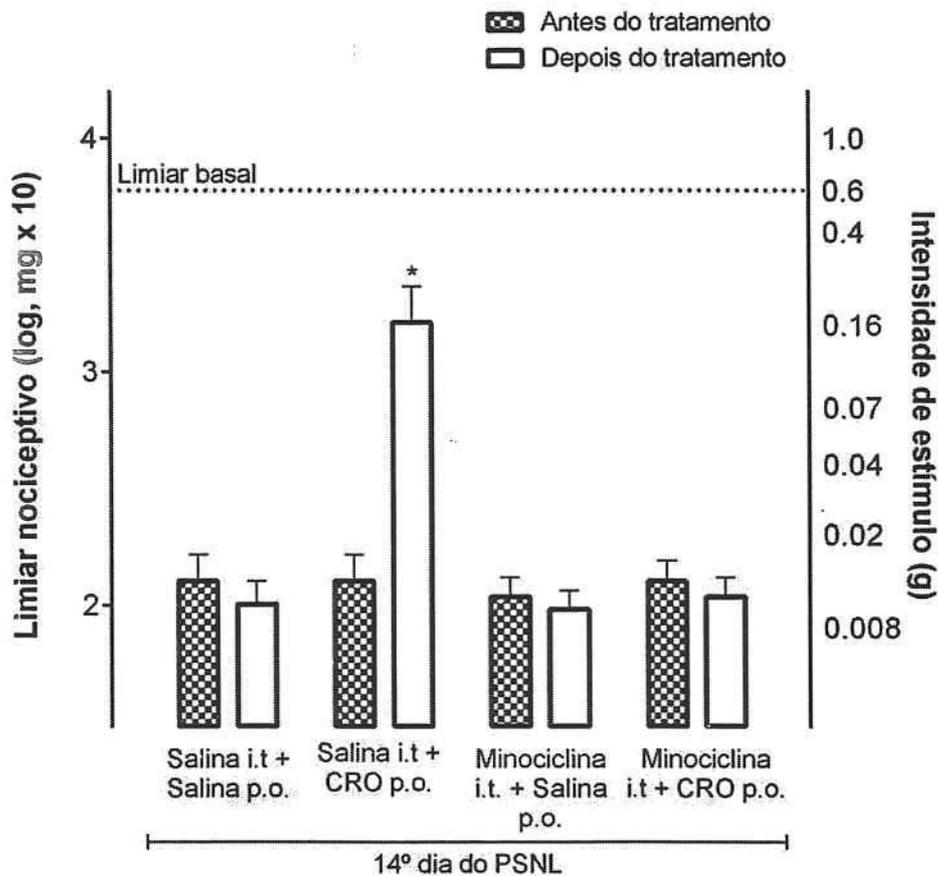
Considerando que a crotalfina é capaz de modular a função de macrófagos residentes e inflamatórios, o que pode contribuir para ação analgésica do peptídeo (dados não publicados) e que as micróglia são macrófagos residentes do SNC (SALTER; STEVENS, 2017), nosso próximo passo foi verificar a participação dessas células na analgesia induzida pela crotalfina.

Para tanto os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL e no 14º dia após a cirurgia foi administrado a minociclina, uma tetraciclina de segunda geração semi-sintética, que atua como um potente inibidor da ativação e proliferação da micróglia

(KOBAYASHI et al., 2013) por via intratecal 30 minutos antes da crotalfina 100 µg/kg/200 µL.

Os resultados obtidos demonstraram que minociclina foi capaz de reverter a analgesia induzida pela crotalfina, confirmando a participação da micróglia neste efeito analgésico (figura 10).

Figura 10 - Envolvimento das micróglia no efeito analgésico da crotalfina



Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL e no 14º dia foram tratados com a minociclina i.t. e/ou crotalfina p.o., o limiar nociceptivo foi avaliado utilizando os filamentos de von Frey. Os resultados representam a média do grupo (\pm EPM), $n = 5-6$. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos PSNL + Salina i.t. + Salina p.o., PSNL + Minociclina i.t. + PSNL + Minociclina i.t. + Crotalfina p.o.. Foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido pelo teste de Sidak.

4.6 Avaliação da crotalina na expressão de células gliais na medula espinal de animais com neuropatia

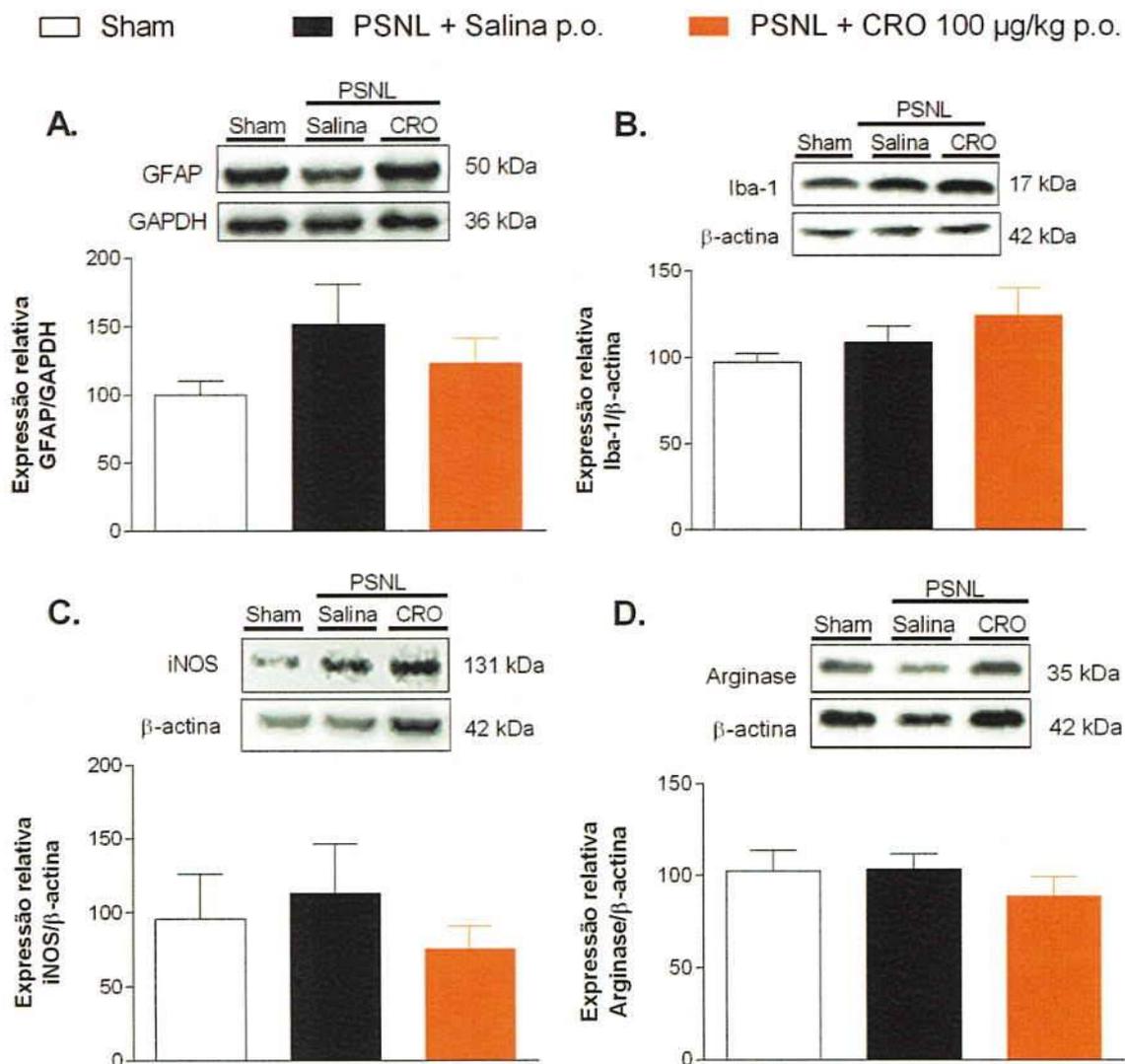
Após lesão parcial do nervo periférico, ocorrem numerosas alterações na expressão proteica de mediadores medula espinal. Além disso, demonstramos que a micróglia está envolvida no efeito analgésico da crotalina.

Nesse sentido, nosso próximo passo foi verificar o efeito da crotalina em células gliais e em alguns marcadores centrais envolvidos no desencadeamento ou no controle de condição inflamatória. Para isso, os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL, no 14º foram tratados com a crotalina 100 µg/kg/200 µL, uma hora depois foram avaliados e em seguida o corno dorsal ipsilateral da medula espinal foi coletado. Para avaliação de astrócitos foi utilizado marcador de filamento intermediário, o GFAP (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*) (figura 11A); para avaliação de micróglia foi utilizado Iba-1 (do inglês, *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) um marcador de membrana (figura 11B).

Ainda na medula espinal buscamos avaliar a expressão de iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*) uma enzima encontrada em micróglia polarizada para o fenótipo M1 e que está intimamente relacionada a um quadro neuroinflamatório (figura 11C) e a expressão de arginase-1 (Arg-1) (figura 11D), uma enzima associada a micróglia polarizada para o fenótipo M2, que está associada a uma resposta anti-inflamatória (XU et al., 2016). É importante ressaltar que como não utilizamos múltiplos marcadores de micróglia polarizadas nossos resultados são apenas sugestivos.

Os dados obtidos apesar de demonstrarem uma tendência de ação da crotalina nestes marcadores com a metodologia empregada não foram estatisticamente significativos independente do marcador utilizado (figuras 11A, 11B, 11C e 11D).

Figura 11 - Envolvimento de células glias no efeito analgésico da crotalina



Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL, no 14º dia foram tratados com a crotalina p.o., em seguida o limiar nociceptivo foi avaliado utilizando os filamentos de von Frey e por fim os animais foram sacrificados e o corno dorsal ipsilateral (A, B, C e D). Depois de coletados os tecidos foram processado e o sobrenadante obtido foi utilizado no ensaio. Os resultados representam a média do grupo (\pm EPM). $n=8-10$. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

4.7 Quantificação de citocinas da medula espinal de animais com neuropatia após o tratamento com a crotalina

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que após a indução do modelo de PSNL, várias citocinas são liberadas em diversos locais incluindo a medula espinal (GAMA et al., 2018; MIRANDA et al., 2016, 2018a), e além disso,

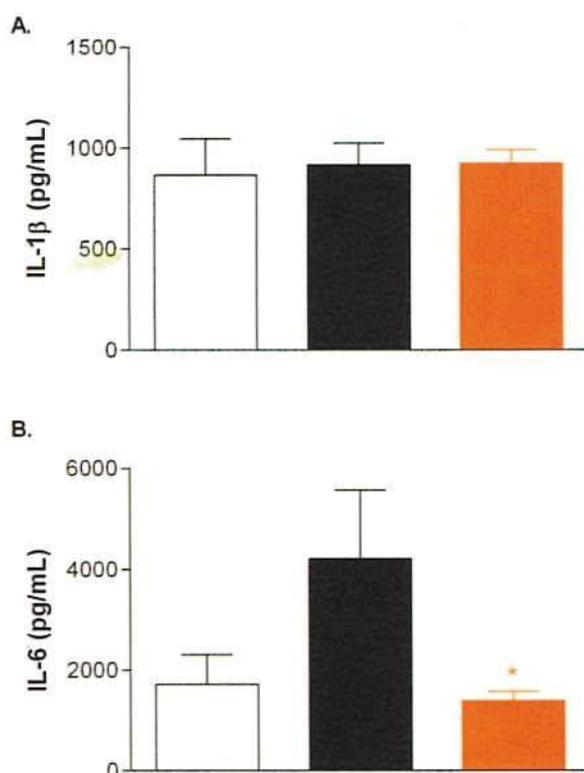
estudos anteriores demonstraram que a crotalina é capaz de modular diversas funções de macrófagos de acordo com o estado de ativação.

Considerando essas informações, buscamos avaliar se a crotalina poderia interferir com liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-6. Para isso, animais com neuropatia (14^o dia após o PSNL) foram tratados com a crotalina, uma hora após o tratamento foram avaliados e em seguida a medula espinal ipsilateral foi coletada.

Nossos dados não identificaram alteração nos níveis de IL-1 β (figura 12A), por outro lado, uma hora após o tratamento, a crotalina foi capaz de diminuir a liberação de IL-6 (figura 12B), sugerindo mais uma vez, que este peptídeo de alguma forma atua sobre células imunes.

Figura 12 - Quantificação de citocinas na medula espinal de camundongos

□ Sham ■ PSNL + Salina p.o. ■ PSNL + CRO 100 μ g/kg p.o.



Fonte: próprio autor.

Os animais foram submetidos a cirurgia de PSNL, no 14^o dia foram tratados com a crotalina p.o., em seguida o limiar nociceptivo foi avaliado utilizando os filamentos de von Frey e por fim os animais foram sacrificados e a medula espinal foi coletada. Depois de coletado o tecido foi processado e o sobrenadante obtido foi utilizado no ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados representam a média do grupo (\pm EPM). n=5-6. * p < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Sham e PSNL + Salina p.o. Foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey

5 DISCUSSÃO

Dados sugerem que 20% da população adulta sofra de algum tipo de dor e 10% são recém-diagnosticados com dor crônica a cada ano (GOLDBERG; MCGEE, 2011). Em relação à dor neuropática, esta é causada por doença ou lesão que afeta o sistema nervoso e inclui várias condições crônicas capazes de gerar atividade ectópica dos nervos nociceptivos, sensibilização periférica e central, modulação inibidora prejudicada e ativação patológica de células do SNC. Com relação aos tratamentos disponíveis, estes fornecem essencialmente alívio sintomático e podem incluir terapias não farmacológicas e farmacológicas de intervenção mais extensas. Entre os tratamentos atualmente utilizados recomendam-se os de primeira escolha que incluem antidepressivos (agentes tricíclicos e inibidores da recaptação da serotonina-norepinefrina) e anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina). Os fármacos opioides (morfina, oxicodona, tramadol e etc) são recomendados como terapias secundárias (MOULIN et al., 2014) devido não só a seus efeitos adversos severos bem como ao desenvolvimento de dependência e tolerância (NUCKOLS et al., 2014) após o seu uso prolongado. Esses fatos em conjunto demonstram que a busca por novos compostos analgésicos ainda é necessária.

Nesse sentido, foi sintetizado a partir da sequência de um composto analgésico encontrado no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, a crotalfina, um peptídeo de 14 aminoácidos com efeito analgésico potente e de longa duração (KONNO et al., 2008). Estudos realizados em nosso laboratório demonstram que a crotalfina induz analgesia de por até 5 dias em modelo de dor aguda e que este efeito é mediado periféricamente pela ativação de receptores *kappa* do tipo opioide (KONNO et al., 2008). Em modelo de dor neuropática induzido por constrição crônica do nervo isquiático, este efeito envolve ativação de receptores *kappa* e *delta* com duração de 2 a 3 dias (GUTIERREZ et al., 2012). Apesar da analgesia induzida pela crotalfina ser revertida por antagonistas opioides (naloxona, antagonista não-seletivo e Nor-BNI, antagonista de receptores *kappa*), este peptídeo não possui semelhança com nenhum outro opioide descrito na literatura.

Dados da literatura relatam uma interação entre os sistemas opioide e canabinoide (DESROCHES; BEAULIEU, 2010). Além disso, sabe-se que tanto os

receptores opióides quanto os canabinóides induzem analgesia por meio de mecanismos dependentes de proteína G, que bloqueiam a liberação de neurotransmissores nociceptivos no cérebro e na medula espinhal (ANAND et al., 2009; CICHEWICZ, 2004; WELCH, 2009). Os dois sistemas atuam em locais comuns, sendo que seus receptores estão co-distribuídos em áreas importantes para o controle da dor. Estes sistemas, ainda, parecem potencializar um ao outro, indicando uma interação sinérgica entre eles (CICHEWICZ, 2004; PAROLARO et al., 2010). Dados anteriores de nosso grupo evidenciaram a interação entre os sistemas opioide e canabinoide no efeito analgésico da crotalfina. Machado *et. al.* (MACHADO et al., 2014) demonstraram que periféricamente, o efeito da crotalfina é decorrente de sua ação (direta ou indireta) sobre receptores CB₂ periféricos do tecido plantar, que, uma vez ativados, acarretam a liberação de dinorfina A, agonista endógeno de receptores opióides do tipo *kappa*. Assim, em continuidade à elucidação do mecanismo de ação da crotalfina, este projeto tem como objetivo avaliar a mediação do seu efeito central, bem como a contribuição do possível efeito anti-inflamatório da crotalfina para a analgesia observada.

Para tanto foi utilizado o modelo de ligação parcial do nervo isquiático (PSNL). O modelo de neuropatia induzido pela lesão parcial do nervo isquiático foi descrito por Selzer em 1990, e consiste na ligadura de aproximadamente 1/3 a 1/2 do nervo isquiático. O modelo do PSNL tem sido descrito como um dos modelos animais que melhor reproduz a interface neuroimune observada na dor neuropática em humanos (GRACE et al., 2014).

Uma vez que o efeito da crotalfina não havia sido ainda demonstrado neste modelo, investigamos sua efetividade frente à hipernocicepção mecânica induzida pelo PSNL. Os resultados demonstram que quando administrada sistemicamente a crotalfina induz analgesia parcial, observada por até 3 dias na fase aguda, e também na fase crônica, porém nesta fase, a reversão parcial é observada por até 24 horas após a administração. Estes resultados diferem do observado anteriormente pelo nosso grupo em modelo de constrição crônica do isquiático (CCI), onde a crotalfina reverte a dor na fase crônica por até 3 dias (GUTIERREZ et al., 2008). Essa diferença na duração do efeito pode ser decorrente do modelo utilizado, uma vez que a literatura descreve muitas diferenças na interface neuroimune entre os modelos de PSNL e CCI, tais quais o perfil e o tempo de ativação celular, a liberação

de citocinas e quimiocinas nos diferentes tecidos (nervo isquiático, DRG e medula espinal) e ativação de quinases (RISTOIU, 2013).

Como dito anteriormente, estudos anteriores demonstraram que periféricamente o efeito da crotalina envolve receptores opioides do tipo *kappa* e receptores canabinóides do tipo CB₂ (MACHADO et al., 2014). Estudos também demonstram que a ação periférica da crotalina em receptores opioides difere em modelos de dor aguda e crônica, ou seja, enquanto em modelo de dor aguda só há participação de receptores opioides periféricos do tipo *kappa*, em modelos de dor crônica observa-se a participação de receptores opioides *kappa* e *delta*. Assim, a fim de investigar o possível efeito central da crotalina ainda não comprovado, e o mecanismo envolvido neste efeito, investigamos inicialmente o envolvimento dos receptores opioides e canabinóides utilizando antagonistas seletivos para estes receptores por via intratecal. Os resultados obtidos demonstraram que quando administrados centralmente os antagonistas de receptor canabinóides do tipo CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630) e de receptores opioides *mu* (CTOP), *kappa* (Nor-BNI) e *delta* (Naltrindol) bloqueiam completamente o efeito analgésico da crotalina demonstrando desta forma que este efeito é dependente da ativação desses receptores.

Receptores opioides são receptores acoplados a proteína G que estão amplamente distribuídos em regiões do sistema nervoso central e periférico, além da pele e do trato gastrointestinal (MOLEM, 1976a). No SNC, são encontrados em regiões como tálamo, córtex cerebral, substância cinzenta periaquedutal (PAG), amígdala, núcleo acumbens, hipotálamo, gânglios da base, substância nigra e formação reticular, além de serem encontrados na medula espinhal (MOLEM, 1976b; R.; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001; VANDERAH, 2007; YAKSH, 1999). Com relação à distribuição de receptores canabinóides sabe-se que receptores CB₁ são encontrados em grande quantidade no hipocampo, córtex, cerebelo e gânglios da base e a principal função fisiológica é a modulação da neurotransmissão. Estão também localizados na periferia, com expressão no gânglio da raiz dorsal, feixes de fibras nervosas mielinizadas na pele, macrófagos, mastócitos, sistema gastrointestinal (predominantemente nos neurônios colinérgicos), baço, tonsilas, leucócitos, músculo esquelético e células renais (SPIGELMAN, 2010). Em contraste, CB₂ é predominantemente expresso em células

imunes, particularmente no baço, timo e células imunes circulantes (GALGGLJE et al., 1995). Nas células do sistema imunológico, regula principalmente resposta imune e inflamação. Além disso, também é expresso em sistemas esqueléticos, cardiovasculares e renais. Os receptores CB₂ estão localizados, mas em menor quantidade no SNC, principalmente nos corpos celulares e dendritos dos neurônios centrais (GONG et al., 2006).

Sabe-se que os sistemas opioide e canabinoide compartilham muitas características comuns quando ativados incluindo antinocicepção, hipotermia, sedação, hipotensão, inibição da motilidade intestinal e depressão motora, sugerindo uma distribuição e mecanismo de ação semelhantes. Além disso, esses dois tipos de receptores são encontrados em regiões do cérebro que sabidamente modulam o processo antinociceptivo. Estudos mostraram a co-localização de receptores opiodes *mu* e CB₁ nos mesmos neurônios dentro do corno dorsal superficial da medula espinhal, onde é realizado o primeiro contato sináptico de neuronios aferentes primários periféricos, aumentando a possibilidade de interações diretas entre esses tipos de receptores dentro da mesma célula (RIOS; GOMES; DEVI, 2006). Com relação à transdução de sinal os receptores opioides e canabinoides são encontrados em terminais pré-sinápticos e possuem atuação semelhante. Esses dados levantam a intrigante possibilidade de que esses dois receptores podem atuar de maneira sinérgica dentro da mesma célula ou circuito neuronal para induzir analgesia e que a modulação de um receptor possa levar a alterações na atividade do outro (BUSHLIN; ROZENFELD; DEVI, 2010).

Dados da literatura demonstram que receptores acoplados à proteína G (GPCRs) existem como complexos diméricos ou oligoméricos. Além de homodímeros, heterodímeros entre membros da família GPCR (próximos ou distantes) foram relatados. Em alguns casos, a heterodimerização é necessária para a ligação e sinalização agonista eficiente e, em outros, parece conduzir à geração de novos locais de ligação (DEVI, 2001). Além disso, Berrendero e colaboradores demonstraram que animais *knockout* para receptores *mu* e *kappa* possuem alterações nos níveis de receptores canabinoides e na atividade funcional em estruturas cerebrais específicas (BERRENDERO et al., 2003).

Sabe-se que a ativação de receptores tanto opioides quanto canabinoides pode ocorrer tanto através de ligantes exógenos quanto endógenos (BURSTON;

WOODHAMS, 2014; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2005). Ainda, é conhecido que periféricamente o mecanismo de ação da crotalfina envolve a liberação de opioides endógenos, particularmente dinorfina A, que é o agonista endógeno de receptores *kappa* (MACHADO et al., 2014). Desta forma, a contribuição de peptídeos opioides endógenos e endocanabinóides centrais para a antinocicepção induzida pela crotalfina foi investigada. Os resultados demonstram que este efeito é dependente da liberação não só de dinorfina A mas também de β -endorfina e met-enkefalina, confirmando uma mediação central diferente da mediação periférica previamente descrita (MACHADO et al., 2014) e corroborando dados da literatura referentes ao efeito antinociceptivo central destes peptídeos (ROQUES; FOURNIÉ-ZALUSKI; WURM, 2012; TSENG; COLLINS, 1993).

Em relação ao estudo da participação de endocanabinóides, diversos compostos endógenos que se ligam seletivamente aos receptores canabinóides têm sido descritos, sendo os principais a anandamida (N-aracdonil-etanolamina, ligante preferencial de receptor CB₁) e o 2-aracdonilglicerol (2-AG ligante preferencial de receptor CB₂). Estas moléculas podem tanto modular diretamente a sinalização do receptor canabinóide, como também podem afetar outras proteínas, incluindo canais iônicos (ex: TRPV1), receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (ex: receptores para a serotonina) e enzimas (WOODHAMS et al., 2017a).

Tanto a anandamida quanto o 2-AG são hidrolisados por enzimas, principalmente a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a lipase monoacilglicerol (MAGL), respectivamente. Assim estudos tem focado nestas enzimas como possíveis alvos farmacológicos para modulação do sistema endocanabinoide. Uma vez que endocanabinóides são rapidamente inativados, tem sido demonstrado que inibidores destas enzimas de hidrólise poderiam ser usados para aumentar a atividade endocanabinóide (WOODHAMS et al., 2017b).

Neste estudo, a participação de endocanabinóides no efeito da crotalfina foi avaliada utilizando dois tratamentos farmacológicos: o Orlistat, um inibidor do diacilglicerol (precursor dos endocanabinóides, produzido a partir da hidrólise de fosfoinosítídeos de membrana), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de interferir com a antinocicepção induzida pela crotalfina, e o MAFP (metil araquidonil fluorofosfonado), um inibidor da hidrolase amida de ácidos graxos (enzima que hidrolisa os endocanabinóides), a fim de se verificar se este inibidor é capaz de

potencializar a antinocicepção induzida pela crotalfina. Os resultados obtidos demonstram que os canabinoides endógenos não estão envolvidos no efeito analgésico, uma vez que os tratamentos não interferiram com o efeito da crotalfina.

Sabe-se que peptídeos opioides atravessam a barreira hematoencefálica e que esse transporte pode ocorrer na direção do sangue para o cérebro ou na direção do cérebro para o sangue (GANAPATHY; MIYAUCHI, 2005). Além disso, são conhecidos alguns mecanismos de transferência entre eles como um sistema de transporte acoplado a sódio e cloro de alta afinidade para peptídeos opioides endógenos, que aceita uma variedade de opioides contendo 4 a 13 aminoácidos, no qual incluem encefalinas, dinorfinas, endorfinas e casomorfina e ainda diversos derivados da encefalina (HU et al., 2003). Desta forma, uma vez que a crotalfina foi administrada por via oral, a hipótese de que os opioides endógenos liberados periféricamente podem atuar em receptores no SNC e assim promover analgesia não pode ser descartada.

Dados da literatura demonstram que peptídeos opioides podem desempenhar um papel semelhante ao de citocinas por modularem a resposta imune por meio de uma interação com seus receptores nos sistemas neuro-humorais centrais e periféricos (LIANG et al., 2016).

Sabendo da relação direta dos opioides endógenos com as células, e que como dito anteriormente, a crotalfina é capaz de modular diversas funções de macrófagos peritoneais (VELHOTE, 2013) verificamos se os macrófagos residentes do SNC, as micróglia, poderiam estar envolvidos com o efeito analgésico. Os dados obtidos confirmam esta hipótese, uma vez que a minociclina inibe a antinocicepção induzida pela crotalfina.

Estudos têm demonstrado que as células gliais no sistema nervoso central, desempenham um papel importante na dor. As células da glia no SNC são representadas por três tipos celulares conhecidos como astrócito, oligodendrócito e micróglia (MOALEM; TRACEY, 2006). Sabe-se que a micróglia forma uma população de macrófagos residentes no SNC, constituindo cerca de 5-10% das células da glia. Estas células podem ser ativadas por diversos estímulos como por exemplo a inflamação, e depois de ativadas contribuem para o processamento da dor liberando várias moléculas de sinalização, incluindo citocinas pró-inflamatórias (VILHARDT, 2005).

Apesar do papel pró-nociceptivo bem estabelecido, as microglias ativadas são compostas de diferentes populações de células que possuem funções distintas e até mesmo opostas (WANG et al., 2017). Os dois extremos da polarização microglial são denominados fenótipos M1 e M2 (HERDER et al., 2015). A micróglia do tipo M1 promove inflamação por liberação de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (PRAJEETH et al., 2014). Em contraste, as células fenotípicas M2 demonstram propriedades neuroprotetoras por fagocitarem os detritos, promovendo a reparação tecidual e o término da neuroinflamação (STUMPO et al., 1999). As alterações fenotípicas da microglia ativada na medula espinhal, após lesão do nervo periférico, não são bem caracterizadas e ainda menos se sabe sobre as alterações microgliais que acompanham o desenvolvimento da dor neuropática.

Por outro lado, os astrócitos representam a maior população celular no SNC. Eles interagem com os neurônios para auxiliar na manutenção da homeostase. A contribuição relativa da microglia e astrócitos para dor neuropática ainda está sob investigação. No entanto, estudos recentes sugerem que a microglia tem um papel predominante na instalação, enquanto os astrócitos são mais importante para a manutenção da dor neuropática.

Corroborando esse efeito sobre o controle da resposta inflamatória, Fan e colaboradores (FAN et al., 2015) demonstraram que 2 peptídeos *glucagon-like* exercem efeito anti-hiperalgésico e anti-alodínico em modelo de dor neuropática de origem tumoral ou diabética por liberação de beta-endorfina tanto *in vivo*, na medula espinal, quanto em cultura de micróglia. Ainda, esse efeito analgésico foi inibido por inibidor microglial, por antagonista de receptor um opioides e por anticorpo anti-beta endorfina. Assim, os dados presentemente obtidos sugerem que a ação analgésica da crotalfina envolva ativação de células da glia, possivelmente liberando mediadores analgésicos endógenos.

Apesar dos resultados demonstrando envolvimento da micróglia no efeito da crotalfina, os animais com neuropatia não apresentaram aumento destas células e nem de astrócito na medula espinal, contradizendo o que a literatura relata, bem como não foi observado qualquer alteração na proliferação/ativação dessas células em animais tratados com a crotalfina. Da mesma maneira, não foi observada alteração na expressão de iNOS e Arginase tanto induzida pelo modelo quanto pela

crotalina. Vale ressaltar que como não foram utilizados múltiplos marcadores nossos dados são apenas sugestivos acerca da micróglia do tipo M1 e M2.

Como dito anteriormente, processos de dor crônica levam à ativação de diferentes células que liberam diversos mediadores, como citocinas pró-inflamatória, inclusive no SNC (GAMA et al., 2018; MIRANDA et al., 2016, 2018b). Assim, quantificamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 na medula espinal de animais com neuropatia. Nossos resultados demonstram que, apesar de não interferir com os níveis de IL-1 β , a crotalina inibe a liberação de IL-6 induzida pelo modelo de PSNL, reforçando o efeito da crotalina sobre a resposta neuroimune.

Embora nossos resultados não tenham reproduzido dados de literatura nos ensaios de *Western Blotting* e ELISA, não podemos descartar ainda o envolvimento destes mediadores. Técnicas mais apuradas poderiam gerar resultados distintos dos obtidos presentemente.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos dados tornaram evidente que o mecanismo de ação do efeito analgésico central e periférico da crotalina são diferentes, quanto a participação de receptores opioide e canabinoide e de opioides endógenos. Nossos resultados sugerem ainda que centralmente este efeito é dependente da participação da micróglia.

.

REFERÊNCIAS¹

- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1040, n. 2, p. 217–224, 1990.
- ANAND, P. et al. Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 255–266, 2009.
- BENARROCH, E. E. Endogenous opioid systems: Current concepts and clinical correlations. **Neurology**, v. 79, n. 8, p. 807–814, 2012.
- BERRENDERO, F. et al. Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [35S]-GTPgammaS binding in the brain of mu-, delta- and kappa-opioid receptor knockout mice. **The European journal of neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 2197–202, out. 2003.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610–5, maio 1999.
- BODNAR, R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2003. **Peptides**, v. 25, n. 12, p. 2205–2256, 2004.
- BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- BONFÁ, L.; VINAGRE, R. C. D. O.; FIGUEIREDO, N. V. DE. Uso de canabinóides na dor crônica e em cuidados paliativos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 3, p. 267–279, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattle snake venom. **Taiwan yi xue hui za zhi.**, v. 71, n. 6, p. 1972, 1972.
- BRAZIL, V. Do emprego da peçonha em terapêutica. **São Paulo**, p. 58, 1934.
- BRIGATTE, P.; HOFFMANN, F.; BERNARDI, M. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon**, v. 39, p. 1399–1410, 2001.
- BURSTON, J. J.; WOODHAMS, S. G. Endocannabinoid system and pain: an introduction. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 1, p. 106–17, fev. 2014.

¹ Associação Brasileira de Normas Técnicas

BUSHLIN, I.; ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Cannabinoid–opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 80–86, fev. 2010.

CARTER, G. T. et al. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Physical medicine and rehabilitation clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 457–70, maio 2014.

CHILDERS, S. R. et al. Opioid and Cannabinoid Receptor Inhibition of Adenylyl Cyclase in Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 654, n. 1 The Neurobiol, p. 33–51, 2006.

CICHEWICZ, D. L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life sciences**, v. 74, n. 11, p. 1317–24, 30 jan. 2004.

CURTO-REYES, V. et al. Antinociceptive effects induced through the stimulation of spinal cannabinoid type 2 receptors in chronically inflamed mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1–2, p. 184–189, 2011.

DESROCHES, J.; BEAULIEU, P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. **Current drug targets**, v. 11, n. 4, p. 462–73, 2010.

DEUTSCH, D. G. et al. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. **Biochemical pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 255–60, 7 fev. 1997.

DEVI, L. A. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 10, p. 532–537, out. 2001.

DEWEY, W. L.; PODDAR, M. K.; JOHNSON, K. M. The effects of cannabinoids on rat brain synaptosomes. **Advances in the biosciences**, v. 22–23, n. 98, p. 343–349, 1978.

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacological reviews**, v. 48, n. 4, p. 567–92, 1996.

EMER, A. A. et al. The role of the endocannabinoid system in the antihyperalgesic effect of Cedrus atlantica essential oil inhalation in a mouse model of postoperative pain. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, n. 210, p. 477–484, 10 jan. 2018.

FAN, H. et al. The non-peptide GLP-1 receptor agonist WB4-24 blocks inflammatory nociception by stimulating β -endorphin release from spinal microglia. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 64–79, 2015.

FAURE, G. et al. Multiplicity of Acidic Subunit Isoforms of Crotoxin, the Phospholipase A2 Neurotoxin from Crotalus durissus terrificus Venom, Results from Posttranslational Modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074–8083, 1991.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling

neural cell survival? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 39–45, 2007.

GALGGLJE, S. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Biochemistry**, v. 61, p. 54–61, 1995.

GALIÈGUE, S. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **European journal of biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 54–61, 15 ago. 1995.

GAMA, K. B. et al. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. **Stem cells international**, v. 2018, p. 8179013, 2018.

GANAPATHY, V.; MIYAUCHI, S. Transport systems for opioid peptides in mammalian tissues. **The AAPS Journal**, v. 7, n. 4, p. E852–E856, 2005.

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

GOLDBERG, D. S.; MCGEE, S. J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, p. 770, 2011.

GONG, J. P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10–23, 2006.

GOSELIN, R. et al. Glial cells and chronic pain. **The Neuroscientist**, v. 16, n. 5, p. 519–531, 2010.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–31, 28 abr. 2014.

GREGG, L. C. et al. Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- α initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9457–68, 11 jul. 2012.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1–3, p. 84–92, 2008.

GUTIERREZ, V. P. et al. The peripheral L-arginine–nitric oxide–cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 14–24, 2012.

HERDER, V. et al. Dynamic Changes of Microglia/Macrophage M1 and M2 Polarization in Theiler's Murine Encephalomyelitis. **Brain Pathology**, v. 25, n. 6, p.

712–723, 2015.

HERKENHAM, LYNN, LITTLE, JOHNSON, MELVIN, DE COSTA, R. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the national Academy of sciences**, v. 87, n. 5, p. 1932–1936, 1990.

HOWLETT, A. C. et al. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 1, p. 345–58, 2004.

HU, H. et al. Identification of a novel Na⁺- and Cl⁻-coupled transport system for endogenous opioid peptides in retinal pigment epithelium and induction of the transport system by HIV-1 Tat. **Biochem.J**, v. 375, p. 17–22, 2003.

IBRAHIM, M. M. et al. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 3093–3098, 2005.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1–28, 2011.

JENSEN, K. B. et al. Increased sensitivity to thermal pain following a single opiate dose is influenced by the COMT val(158)met polymorphism. **PLoS one**, v. 4, n. 6, p. e6016, 23 jun. 2009.

KATONA, I. et al. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 797–804, 2000.

KOBAYASHI, K. et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 3, p. e525-9, 2013.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293–1304, 2008.

LAW, P. Y.; LOH, H. H. Opioid Receptors. **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**, v. 5, n. 1, p. 354–358, 2013.

LESNIAK, A.; LIPKOWSKI, A. W. Opioid peptides in peripheral pain control. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 71, n. 1, p. 129–38, 2011.

LIANG, X. et al. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. **Translational perioperative and pain medicine**, v. 1, n. 1, p. 5–13, 2016.

LUCAS, K. K. et al. Spinal phospholipase A 2 in inflammatory hyperalgesia : role of Group IVA cPLA 2. p. 940–952, 2005.

MACHADO, F. C. et al. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 4, p. 961–972, 2014.

MACKIE, K. Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 10–14, 2008.

MALMBERG, A B.; BASBAUM, A I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, n. 1–2, p. 215–22, maio 1998.

MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. Cannabinoid transmission and pain perception. **Neurobiology of disease**, v. 5, n. 6, p. 447–461, 1998.

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

MILLER, A. M.; STELLA, N. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 299–308, 2008.

MIRANDA, H. F. et al. Antinociceptive Interaction of Tramadol with Gabapentin in Experimental Mononeuropathic Pain. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 119, n. 2, p. 210–214, 2016.

MIRANDA, H. F. et al. Antinociception induced by rosuvastatin in murine neuropathic pain. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 503–508, 2018a.

MIRANDA, H. F. et al. Antinociception induced by rosuvastatin in murine neuropathic pain. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 503–508, 2018b.

MIZOGUCHI, H. et al. Peptides Involvement of multiple μ -opioid receptor subtypes on the presynaptic or postsynaptic inhibition of spinal pain transmission. **Peptides**, v. 51, p. 15–25, 2014.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain research reviews**, v. 51, n. 2, p. 240–64, ago. 2006.

MOLEM, M. A. Chapter 1 Historical review. In: **Journal of Chromatography Library**. [s.l: s.n.]. v. 6p. 1–4.

MOLEM, M. A. Chapter 1 Historical review. In: **Journal of Chromatography Library**. [s.l: s.n.]. v. 6p. 1–4.

MOULIN, D. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. **Pain research & management**, v. 19, n. 6, p. 328–35, 2014.

NINKOVIĆ, J.; ROY, S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, p. 9–24, 15 jul. 2013.

NUCKOLS, T. K. et al. Opioid prescribing: a systematic review and critical appraisal of guidelines for chronic pain. **Ann Intern Med**, v. 160, n. 1, p. 38–47, 2014.

OCHI, T.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. Blockade of the antinociceptive effect of spinally

administered kyotorphin by naltrindole in mice. v. 322, p. 95–98, 2002.

ORTAR, G. et al. Tetrahydrolipstatin analogues as modulators of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol metabolism. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6970–6979, 2008.

PAROLARO, D. et al. Cellular mechanisms underlying the interaction between cannabinoid and opioid system. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 393–405, 2010.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 5, p. 569–611, 2001.

PICOLO, G. et al. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 223–227, 1998.

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

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

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

PRAJEETH, C. K. et al. Effector molecules released by Th1 but not Th17 cells drive an M1 response in microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p. 248–259, 2014.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in neuropathic pain. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 23, p. 3013–3025, 2005.

R., P.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1–3, p. 79–91, 2001.

RIOS, C.; GOMES, I.; DEVI, L. A. mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 387–95, 2006.

RISTOIU, V. Contribution of macrophages to peripheral neuropathic pain pathogenesis. **Life Sciences**, v. 93, n. 23, p. 870–881, 2013.

ROECKEL, L.-A. et al. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 338, p. 160–182, 3 dez. 2016.

ROM, S.; PERSIDSKY, Y. Cannabinoid Receptor 2: Potential Role in Immunomodulation and Neuroinflammation. **Journal of Neuroimmune**

Pharmacology, v. 8, n. 3, p. 608–620, 8 jun. 2013.

ROQUES, B. P.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; WURM, M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 4, p. 292–310, 2012.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease. **Nature Publishing Group**, v. 23, n. 9, p. 1018–1027, 2017.

SANT' ANNA, M. B. et al. Medial plantar nerve ligation as a novel model of neuropathic pain in mice : pharmacological and molecular characterization. **Nature Publishing Group**, n. October 2015, p. 1–13, 2016.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361–8, nov. 2007.

SELZER, Z.; DUDNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205–218, 1990.

SERTÜRNER, F. W.; SCHMITZ, R.; ADAM, W. and the Discovery of Morphine *. v. 27, n. 2, p. 61–74, 2016.

SMITH, P. B.; WELCH, S. P.; MARTIN, B. R. Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 268, n. 3, p. 1381–7, 1994.

SPIGELMAN, I. 05. Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain States. **Translational Pain Research: From Mouse to Man.**, p. 1–28, 2010.

STEIN, C.; KÜCHLER, S. Targeting inflammation and wound healing by opioids. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 303–312, jun. 2013.

STUMPO, R. et al. Alternative activation of macrophage by IL-10. **Pathobiology**, v. 67, n. 5–6, p. 245–248, 1999.

TAL, M.; BENNETT, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**, v. 57, n. 3, p. 375–82, jun. 1994.

TORRANCE, N. et al. Medication and treatment use in primary care patients with chronic pain of predominantly neuropathic origin. **Family practice**, v. 24, n. 5, p. 481–5, out. 2007.

TSENG, L. F.; COLLINS, K. A. Spinal involvement of both dynorphin A and Met-enkephalin in the antinociception induced by intracerebroventricularly administered bremazocine but not morphine in the mouse. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 266, n. 3, p. 1430–8, 1993.

- VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 1, p. 1–12, 2007.
- VELHOTE, F. B. Caracterização da ação da Crotalina sobre a função de macrófagos peritoneais de ratos. **Tese (Doutorado em Ciências)**, p. 118 f., 2013.
- VILHARDT, F. Microglia: Phagocyte and glia cell. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 17–21, 2005.
- WANG, C. et al. Peptides C-terminal hydrazide modification changes the spinal antinociceptive profiles of endomorphins in mice. v. 99, n. April 2017, p. 128–133, 2018.
- WANG, Y. et al. Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis? **International Immunopharmacology**, v. 50, n. May, p. 345–352, 2017.
- WELCH, S. P. Interaction of the cannabinoid and opioid systems in the modulation of nociception. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, v. 21, n. 2, p. 143–51, 11 abr. 2009.
- WELCH, S. P.; EADS, M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. **Brain Research**, v. 848, n. 1–2, p. 183–190, 1999.
- WÖLFL, M. et al. NIH Public Access. **Cytometry**, v. 73, n. 11, p. 1043–1049, 2009.
- WOODHAMS, S. G. et al. The cannabinoid system and pain. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 105–120, 2017a.
- WOODHAMS, S. G. et al. The cannabinoid system and pain. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 105–120, 2017b.
- XU, F. et al. Microglial polarization dynamics in dorsal spinal cord in the early stages following chronic sciatic nerve damage. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 6–13, 2016.
- XU, L.; ZHANG, Y.; HUANG, Y. Advances in the Treatment of Neuropathic Pain. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 904, n. 1, p. 117–29, 2016.
- YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: Development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 8, p. 329–337, 1999.
- YAM, M. et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2164, 24 jul. 2018.
- ZAMBELLI, V. O. et al. Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotaline in rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- ZHANG, J. et al. Tramadol differentially regulates M1 and M2 macrophages from

human umbilical cord blood. **Inflammopharmacology**, n. 218, 2017.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: A review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006.