

Luciana Cristina Nowacki

**OS POSSÍVEIS MEDIADORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE
DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO
VENENO BRUTO DE *Tityus serrulatus* (ESCORPIÃO-
AMARELO) EM PATAS DE RATO**

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis - SC

2000

“OS POSSÍVEIS MEDIADORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO BRUTO DE TITYUS SERRULATUS (ESCORPIÃO AMARELO) EM PATAS DE RATO”.

POR

LUCIANA CRISTINA NOWACKI

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



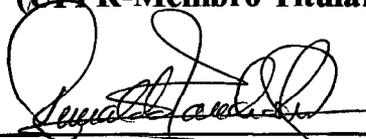
**Berenice Borges Lorenzetti
(UFPR-Orientadora credenciada
pela FMC/UFSC-Membro-Titular)**



**Carlos Rogério Tonussi
(FMC/UFSC -Membro Titular)**



**Aleksander Roberto Zampronio
(UFPR-Membro Titular)**



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis 19 de maio de 2000.

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Coordenadoria Especial de Farmacologia**

**OS POSSÍVEIS MEDIADORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE
DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO
VENENO BRUTO DE *Tityus serrulatus* (ESCORPIÃO-
AMARELO) EM PATAS DE RATO**

**Dissertação apresentada ao curso
de Pós - Graduação em
Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.**

**Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª Berenice
Borges Lorenzetti**

Luciana Cristina Nowacki

Florianópolis – SC

Maiο, 2000

Trabalho realizado no laboratório de Inflamação, Dor e Febre, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, com auxílio financeiro do CNPq, bolsa de aperfeiçoamento.

*"Um pedaço do futuro está no presente
que o passado deu para você"*

Djambi

"Aos meus pais Elio e Maura, por me ensinar a viver e principalmente pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões".

Dedico este trabalho

Agradecimentos

À Professora Dra. Berenice Borges Lorenzetti, pelos ensinamentos científicos, pela amizade, pelos conselhos, e principalmente pelo seu exemplo de garra e dedicação à pesquisa.

Ao Guilherme, que sempre esteve ao meu lado paciente, incentivando, nunca deixando o pessimismo me seduzir.

Aos amigos Juliano, Eunice, Márcia, Fábio e Marcos, companheiros dentro e fora da Farmacologia, minha “família de Floripa”.

Aos colegas da “Farmaco” Maria Fernanda, Cristina Setim, Giselle, Fabiane, Joice, Mani, Anderson e Frederica, pelo apoio nos meus momentos de fraqueza, confiantes do meu sucesso mesmo quando eu não acreditava que chegaria ao fim.

Às minhas eternas amigas Viviane, Luciana e Fabíola, sempre dispostas a me ajudar e a escutar meus choros.

À minha família, que sempre soube compreender minha ausência, principalmente aos meus manos André e Bruno, e à querida tia Natália.

Aos professores do departamentos de Farmacologia da UFSC, que compreenderam a dificuldade da distância, e me ensinaram a amar a Farmacologia. E os professores do departamento de Farmacologia da UFPR, que acreditaram na minha capacidade.

Ao Prof. Giles Rae, pela sua serenidade, e pelo exemplo de como ser um pesquisador íntegro e dedicado .

À Profa. Dra. Maria Lúcia, por confiar à mim, as turmas de Farmácia da Tuiuti/Pr. E aos colegas da Uniandrade, presentes com palavras de apoio e me socorrendo nas horas de aperto.

Agradeço principalmente aos meus queridos alunos, que acompanharam todas as etapas do meu mestrado, e me incentivaram, sempre com palavras de carinho e amizade.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Os Aspectos Biológicos e Morfológicos dos Escorpiões	1
1.2 Escorpionismo no Brasil	2
1.3 Aspectos Epidemiológicos	3
1.4 Acidentes com Escorpiões	8
1.5 O Veneno	9
1.6 Sinais e sintomas descritos em casos de acidentes com <i>Tityus serrulatus</i>	17
1.7 A Resposta Inflamatória	18
.....	
1.8 Dor Inflamatória	20
1.8.1 Fibras neuronais envolvidas na transmissão da dor	21
1.9 Mediadores químicos que participam na gênese da Dor Inflamatória	24
1.10 Controle da Hiperalgisia Inflamatória	31
1.10.1 Drogas que previnem a hiperalgisia	32
1.10.1.1 Antinflamatórios não esteroidais	32
1.10.1.2 Drogas simpatolíticas	33
1.10.1.3 Inibidores da síntese e liberação de citocinas	34
1.10.1.4 Antagonistas de receptores B2 da bradicinina	35
1.10.2 Drogas que revertem a hiperalgisia instalada	35
2. OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Animais	43

3.2 Drogas.....	43
3.3 Veneno.....	45
3.4 Método de Randall-Selitto modificado.....	45
3.5 Dosagem de citocinas em patas de ratos	49
3.6 Depleção de mastócitos em pata de ratos	49
3.7 Análise estatística	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	51
4.2 Participação de prostaglandinas na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	55
4.3 Participação de aminas simpatomiméticas na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	58
4.4 Efeito da associação de inibidores da síntese de prostaglandinas e de simpatolíticos na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	60
4.5 Participação de citocinas na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	62
4.6 Avaliação do efeito analgésico do HOE-140 sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	67
4.7 Efeito de analgésicos NO/GMPc dependente na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	69
4.7.1 Efeito da dipirona sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	69
4.7.2 Reversão do efeito analgésico da dipirona, sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i> , através da administração de LNMMA e Azul de metileno	71
4.7.3 Efeito do diclofenaco na hiperalgisia induzida pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	73

4.7.4	Reversão do efeito analgésico do diclofeneco, sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno de <i>Tityus serrulatus</i> , através da administração de LNMMA e Azul de metileno	75
4.7.5	Efeito do SNAP (S-nitroso-N-acetil-D, L-penicillamine) sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	77
4.8	Efeito do paracetamol sobre a hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	79
4.9	Investigação da participação de leucotrienos e histamina na hiperalgisia induzida pelo veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i>	81
4.10	Dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β em pata de ratos, através do método de Elisa	86
5.	DISCUSSÃO	88
6.	CONCLUSÃO	105
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8.	RESUMO	131
9.	ABSTRACT	136

Lista de abreviaturas

Lista de Abreviações

- μg** - micrograma
μl - microlitro
Aδ - fibra A delta
Aδ I – fibra A delta do tipo I
Aδ II – fibra A delta do tipo II
ACh - acetilcolina
ADP - adenosina difosfato
AINEs – anti-inflamatório não esteroidal
AMPc - adenosina monofosfato cíclico
AzM - azul de metileno
B1 - receptor do tipo 1 para bradicinina
B2 - receptor do tipo 2 para bradicinina
BK - bradicinina
CCSV - canais de cálcio sensíveis à voltagem
COX - ciclooxigenase
COX₁ - ciclooxigenase 1
COX₂ - ciclooxigenase 2
D₁- receptor dopaminérgico do tipo 1
DABK – agonista seletivo de receptor B1
DALBK- antagonista seletivo de receptor B1.
Db-AMPc - dibutilil AMPc
Dexa - dexametasona
EDRF - fator relaxante derivado de endotélio.
EPM - erro padrão da média
Fig. - figura
g - gramas
GABA – ácido gama-aminobutírico
GMPc – guanina monofosfato cíclico
i.pl. – intraplantar
it. – intratecal
ip. - intraperitoneal
III-8 – tityustoxina III-8
IL-1β - interleucina 1 beta
IL-6 - interleucina 6

IL-8 - interleucina 8
Indo - indometacina
IV-5 – tityustoxina IV-5
KCl – cloreto de potássio
Kg - quilograma
LNMA - N^G-monometil-L-arginina acetato
LPS - lipopolissacarídeo bacteriano
LTB₄ – leucotrieno do tipo B₄
LTC₄ – leucotrieno do tipo C₄
LTD₄ – leucotrieno do tipo D₄
LTE₄ - leucotrieno do tipo E₄
ml – mililitros
NGF – fator de crescimento neural
NMDA - N-metil-D-aspartato
NPY – neuropeptídeo Y
NO - óxido nítrico
Paracet. - paracetamol
PBS - solução tampão fosfato
PG's – prostaglandinas
PGE₂ – prostaglandina E₂
PIV- peptídeo vasoativo intestinal
SNAP - S-nitroso-N-acetil-D, L-penicilamina
T.serrulatus - *Tityus serrulatus*
TNF - Fator de Necrose Tumoral
TsFG-50 – tityustoxina fracionada em Sephadex de gel poliamida 50
TsTx – tityustoxina
TsTx-IV – tityustoxina IV.
TsTx-K α - tityustoxina que atua em canal de potássio alfa
TsTx-K β - tityustoxina que atua em canal de potássio beta
TsTx-VI – tityustoxina VI

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1a- Aspecto morfológico do Escorpião

Figura 1b- Distribuição geográfica do *Tityus serrulatus*, no Brasil

Figura 1c- Escorpião- amarelo (*Tityus serrulatus*)

Figura 1d - Escorpião- marrom (*Tityus bahiensis*)

Figura 2 – Cascata da liberação de mediadores que participam da gênese da dor inflamatória e controle terapêutico da mesma.

Figura 3 a- Diagrama do aparelho utilizado para a medida de hiperalgesia

Figura 3 b – Gráfico explicativo do cálculo da intensidade de hiperalgesia na metodologia utilizada.

Figura 4 – Tempo e dose dependência do efeito hiperalgésico induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno de *Tityus serrulatus*.

Figura 5 - Efeito hiperalgésico dose dependente do veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 6 - Efeito da indometacina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 7 - Efeito do meloxicam na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 8 - Efeito do atenolol e da guanetidina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 9 - Efeito da associação de meloxicam com atenolol ou guanetidina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 10 - Efeito da dexametasona sobre a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 11 - Efeito do nimesulide sobre a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 12 - Efeito da pentoxifilina sobre a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (2,5 µg/pata) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 13 - Efeito do HOE-140 sobre a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 14 - Efeito da dipirona sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado intraplantarmente

Figura 15 - Bloqueio do efeito analgésico da dipirona sobre a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de veneno de *Tityus serrulatus*, pelo LNMMA e azul de metileno

Figura 16 - Efeito do diclofenaco na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado i.pl.

Figura 17 - Bloqueio do efeito analgésico do diclofenaco sobre a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de veneno de *Tityus serrulatus*, pelo LNMMA e azul de metileno

Figura 18 - Efeito do SNAP na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado i.pl.

Figura 19 - Efeito do paracetamol sobre a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (2,5 µg/pata) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 20 - Efeito do MK886 na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus* 2,5 µg/pata

Figura 21 - Efeito da meclisina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 22 - Efeito hiperalgésico do veneno bruto de *Tityus serrulatus*, em patas de ratos com mastócitos depletados de histamina

Figura 23 - Efeito da administração de inibidores de citocinas após a administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 24- Dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α , uma e duas horas após a administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Figura 25- Esquema explicativo das conclusões obtidas neste trabalho experimental

Lista de tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1- Distribuição geográfica das principais espécies de escorpiões do mundo

Tabela 2- Distribuição geográfica das principais espécies de escorpiões do Brasil

Tabela 3- Percentual de acidentes ocorridos por Escorpiões dentro da região de Controle Sanitário de Uberlândia - MG

Tabela 4- Percentual de acidentes ocorridos por Escorpiões dentro da região de Controle Sanitário de Uberlândia - MG

Tabela 5- Lista de drogas e diluentes utilizados neste trabalho

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Os Aspectos Biológicos e Morfológicos dos Escorpiões

Os escorpiões diferem dos outros aracnídeos por terem palpos compridos, além da característica cauda longa e perigosa. Os palpos funcionam como pinças grandes e poderosas, que podem ser usadas para segurar e dominar suas presas. São muito sensíveis ao tato e ao deslocamento do ar, devido à presença de cerdas muito longas e finas ao longo do corpo. Os escorpiões também podem possuir maior número de olhos que outros aracnídeos, sendo que algumas espécies podem possuir até seis pares, embora não seja comum. (Hassan, 1984)

O corpo do escorpião (figura 1a) é constituído por uma parte mais volumosa, o tronco, e por outra mais longa e estreita, chamada "cauda". A carapaça que constitui o tronco sem apresentar segmentação é chamada prossoma e engloba o cefalotórax, que não apresenta uma cabeça distinta. A parte que constitui o abdômen é o opistossoma e é bastante segmentada, chegando a apresentar doze segmentos. O opistossoma divide-se em mesossoma, porção abdominal que faz parte do tronco, e metassoma, porção formada pelos cinco segmentos posteriores. Estes constituem a cauda, juntamente com o telso, o último anel. A cauda termina como um aguilhão e é através deste ferrão que o escorpião inocula sua peçonha. No cefalotórax localizam-se os dois olhos medianos, na saliência cômodo-ocular, e os olhos laterais, de cada lado da carapaça (Figura 1a). (Barnes e cols., 1998)

O ferrão do escorpião fica localizado na extremidade do metassoma, conhecida como "cauda", embora não seja propriamente uma cauda, e sim a parte final do abdômen. O último anel abdominal -- o telso -- constitui a base do ferrão e contém a vesícula, que tem forma globular e vai se afinando posteriormente até terminar em um espinho curvo, chamado acúleo. A vesícula contém um par de glândulas que produzem e armazenam os vários constituintes do veneno do escorpião. O acúleo é semelhante a uma agulha hipodérmica: é oco e muito fino. Cada saco glandular liga-se, através de dois canais, a duas aberturas próximas da extremidade distal do ferrão, por onde sai o veneno. Ao dar a ferroadada, o escorpião regula a quantidade de veneno injetado através da contração dos músculos da

vesícula. Alguns escorpiões não injetam veneno quando cravam o ferrão. (Zlotkin e cols., 1976)

Os escorpiões usam o ferrão para diversos fins. O mais óbvio é para dominar suas presas, que antes são agarradas firmemente pelas pinças dos palpos. Os escorpiões fazem uso do ferrão quando não conseguem matar a presa por esmagamento com as pinças. Devido ao veneno que inoculam, pequenos escorpiões com pinças fracas conseguem dominar presas até do seu próprio tamanho. Um segundo uso do ferrão é na defesa. Através de um ferrão bem posicionado, os escorpiões podem manter afastados potenciais predadores. Apesar disso, eles são presa fácil para muitos animais, para os quais seu ferrão parece ser inócuo. Um terceiro uso do ferrão é durante o acasalamento. Observam-se freqüentemente machos aguilhoando as fêmeas ou golpeando-as com o telso. Parece provável que alguns escorpiões possuam feromônios que possam aumentar a receptividade da fêmea ou permitam reconhecimento de espécies durante o ritual de acasalamento. (Figura 1a) (Balozet, 1971)

O período de vida destes animais gira em torno de 5 (cinco) anos, atingindo a maturidade sexual por volta de 1 ano e meio. Na espécie *Tityus serrulatus* existem apenas fêmeas, a reprodução se dá por PARTENOGENESE. (Bücherl, 1971)

1.2 Escorpionismo no Brasil

O escorpionismo no Brasil ainda representa grande problema de saúde coletiva. Os acidentes com estes aracnídeos tendem a aumentar nas grandes cidades principalmente naquelas onde a oferta de serviços básicos de saneamento, esgoto e coleta de lixo são precários. (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia – MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão)

A dispersão de espécies sinantrópicas vem sendo facilitada pelo aumento da malha viária do país e pela predominância do transporte de cargas das mais variadas feitas por esta via, além do forte fluxo migratório humano de áreas escorpioníferas para outras livres destes animais. Esta população por muitas vezes

traz em sua bagagem além de seus objetos de mudanças, escorpiões estranhos às cidades de destino. (Velasco-Castrejón e cols., 1976)

Até o presente momento não foi definido de forma convincente a participação dos produtos químicos no controle escorpiônico, principalmente por desconhecimento da biologia, da dinâmica populacional e do comportamento destes aracnídeos por parte das indústrias produtoras, basicamente por falta de pesquisas e ensaios bem conduzidos. (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão)

1.3 Aspectos Epidemiológicos

Recentemente Amitai (1998), descreveu os sinais e sintomas apresentados por indivíduos picados por diferentes espécies de escorpiões do mundo, *Buthotus tamulus* (Índia), *Leiurus quinquestriatus* e *Androctonus crassicauda* (Norte da África), *Tityus serrulatus* (Brasil) e *Centruroides suffusus* (México). (Tabela I)

Várias são as espécies de escorpião encontradas no Brasil, sendo que o *Tityus serrulatus* (figura 1c), comumente chamado de escorpião-amarelo, é o principal responsável pelos acidentes mais graves. O *Tityus bahiensis* (figura 1d), comumente chamado de escorpião preto, também pode causar acidentes graves, porém é mais raro (Tabela II). (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão)

A distribuição geográfica do *Tityus serrulatus* ocorre principalmente na região do Triângulo Mineiro, porém vem avançando para o sul do país nos últimos dez anos (Figura 1b).

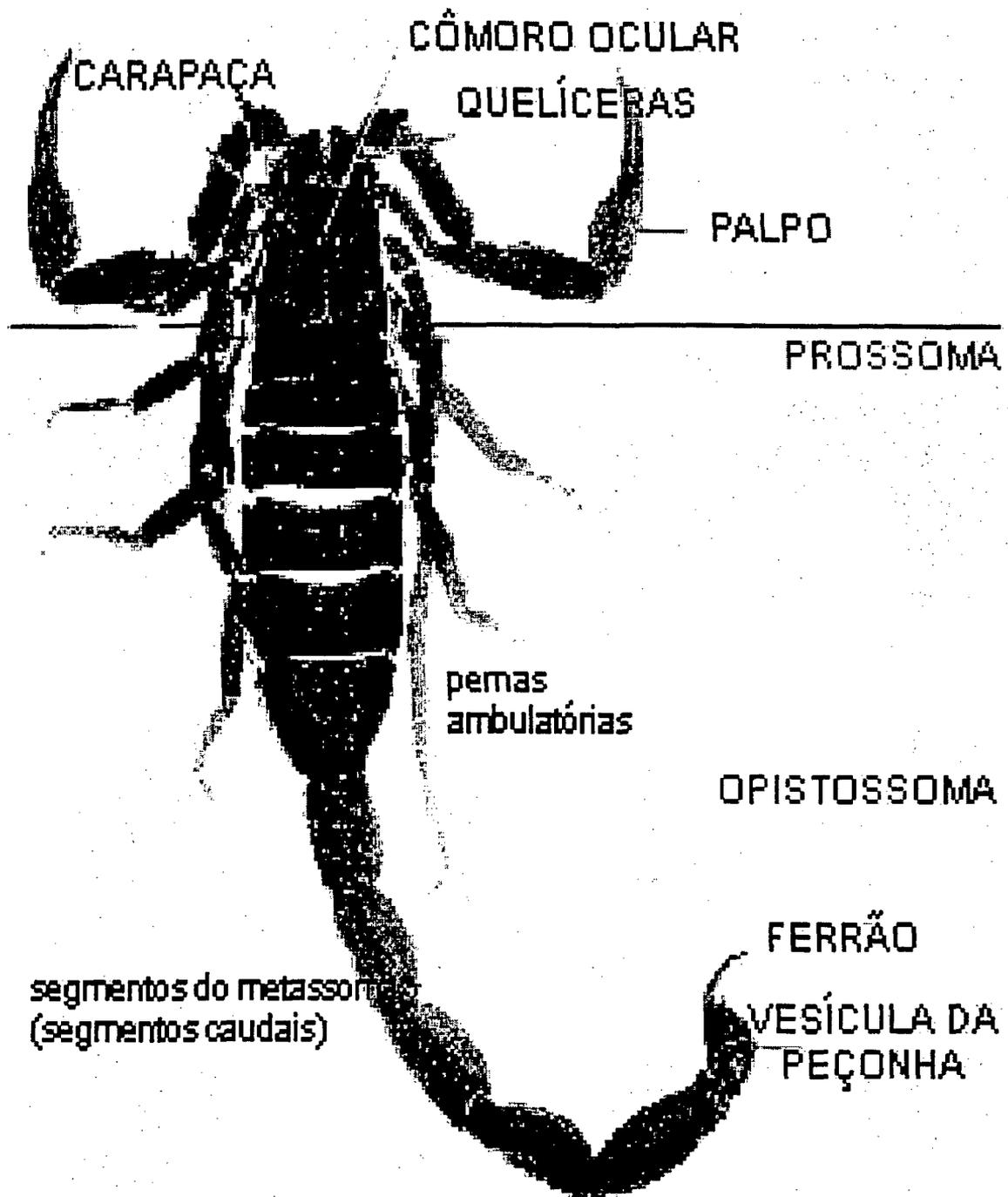


Figura 1a: Aspecto morfológico do Escorpião

Foto obtida da Home-page : www.geocities.com/~esabio/escorpiao/escorpiao.html

As tabelas abaixo demonstram a distribuição geográfica das principais espécies de escorpiões do mundo e do Brasil (Tabela I e Tabela II), bem como os índices de acidentes escorpiônicos em Minas Gerais (Tabela III e IV).

Tabela I: Distribuição geográfica das principais espécies de escorpiões do mundo.

Espécies	Família	Região onde são encontrados
<i>Androctonus crassicauda</i>	Buthidae	Sudoeste da Ásia
<i>Leiurus Quinquestriatus</i>	Buthidae	Norte da África; Sudoeste da Ásia
<i>Odontobuthus doriae</i>	Buthidae	Irã
<i>Centruroides noxius</i>	Buthidae	Nayarit, México
<i>Androctonus australis</i>	Buthidae	Norte da África
<i>Centruroides suffusus</i>	Buthidae	Durango, México
Tityus serrulatus	Buthidae	Brasil
<i>Centruroides limpidus</i>	Buthidae	Oeste do México
<i>Androctonus amoreuxi</i>	Buthidae	Norte da África
<i>Compsobuthus acuticarinatu</i>	Buthidae	Egito
<i>Buthus occitanus</i>	Buthidae	Mediterrâneo
<i>Hottentotta saulcyi</i>	Buthidae	Irã
<i>Centruroides exilicauda</i>	Buthidae	Arizona, USA; México
<i>Androctonus bicolor</i>	Buthidae	Norte da África
Tityus bahiensis	Buthidae	Brasil
<i>Mesobuthus eupeus</i>	Buthidae	Irã
<i>Hemiscorpius lepturus</i>	Ischnuridae	Irã

Tabela I: Amitai, 1998

Tabela II: Distribuição geográfica das principais espécies de escorpiões do Brasil.

Nome científico	Nomes populares	Distribuição geográfica
<i>T. bahiensis</i>	Escorpião marrom	MG, SP, PR, SC, RS, GO, MS
<i>T. cambridgei</i>	Escorpião preto	AP, PA
<i>T. costatus</i>	Escorpião	MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS
<i>T. fasciolatus</i>	Escorpião	GO, DF
<i>T. metuendus</i>	Escorpião	AC, AM, PA, RO
<i>T. serrulatus</i> (1)	Escorpião-amarelo	BA, MG, ES, RJ, SP, DF, GO, PR
<i>T. silvestris</i>	Escorpião	AC, AM, AP, PA

Tabela II: Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão

Tabela III: Percentual de acidentes ocorridos por Escorpiões dentro da região de Controle Sanitário de Uberlândia-MG/ Brasil

ESPÉCIE	PERCENTUAL DE ACIDENTES
<i>Tityus serrulatus</i>	65,5%
<i>Tityus Bahiensis</i>	3,6%
<i>Tityus mattogrossensis</i>	0,1%
<i>Bothriurus araguayae</i>	11,1%
Sem Informação de Espécie	19,7%

Tabela III: Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão

Tabela IV: Distribuição de escorpiões identificados por espécie conforme Distrito Sanitário – Uberlândia – MG – Brasil

	<i>T. serrulatus</i>	<i>T. bahiensis</i>	<i>B. araguayae</i>
Central	342	0	1
Leste	77	10	45
Norte	16	3	8
Oeste	26	8	7
Sul	52	12	23

Tabela IV : Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão

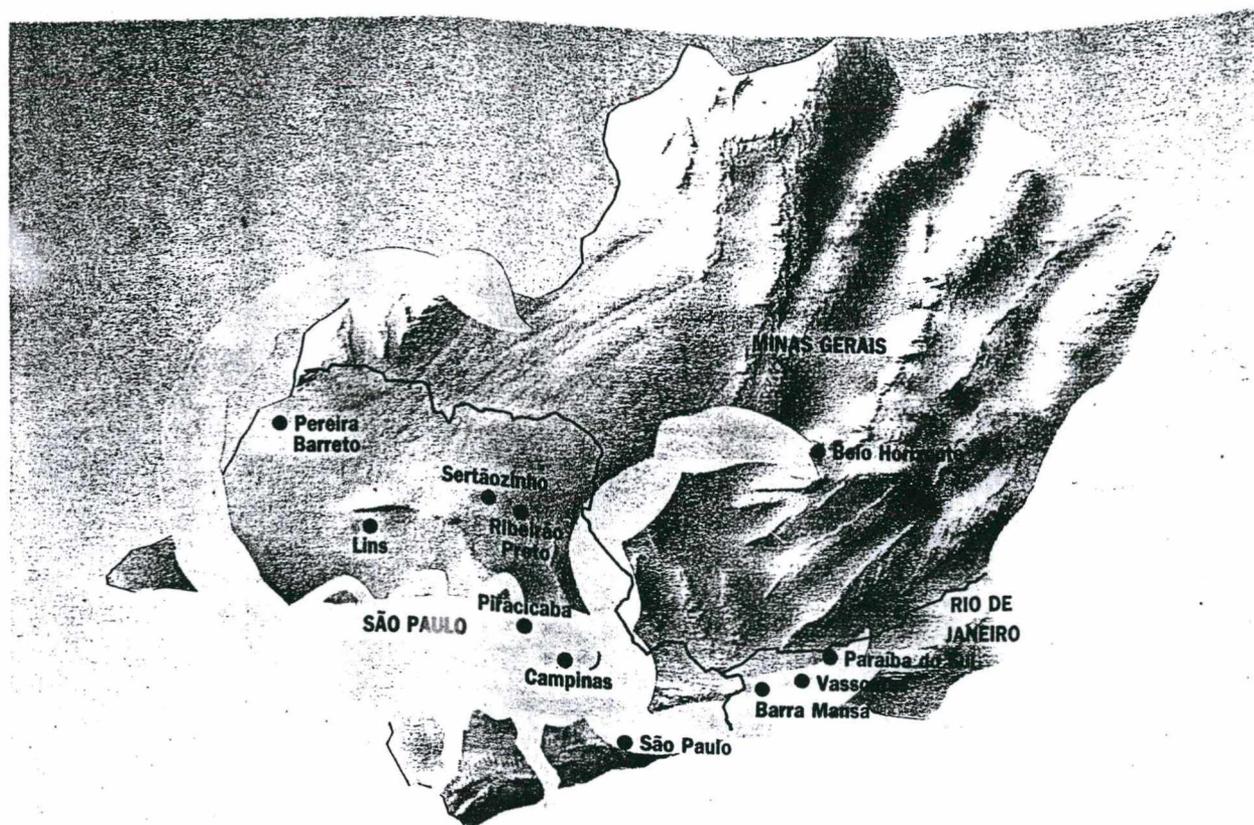


Figura 1b: Distribuição geográfica do *Tityus serrulatus*, no Brasil.

Diferentemente o *Tityus bahiensis*, ocorre desde o Estado da Bahia até o norte da Argentina e, na direção oeste, até Mato Grosso; o *Tityus serrulatus* ocorre apenas em Minas Gerais, Espírito Santo, Estado do Rio de Janeiro e Estado de São Paulo.

(Foto obtida da Revista Globo Ciência. p. 47-53, Abril, 1992)

Os acidentes com escorpião são menos notificados que os ofídicos. (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão). Sua gravidade está relacionada à proporção entre quantidade de veneno injetado e massa corporal do indivíduo picado.

A população de *Tityus serrulatus*, como previsto, continua seu avanço em busca de domínio territorial, sua capacidade predatória de outras espécies, assim como as vantagens bio-reprodutivas (partenogênese), vem se confirmando. Um fato curioso é que onde o *T.serrulatus* entra territorialmente, em pouco tempo as outras espécies desaparecem ficando apenas o escorpião-amarelo.

Mantendo-se este ritmo de dispersão a espécie reinará absoluta em poucos anos a exemplo do que ocorre em outras cidades como Belo Horizonte – MG e Aparecida .-SP. O alto percentual (19,7%) de espécies não identificadas em acidentes escorpiônicos se deve ao fato dos cidadãos, que acionam o serviço de captura realizado pelo Controle de Zoonoses de Uberlândia, não apresentarem o animal no momento do atendimento de socorro. (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão)

1.4 Acidentes com Escorpiões

Em Uberlândia ocorrem em média 5 a 6 acidentes notificados com escorpiões por mês. Em um trabalho conjunto com o Hospital Escola da Universidade Federal de Uberlândia - UFB, o Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia é informado sistematicamente destes acidentes. O grupo de maior risco em acidentes com estes aracnídeos são crianças, pessoas idosas e pessoas alérgicas. (Secretaria Municipal de Saúde – Uberlândia –MG - Brasil - Centro de Controle de Zoonoses – Laboratório de Animais Peçonhentos e Quirópteros – Relatório de Atividades 1999 – Dr. Paulo R. Salomão)

No Brasil, aproximadamente 10.000 casos de picadas de *Tityus serrulatus* são notificados anualmente, sendo que 50% dos casos ocorrem no Estado de Minas

Gerais. A espécie *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo) é a mais comum e com picadas fatais, especialmente em crianças, com índice de mortalidade maior que 1,1% (Campos e cols., 1980; Cardoso e cols., 1995 e Revelo e cols., 1996).

1.5 O Veneno

Segundo relatos clínicos, parece existir diversos fatores que modulam a toxicidade do veneno do escorpião para humanos. Os principais fatores são: 1) a toxicidade do veneno do tipo de escorpião envolvido; 2) a quantidade de veneno injetada pelo escorpião; 3) o tamanho do corpo da vítima; 4) a condição médica geral da vítima. Devido a seu pequeno tamanho, as crianças sofrem maior risco de envenenamento grave do que os adultos. A maior parte das mortes resultantes de picadas de escorpião também ocorre em crianças pequenas. (Velasco-Castrejón e cols., 1976; Gomez-Vera, 1983)

Algumas pessoas são alérgicas ao veneno dos escorpiões, da mesma forma que outras podem ser ao veneno das abelhas. Nestes casos, consequências muito graves, inclusive a morte, podem ocorrer rapidamente, mas não têm relação à toxicidade do veneno. Mortes ocorridas por envenenamento causado por espécies de escorpião sem importância médica resultam de choque anafilático. (Velasco-Castrejón e cols., 1976; Gomez-Vera, 1983)

O escorpião *T. serrulatus* é mais importante sob o ponto de vista clínico que o *T. bahiensis*, por provocar sinais e sintomas mais graves. O veneno do *T. serrulatus* pode não ser mais tóxico, mas este escorpião injeta, em cada picada, praticamente o dobro de peçonha injetada pelo *T. bahiensis*. (Zlotkin e cols., 1976)

A injeção de veneno bruto ou de toxinas purificadas do *Tityus serrulatus* produz experimentalmente (em camundongos) efeitos sistêmicos com sinais e sintomas similares aos observados em acidentes de envenenamento com humanos, ou seja, salivação, lacrimejamento, hipersecreção gástrica e pancreática, aumento da motilidade gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias, hipertensão arterial seguido de hipotensão, hiperglicemia, taquicardia, midríase e piloereção, entre outros (Freire-Maia e Campos, 1989). Estudos realizados por Revelo e cols. (1996), demonstraram que após injeção subcutânea de veneno em camundongos, inicia-se a absorção e em trinta minutos começa a ser detectado no plasma, sendo

completamente absorvido em duas horas. O veneno é amplamente distribuído e seu nível sérico é bem detectado em rim, pulmão, coração e fígado; e sua completa eliminação acontece num prazo de oito horas. Nesse mesmo estudo, o veneno não foi detectado no sistema nervoso central, indicando que não atravessa a barreira hematoencefálica, e a soroterapia demonstrou-se eficaz quando administrada logo em seguida do veneno ou uma hora após, revertendo todos os efeitos do envenenamento e diminuindo sensivelmente o nível sérico. No entanto a soroterapia foi ineficaz quando administrada horas após o envenenamento, provavelmente devido à rápida absorção e eliminação do veneno. (Revelo e cols., 1996)

Através de estudos histopatológicos, verificou-se que injeção intravenosa de doses subletais de veneno do *Tityus serrulatus*, em camundongos, causam lesões que incluem edema e congestão com hemorragia subpleural no pulmão, hipertrofia de fibras com degeneração de áreas do coração, e congestão e hemorragia do rim, degeneração hidrópica com hipertrofia de hepatócitos, congestão e hemólise, o que sugere que o veneno causa um influxo intracelular de cálcio, ativando as fosfolipases, responsáveis pela hidrólise de fosfolípidios de membrana (Corrêa e cols., 1997). Em contraposição, estudos de outros venenos de escorpiões como o veneno de *Leiurus quinquestriatus* (espécie mais abundante no Sudão), mostram que este não apresenta capacidade de ativar fosfolipase A. (Ibrahim, 1967)

Quanto a ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre as fosfolipases, os estudos são contraditórios, visto que Hess e Haugaard (1958), sugerem que veneno estimula a atividade da fosfolipase A, e que o efeito é similar ao produzido pela epinefrina, e Gomez e cols. (1973) sugerem que o veneno não possui nenhuma ação sobre as fosfolipases.

Estudos realizados por Novaes e cols. (1990), em ratos, demonstraram que injeção intravenosa da fração do veneno de *Tityus serrulatus*, denominada Tityustoxina (TsTx), causa após vinte dias nesidioblastose (alteração histológica do pâncreas caracterizada pelo aumento da plasticidade e do contorno das Ilhotas de Langerhans).

O veneno de escorpiões, tem sido classificado de acordo com a sua capacidade de excitabilidade no canal iônico. As espécies de escorpiões da Europa e África possuem toxinas que atuam em um determinado sítio no canal de sódio

voltagem-dependente, designadas como α -toxinas, que retardam o processo de inativação do canal de sódio, exacerbando assim o potencial de ação. As espécies de escorpiões encontradas na América, contém toxinas chamadas de β -toxinas, que possuem o seu sítio de ação sobre uma parte diferente das α -toxinas no canal de sódio, afetando este canal de forma a não deixar que ocorra o fechamento, sendo a ativação do potencial de ação contínua e ininterrupta. (Couraud e cols., 1982; Bechis e cols., 1984; Kirsch, 1989; Loret e cols., 1991)

Baseado em estudos da atividade biológica do veneno em atuar em canais de sódio gerando excitabilidade de membrana, Barhanin e cols. (1982), sugerem que o veneno de *Tityus serrulatus*, possui tanto α -toxinas, quanto β -toxinas.

O isolamento da primeira toxina do veneno bruto de *Tityus serrulatus* foi descrita em 1966, por Lutz e Mello, e denominada de Tityustoxina (TsTx). Outros grupos de pesquisadores tem caracterizado desde então outras toxinas presentes no veneno bruto, sendo que a toxina gama foi a primeira a ter a sequência de aminoácido terminal determinada. (Gomez e Diniz, 1966; Toledo e Neves, 1976; Possani e cols., 1977)

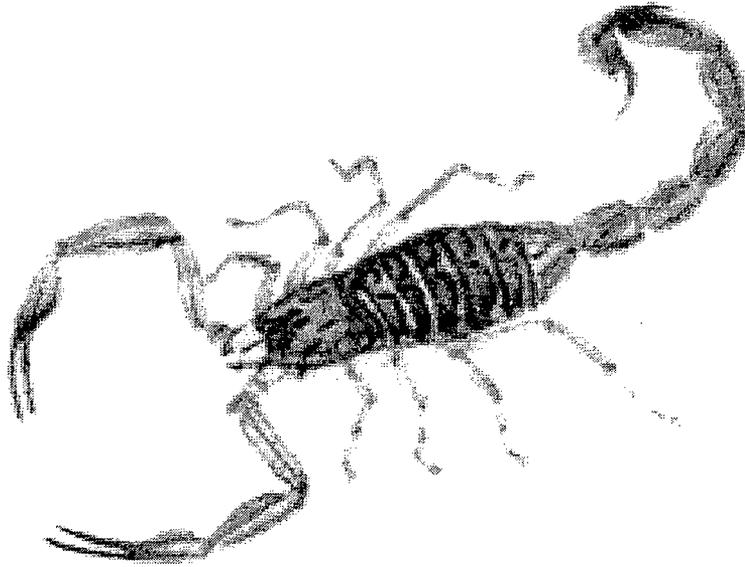


Figura 1c: Escorpião-amarelo (*Tityus serrulatus*)

- Amarelo claro, com manchas escuras sobre o tronco e na parte inferior do fim da cauda; o quarto anel da cauda com duas fileiras de "dentes" constituindo 2 pequenas serras dorsais

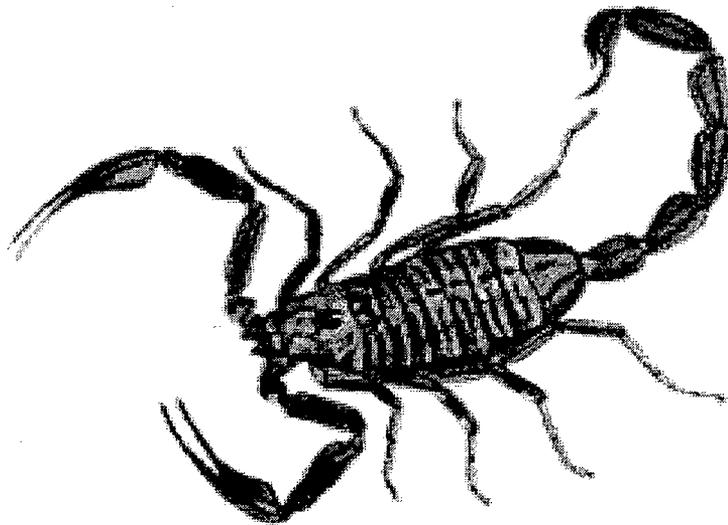


Figura 1d : Escorpião-marrom (*Tityus bahiensis*)

- Marrom avermelhado escuro, palpos e pernas mais claros, com manchas escuras. Segmento caudal liso no dorso. Quando adulto, chega a 7 cm de comprimento.

O veneno bruto de *Tityus serrulatus* contém neurotoxinas que já estão parcialmente ou completamente sequenciadas. Algumas destas toxinas, como a TsTX-V, possuem a capacidade de retardar o fechamento do canal de sódio, aumentando o tempo para a inativação do canal, sendo classificadas como α -toxinas (Kirsch e cols., 1989; Arantes e cols., 1993; Arantes e cols., 1994). Outras toxinas fracionadas do veneno, são semelhantes quanto ao mecanismo de ação no canal de sódio das β -toxinas. As β -toxinas atuam no canal de sódio causando um bloqueio no fechamento do canal, permanecendo este aberto, ocasionando uma ativação exaustiva do potencial de ação de membrana. São elas: gama toxina, III-8, TsTx-VI. (Yatani e cols., 1988, Becerril e cols., 1993)

Os componentes de maior toxicidade do veneno de *T.serrulatus* são as toxinas gama, III-8 e IV-5 que afetam a permeabilidade dos canais de sódio de vários tecidos, causando um bloqueio reversível e específico de canais de sódio sensíveis a voltagem, e sugere que este efeito do veneno em canal de sódio desencadeie um efeito secretagogo em pâncreas de cobaia causando pancreatite aguda. (Possani e cols., 1991 e Possani e cols., 1992)

Becerril e cols. (1997), sugerem que as toxinas TsTx-K α e TsTx-K β , atuem da mesma forma que as α -toxinas e β -toxinas, quanto às suas diferentes ações em canal de sódio, porém também afetando também canais de potássio.

A fração do veneno de *Tityus serrulatus* que apresenta maior toxicidade em camundongos é a TsFG-50, purificada através de filtração em gel de Sephadex G-50. (Chávez-Olórtegui e cols., 1997)

Outros estudos *in vitro*, demonstraram que venenos de escorpião e aranhas causam alterações em canais de cálcio. Ocasionalmente a entrada de cálcio em sinaptossomos obtidos da região cortical de cérebro de rato, através de canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCSV). Esta rápida elevação de cálcio resulta em uma consequente liberação de glutamato dos sinaptossomos (Romano-Silva e cols., 1993, 1994).

Estes dados corroboram com os dados que a toxina TsTx do escorpião gera a liberação de glutamato. A TsTx estimula o influxo de sódio através de canais sensíveis à tetrodotoxina, e este aumento de sódio, promove a liberação de glutamato em sinaptossomos cerebrocorticais dependente ou não da concentração

de cálcio intracelular (Romano-Silva e cols., 1994a). Ainda, a TsTx é mais eficiente que o cloreto de potássio (KCl) em liberar glutamato (Romano-Silva e cols., 1994b), e a fração TsTx-IV (tipo gama-toxina) é capaz de induzir a liberação não só de glutamato, mas também a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), e esta liberação de neurotransmissores é totalmente abolida pela administração de tetrodotoxina, sugerindo também a participação de canais de sódio nesta liberação de glutamato, pela TsTx-IV. (Sampaio e cols., 1996)

Estudos realizados em fatias isoladas de cérebro de rato, demonstram que a Tityustoxina (TsTx) aumenta a liberação de acetilcolina (ACh), e que este aumento de ACh é independente da concentração externa de potássio, mas dependente da concentração de sódio e cálcio. A ausência ou baixas concentrações de cálcio, abolem o efeito previamente observado da TsTx em aumentar a liberação de ACh (Gomez e cols., 1973).

Birks (1963) demonstrou que a concentração de sódio é importante tanto na síntese quanto na liberação de ACh, e posteriormente, Chan e Quastel (1970) demonstraram que tanto a cocaína quanto a tetrodotoxina inibem a recaptação de sódio em fatias de cérebro submetidas a estimulação elétrica.

A cocaína (inibe a recaptação de catecolaminas) não inibe a liberação de ACh estimulada pela TsTx, porém tetrodotoxina (bloqueador de canais de sódio sensíveis a voltagem) inibe a ação da TsTx em aumentar a liberação de ACh, sugerindo que a TsTx tem efeito intracelular, atuando em sítios na vesícula sináptica, aumentando a liberação de ACh (Gomez e cols., 1973). O mecanismo de liberação de ACh é dependente da abertura de canal de cálcio, sendo que a entrada deste cátion promove a liberação de ACh, sugerindo que o sítio de ação do TsTx é sobre o sistema de transporte de cálcio na fibra nervosa, onde este efeito completamente bloqueado com tetrodotoxina (Gomez e cols., 1975 e Henriques e Gomez, 1975). Este aumento da liberação de ACh não é atribuído a atividade das fosfolipases e /ou colinesterases (Gomez e Gonçalves, 1960).

No entanto em estudos *in vivo*, onde foi feita administração intracerebroventricular de TsTx, não ocorreram alterações na liberação de ACh nas regiões do tálamo, hipotálamo e hipocampo, porém de modo contrário, a TsTx reduziu os níveis de ACh nas regiões do núcleo do trato solitário e córtex cerebral.

Esta falha da TsTx em aumentar os níveis de ACh em determinadas regiões do cérebro, pode ser explicada como resultado a diferença na sensibilidade para toxina ou diferenças da taxa de concentração de ACh. (Gomez e Santos, 1977)

Diniz e cols. (1966) sugeriram que o veneno de *Tityus serrulatus* tem efeito contrátil indireto em íleo de cobaia isolado, através da liberação de ACh. A ação contrátil do veneno foi inibida pela atropina e potencializada por anticolinesterásicos, porém o uso de agentes bloqueadores ganglionares como hexametônio não inibiram o efeito contrátil do veneno. A ação contrátil do veneno não foi inibida pelas colinesterases, portanto este efeito provavelmente ocorre em uma das etapas de síntese metabólica da ACh em fibras pós-ganglionares, e muitos dos sintomas de intoxicação com o veneno de *Tityus serrulatus* podem ser interpretados como liberação de ACh em estruturas nervosas.

Estudos realizados em junção neuro-muscular e diafragma isolado de rato, demonstram que TsTx ou gama-toxina apresentam efeito facilitador na transmissão neuro-muscular, semelhantes àquele processo de ativação da liberação de ACh em fatias cerebrais de rato *in vitro*, através da ativação de canais de sódio. Este efeito estimulador das toxinas liberando ACh é inibido por tetrodotoxina ou D-tubocurarina. (Vital Brazil e cols., 1973; Moss e cols., 1974; Oliveira e cols., 1989)

Narahashi e cols. (1972) e Gwee e cols. (1995), sugerem que o efeito do veneno em aumentar a liberação de neurotransmissores, é devido a habilidade deste em prolongar a duração do potencial de ação. Muitos dos sintomas desenvolvidos após a picada de *Tityus serrulatus* são atribuídos à liberação de neurotransmissores.

As toxinas do *Tityus serrulatus* potenciam a secreção de insulina em Ilhotas de Langerhans isoladas (Marangoni e cols., 1995). Por outro lado, demonstrou-se que o veneno ou suas toxinas, como TsTx-1 causa hiperglicemia e decréscimo de glicogênio no fígado, e que este efeito seria devido a alta da produção de glicose através do glicogênio do fígado mediante estimulação de receptores α -adrenérgicos. (Corrêa e cols., 1997)

Outros autores, demonstraram que injeção subcutânea de veneno bruto induz hipertensão arterial e edema uni ou bilateral em pulmão de ratos, muito provavelmente relacionado como aumento da liberação de catecolaminas no nervo

adrenérgico terminal. (Parthasarathy e Venkaiah, 1986, Gueron e Ovsyscher, 1987, Santana e cols., 1996 e Corrêa e cols., 1997)

Moss (1973 e 1974), demonstrou que o veneno de *T.serrulatus* produziu efeitos simpatomiméticos em coração isolado perfundido de cobaia, e a administração de dose subletal do veneno depleta o estoque de catecolaminas da medula adrenal. Também foi observado nesse estudo, que as toxinas do veneno bruto do *Tityus serrulatus* foram capazes de liberar noradrenalina e dopamina- β -hidroxilase, confirmando assim a ação simpatomimética indireta do veneno, estes efeitos de liberação de catecolaminas foram semelhantes aos obtidos por estimulação elétrica.

Em artéria caudal isolada de rato, a TsTx induz um efeito contrátil, que é inibido por prévio tratamento com reserpina, tratamento com fentolamina, tetrodotoxina, verapamil ou redução das concentrações de sódio na solução fisiológica. Por outro lado, a cocaína potencia o efeito contrátil da artéria à TsTx, sugerindo que o efeito contrátil da TsTx na artéria caudal isolada de rato, envolve a estimulação da liberação de catecolaminas endógenas, que atuam contraindo a musculatura lisa do vaso arterial. (Savino e Catanzaro, 1985)

Corrado e cols. (1974) demonstraram que há uma ação indireta do veneno na liberação de catecolaminas, muito provavelmente sendo o seu sítio de ação na fibra pós-ganglionar simpática. A TsTx parece ter ação diferente da tiramina, pois a TsTx não reverte a hipertensão em ratos reserpinados com infusão de noradrenalina, não é bloqueado por cocaína e a resposta hipertensiva não causa taquifilaxia. O efeito do veneno também foi bloqueado com a administração crônica e aguda de guanetidina (que depleta os estoques de catecolaminas periféricamente), sendo o efeito hipotensivo inicial do veneno bloqueado pela ação da atropina, sugerindo uma ação na liberação de ACh.

Ramos e Corrado (1954), demonstraram que o veneno induz hipertensão, taquicardia, hiperglicemia e relaxamento em duodeno de coelho atropinizado e ainda induz outros sintomas que são mediados pelo simpático. O protocolo experimental em coração de cobaia perfundido (Freire-Maia e Ferreira, 1961), sugere as ações do simpático e parassimpático simultaneamente. Estes autores, nestes trabalhos, sugerem que o veneno é uma neurotoxina que atua em fibras simpáticas pós-

ganglionares, onde a noradrenalina é liberada através de uma prévia liberação de ACh em gânglios. Provavelmente somente uma substância tóxica, agindo na via de liberação de ACh pelo sistema nervoso autônomo (Diniz e cols., 1966), poderia explicar este efeito simultâneo do simpático e do parassimpático em órgão isolado produzido pelo veneno.

O veneno de *T. serrulatus* causa uma curta bradicardia em coração isolado de cobaia, seguido de aumento da força e da frequência da contração cardíaca. A bradicardia é bloqueada com atropina e potenciada com neostigmina e a estimulação cardíaca é abolida com β -bloqueador (propranolol), esta estimulação também é eliminada em ratos pré-tratados com reserpina. O hexametônio (um curare não despolarizante) não tem efeito sobre a bradicardia ou estimulação cardíaca causada pelo veneno em doses que abolem o efeito da nicotina, demonstrando que o veneno não atua em gânglios de cobaia. Em conclusão ambos os efeitos do veneno são decorrentes de sua ação indireta e local sobre a liberação de ACh e norepinefrina, e o sítio de ação do veneno é na fibra pós-ganglionar. (Morales e Vaughan, 1966; Corrado e cols., 1968)

1.6 Sinais e sintomas descritos em casos de acidentes com *Tityus serrulatus*

A severidade do envenenamento por *Tityus serrulatus* depende da idade e tamanho do indivíduo picado, sendo grande o índice de severidade do acidente em crianças. Na intoxicação sistêmica, ocorre uma super estimulação do sistema nervoso central, e dos sistemas simpático e parassimpático, com intensa dor local e parestesia, cardiotoxicidade e encefalopatia fatal. Os sintomas ainda incluem: agitação, taquicardia, vômitos, dor abdominal, salivação, diaforese, desidratação, rigidez e contração muscular, tremor, alteração do diâmetro pupilar, hipertermia, taquiarritmias e ocasionalmente bradiarritmias, hipertensão, falência cardíaca, entre outros. Análises laboratoriais incluem anormalidades como: hiperglicemia, leucocitose, elevação transitória das enzimas pancreáticas e cardíacas. (Amitai, 1998)

Crianças com envenenamento por *Tityus serrulatus* apresentam sinais clínicos de resposta inflamatória, bem como taquicardia, taquipnéia, hipo ou

hipertermia, dor em queimação e intoxicação. A liberação de citocinas endógenas e a ativação da resposta inflamatória de fase aguda está bem documentada em pacientes picados, e os estudos bioquímicos realizados em crianças picadas por *Tityus serrulatus*, que deram entrada no hospital entre uma e três horas após o acidente, demonstraram um aumento do nível sérico de IL-6 nas primeiras horas decrescendo em 12 e 24 horas. Estes resultados sugerem uma ativação de citocinas e liberação de IL-6, sendo seu pico entre 3 e 6 horas, diminuindo em 12 horas. (Sofer e cols., 1996)

Dados clínicos descritos por Amaral e cols. (1993), relatam que pacientes picados por *Tityus serrulatus*, podem apresentar edema unilateral de pulmão, dor intensa no local da picada com pontadas intermitentes, hipotermia e taquicardia. Comumente a vítima fica prostrada. É importante saber se a picada foi produzida por escorpião ou aranha, uma vez que os sintomas das picadas de escorpião são semelhantes aos das picadas de aranhas.

O veneno atua principalmente a nível de sistema nervoso podendo ocorrer morte por insuficiência cardíaca e respiratória, náuseas, vômitos, sudorese e agitação podem estar presentes entre os sintomas. (Amaral e cols., 1993)

1.7 A Resposta Inflamatória

A invasão do tecido por um agente patogênico, por uma substância lesiva ou estranha ao organismo, desencadeia uma resposta ou uma série de reações, que são descritas como processo inflamatório. Esta "Resposta ou Processo inflamatório" tem como função principal proteger o organismo e reparar o tecido lesionado. (Robbins e cols., 1994)

A resposta inflamatória tem caráter reparador, já que esta atua no intuito de destruir, diluir ou bloquear o agente agressor. A inflamação não é um evento único, mas sim, envolve uma gama de eventos, que possibilitam dependendo da intensidade do estímulo, cicatrizar e reparar o tecido lesado. (Robbins e cols., 1994)

A migração de células, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos e/ou linfócitos, amplifica a reação inflamatória. A destruição do tecido inflamado ocorre devido a liberação de enzimas líticas de células destruídas

localmente ou por uma hiperatividade fagocitária. (Siqueira-Jr e Sabóia Dantas, 1996)

Esta série de eventos ocorre em uma ordem cronológica. A reparação do tecido inicia já na fase inicial da inflamação, e normalmente só é concluída depois da neutralização do estímulo agressor. A resposta inflamatória pode ser deletéria, quando ocorrem respostas de hipersensibilidade, ou a reparação celular pode ser conduzida de forma errônea, levando a cicatrizes desfigurantes ou a faixas de fibrose que geram obstrução ou imobilidade. Devido a estes processos, a produção novas drogas anti-inflamatórias, tentam potencializar os efeitos benéficos da inflamação e inibir ou controlar as sequelas nocivas. (Robbins e cols., 1994)

A resposta inflamatória envolve tecidos conjuntivos vascularizados, componentes do plasma e células circulantes presentes nos vasos sanguíneos, e envolve componentes extravasculares do tecido. Existem dois tipos de inflamação, a aguda e a crônica, que diferenciam em termos de tempo, exsudação de líquido (edema), migração de leucócitos, presença ou não de linfócitos e macrófagos. (Robbins e cols., 1994)

Na presença de um estímulo injuriante, ocorre uma resposta precoce que pode ser descrita como uma reação de alarme, na qual os macrófagos residentes parecem desenvolver um papel fundamental na inflamação aguda, liberando citocinas e mediadores inflamatórios clássicos. Estes mediadores químicos iniciam e amplificam a resposta inflamatória. (Siqueira-Jr e Sabóia Dantas, 1996; Robbins e cols., 1994)

Celsus, um estudioso romano do primeiro século d.C., foi o primeiro a enumerar os quatro sinais cardeais da inflamação, *rubor*, *tumor*, *calor* e *dor*. Um quinto sinal clínico, a perda de função celular, foi proposto por Virchow (Robbins e cols., 1994).

A inflamação aguda possui três componentes principais: alterações no calibre vascular, que aumenta o fluxo sanguíneo; o extravasamento de líquido devido ao aumento da permeabilidade vascular e por fim, a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. (Robbins e cols., 1994)

As alterações do fluxo e do calibre vascular, iniciam-se quase que imediatamente após a agressão sofrida. Ocorre a vasodilatação, que é gerada

devido à abertura de todos os leitos capilares da região, levando assim a um aumento do fluxo sanguíneo, causando rubor e calor local. (Stricker, 1876; Lewis, 1927)

O aumento da permeabilidade vascular, caracteriza a inflamação aguda, e ocorre devido ao extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício (exsudado ou edema). Este extravasamento afeta apenas vênulas com 20 a 60 μm de diâmetro e não envolve as arteríolas. A permeabilidade vascular é dependente da integridade das células endoteliais, que no aumento desse processo, contraem-se, levando a formação de junções intercelulares alongadas, formando lacunas (*gaps*). O aumento da permeabilidade vascular é desencadeado por mediadores químicos pró-inflamatórios, histamina, bradicinina, Substância P, peptídeo regulador do gene da calcitonina (CGRP) e leucotrienos. (Holgate, 1986; Barnes, 1985; Joris e cols., 1987). Com o extravasamento de líquido celular, ocorre a diapedese leucocitária e a fagocitose. O leucócitos migram para o foco inflamatório devido a substâncias liberadas nesta região agredida, denominadas substâncias quimiotáticas.

Tanto agentes exógenos, produtos bacterianos, como produtos endógenos, tais como: leucotrienos, citocinas e componentes do sistema complemento, são agentes quimiotáticos. Em seguida ocorre a fagocitose do agente agressor, processo que pode conduzir a destruição do microorganismo. Durante a quimiotaxia e a fagocitose, leucócitos ativados podem liberar metabólitos tóxicos e proteases para o meio extracelular e causar lesão tecidual. (Solomon e cols., 1968; Williams e Peck, 1977; Ferreira, 1972; Saxena e cols., 1979)

Dentre os sinais e sintomas da inflamação, a sensação dolorosa ocorre devido a sensibilização dos neurônios sensoriais primários aferentes, através de substâncias endógenas que ativam os nociceptores livres das terminações nervosas. (Keele e Armstrong, 1964; Dalessio, 1972)

1.8 Dor Inflamatória

Existe uma grande dificuldade em definir "DOR", já que se relaciona com sensações que podem ser emocionais ou não. A sensação dolorosa pode estar

relacionada com uma percepção psicológica ou fisiológica, dependendo do estímulo injuriante ou nocivo.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain - IASP) define “Dor” como “uma sensação desagradável, com experiência emocional, em resposta a uma lesão tecidual real ou potencial”.

1.8.1 Fibras neuronais envolvidas na transmissão da dor

As fibras neuronais é que determinam a captação de diferentes estímulos sensoriais nocivos ou não. Para a percepção do toque e calor existem fibras mielinizadas específicas. (Burgess e Perl, 1973)

São três as principais fibras neuronais para a captação de estímulos, fibras A beta, fibras A delta e fibras C. As fibras A beta são fibras largamente mielinizadas, que são sensíveis à pequenos estímulos elétricos, porém não evocam sensação de dor. Existem barragens aferentes nestas fibras que diminuem a sensibilidade das células da medula para estímulos nocivos e diminuem conseqüentemente a dor. (Willer e cols., 1980; Sinclair, 1981)

As fibras A delta são fibras mielinizadas, porém contém pouca mielina em relação as fibras A beta. Estas fibras são ativadas por um simples impulso elétrico, sendo elas facilitadoras do impulso e prolongam o estímulo em muitas células da medula espinal e aumentam a intensidade de dor. (Willer e cols., 1980; Sinclair, 1981)

As fibras C são não mielinizadas, sendo a maioria destas fibras nociceptivas, visto que estímulos seletivos destas fibras freqüentemente evocam dor. Existem evidências para acreditar nas fibras C como responsáveis pela sensação de dor, 70 % das fibras aferentes do corno dorsal da medula são amielinizadas e a maioria são nociceptores. (Willer e cols., 1980; Sinclair, 1981)

Os nociceptores, são ativados por impulsos elétricos ou estímulos químicos. Os nociceptores constituem-se de terminações neuronais livres, podendo ser as fibras mielinizadas ou não mielinizadas, fibras A δ e fibras C, respectivamente. (Burgess e Perl, 1973; Bessou e Perl, 1969)

Em termos de velocidade de condução de estímulos, as fibras aferentes do tipo C, conduzem a resposta numa velocidade menor que 2m/s. Já as fibras aferentes do tipo A δ (tipo I e II), são mielinizadas e conduzem o estímulo numa velocidade superior a 2 m/s. (Kumazawa e Mizura, 1980; Levine, 1991; Martin e Murphy, 1995)

As fibras do tipo A δ , diferenciam-se em dois tipos devido a diferença na resposta. A fibra A δ do tipo II, exacerba a resposta nociva, e a fibra A δ do tipo I mantém a resposta dolorosa constante. As fibras do tipo C, possuem um comportamento semelhante à fibras A δ do tipo II. As fibras C captam qualquer tipo de estímulo, seja ele mecânico, térmico ou químico, devido a esta sensibilidade de captação de diferentes estímulos, as fibras C são chamadas de fibras que contém nociceptores polimodais (Burgess e Perl, 1973; Fantini e cols., 1995; Levine e cols., 1999)

Estímulos nocivos químicos, térmicos ou mecânicos ativam nociceptores a produzir uma sensação de dor. (Levine e cols., 1992) Os estímulos nocivos servem para alertar o organismo, ativando o sistema nervoso periférico e central, gerando uma resposta do corpo

A dor inflamatória, é a estimulação dos nociceptores através de mediadores pró-inflamatórios liberados pelo tecido injuriado. (Ferreira, 1972; Rosenthale e cols., 1972; Ferreira e cols., 1973; Juan e Lemeck, 1974; Moncada e cols., 1975) . A dor é caracterizada no tecido injuriado pela presença de hiperalgesia e alodinia, a prevalência de um destes estados é o percentual de sensibilização dos terminais periféricos dos neurônios sensoriais aferentes, juntamente com muitas mudanças no sistema nervoso central. (Garry e cols., 1999)

A sensibilização dos receptores da dor é um fator comum à todos os tipos de dor inflamatória. As fibras C-polimodais, receptores de alto limiar ou receptores conectados à fibras finamente mielinizadas (fibras A delta) tem sido relacionadas com a hiperalgesia inflamatória. (Burgess e Perl, 1973; Perl, 1976, Ziegler e cols., 1999)

Keele e Armstrong em 1964 e Dalessio em 1972, descreveram o termo **hiperalgesia**, como sendo o resultado da sensibilização de nociceptores induzida por uma estimulação química ou mecânica, e presente basicamente em eventos que

ocorrem na dor inflamatória. Em 1972, Ferreira demonstrou que injeções intradérmicas de histamina, bradicinina e acetilcolina, produzia **dor declarada** de curta duração, e somente as prostaglandinas produziam um efeito hiperalgésico.

A hiperalgesia é decorrente de uma sensibilização dos nociceptores do neurônio sensorial primário aferente, decorrente de um estímulo mecânico, térmico ou químico. Na hiperalgesia, estímulos normalmente dolorosos evocam dor de maior intensidade ou precisam de menos tempo para fazê-lo. **A alodinia** é um fenômeno distinto da hiperalgesia, embora ambos resultem na estimulação do nociceptor. No primeiro caso, o estímulo não chega a ativar diretamente o nociceptor, somente causa uma sensibilização, de modo que estímulos anteriormente não dolorosos, passam a produzir a sensação de dor. (Hardy e cols., 1967; McMahon e Koltzenburg, 1990; Ossipov e cols., 1995; Andrew e Greenspan, 1999; Levine e cols., 1999)

Recentemente propõe-se uma nova classe de receptores para dor, que são denominados de nociceptores “silenciosos” ou “dormentes” (sleeping nociceptor). Estes “nociceptores dormentes” estão amplamente expressos em vísceras como bexiga, cólon e em joelhos. Eles não estão ativos em tecidos normais, mas são recrutados durante o processo inflamatório. (McMahon e Koltzenburg, 1990)

Os eventos intracelulares durante a hiperalgesia inflamatória ainda não estão completamente compreendidos, porém há evidências que a hiperalgesia em patas de rato possa ser induzida através do aumento da concentração de AMPc intracelular e/ou da concentração de cálcio. (Ferreira e Nakamura, 1979)

Canais de cálcio de alto limiar para voltagem, quando se abrem despolarizam o neurônio levando a liberação do neurotransmissor e conseqüentemente influenciando no sistema mediador-receptor, nos níveis de excitabilidade da membrana, nas concentrações de segundos e terceiros mensageiros e na expressão gênica. Este fenômeno aparece em muitos processos inclusive na nocicepção normal, na hiperalgesia e na alodinia. A utilização de antagonistas de canais de cálcio dos tipos L, N, P/Q, particularmente os bloqueadores de canais do tipo N, podem prevenir e/ou atenuar a dor declarada, hiperalgesia e a alodinia. (Vanegas e Schaible, 2000)

Existem várias evidências que o aumento de AMPc neuronal, ou o bloqueio das fosfodiesterases, principalmente a do tipo 4, geram hiperalgesia (Paaizow, 1994; Cunha e cols, 1999). Estudos demonstraram que a administração de prostaglandina PGE₂ induz o aumento dos níveis de AMPc (Smith e cols., 1998). Existem evidências que o AMPc aumente a expressão do receptor NK1 para neurocinina 1, uma substância álgica. Desta forma, os diferentes estudos contribuem para que o AMPc seja considerado um sinalizador intracelular da cascata da hiperalgesia (Sluka, 1997; Abrahams e cols., 1999; Aley e Levine, 1999)

1.9 Mediadores químicos que participam na gênese da Dor Inflamatória

Após o trauma ou lesão tissular, várias substâncias químicas são liberadas no local afetado. No processo hiperalgésico a ativação de receptores dormentes, que somente são recrutados durante o processo inflamatório, ocorre devido a síntese e liberação de uma série de mediadores químicos. (Kress e cols., 1996)

Com exceção dos eritrócitos, todas as células são capazes de sintetizar prostanóides, que são liberados em resposta a diferentes tipos de lesões ou distúrbios da membrana plasmática. (Vane e Botting, 1987)

O produto da quebra dos fosfolípidios de membrana, pelas fosfolipases ativadas durante a injúria celular, leva a produção do ácido araquidônico. Os metabólitos do ácido araquidônico são denominados eicosanóides, sendo estes metabólitos derivados de duas vias enzimáticas, a lipoxigenase e a ciclooxigenase. Somente os leucócitos possuem a enzima solúvel citosólica ciclooxigenase.

A via lipoxigenase, possui a enzima 5-lipoxigenase, que está presente predominantemente em neutrófilos. O principal produto da enzima é o 5-HETE, que é quimiotático para neutrófilos, este produto é convertido em compostos, que coletivamente são denominados leucotrienos. Os leucotrienos são divididos em LTB₄, um potente agente quimiotático, tanto em ratos quanto em humanos (Goetzl e Pickett, 1980; Levine e cols., 1992); LTC₄, LTD₄ e LTE₄ que causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. (Murphy e cols., 1979; Robbins e cols., 1994 ; Goodman e cols., 1996; Rang e cols., 1997; Vane e Botting, 1987)

A prostaglandina e a prostaciclina são metabólitos da segunda via, a via da enzima ciclooxigenase (COX). Sabe-se que existem duas isoformas da enzima ciclooxigenase, tipo 1 e 2 (COX₁ e COX₂, respectivamente), sendo que a primeira ocorre constitutivamente no organismo, enquanto que a segunda é induzida durante o processo inflamatório. A pequena quantidade de prostaglandina produzida pela enzima COX₁ constitutiva, tem papel fisiológico importante como citoprotetor gástrico, modulador do controle endócrino renal, e ainda, a prostaglandina é produzida pelo miométrio em altas quantidades durante as fases luteinizantes e menstrual do ciclo ovulatório, sendo coerente com os relatos de dor durante estes períodos. (Vane e Botting, 1995, Sharma e cols., 1999)

A descoberta da segunda forma da enzima ciclooxigenase (Hemler e cols., 1976; Fu J-Y e cols., 1990; Masferrer e cols., 1990) foi crucial na ciência, principalmente no que diz respeito á produção de fármacos mais específicos em inibir a COX₂ e conseqüentemente diminuir os efeitos colaterais gerados pela inibição da COX₁.

As prostaglandinas geradas após um trauma celular, desencadeado por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, podem ser do tipo E₂, D₂, F₂α, I₂. (Ferreira e Vane, 1967; Sharma e cols., 1999).

A prostaglandina E₂, é um potente relaxante da musculatura lisa vascular, gerando vasodilatação e eritema na inflamação aguda (Solomon e cols., 1968). A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado, levando a um extravasamento de fluído (edema). O edema pode ser causado por agentes que aumentam a permeabilidade vascular como bradicinina e histamina (Williams e Peck, 1977). A prostaglandina E₂ não causa edema, mas potencia a ação edematogênica de outros mediadores inflamatórios como a bradicinina e histamina (Ferreira, 1972) e ainda, outros estudos demonstraram que a prostaglandina E₂ é um potente agente pirético. (Saxena e cols., 1979; Seibert e cols., 1994)

Ferreira, em (1972), demonstrou que as prostaglandinas, principalmente a do tipo E₂, causavam hiperalgesia por várias horas. Posteriormente (Ferreira e cols., 1978b; Higgs e cols., 1978) demonstrou-se que esta hiperalgesia era decorrente da ativação de nociceptores silenciosos pela prostaglandina. A prostaciclina apresentam efeito mais rápido e latência menor que as prostaglandinas em causar

hiperalgesia, tanto em ratos quanto em cães. Enquanto a hiperalgesia induzida pela prostaciclina é imediata e de curta duração, a hiperalgesia induzida pelas prostaglandinas demoram a iniciar seu efeito e possuem uma ação duradoura. (Ferreira e cols., 1978b)

A administração isolada de ácido araquidônico em patas de rato, não causa hiperalgesia. Porém quando administrado concomitantemente com Interleucina-1-beta (IL-1 β) ou carragenina, potencializa a hiperalgesia induzida por estas duas substâncias, sugerindo que a indução da COX₂ é um processo limitante no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. (Ferreira, 1996)

Na hipótese de que a prostaglandina atuaria em receptores metabotrópicos, diferentemente da bradicinina, que atuaria em receptores ionotrópicos (Moncada e cols., 1978), Ferreira e Nakamura em 1979, demonstraram que a hiperalgesia induzida por prostaglandinas, dibutilil AMPc (Db-AMPc), isoprenalina, cloreto de Bário (BaCl₂) e ionóforo cálcio, causavam um aumento da concentração de AMPc/Ca²⁺ no nociceptor, e a hiperalgesia gerada por estas substâncias era potencializada com a administração local concomitante de metilxantinas (cafeína e teofilina). Em estudos posteriores, Ferreira e Lorenzetti, 1981, demonstraram que Db-AMPc (análogo do AMPc) induz hiperalgesia, bem como prostaglandina E₂ e prostaciclina. Neste mesmo estudo, o tratamento com cicloheximida (inibidor de síntese protéica), inibiu a hiperalgesia induzida tanto pela prostaglandina E₂ quanto pela prostaciclina, não afetando a hiperalgesia induzida pelo Db-AMPc, sugerindo que a hiperalgesia gerada pela prostaglandina é dependente de síntese protéica de um fator neuronal, e que este efeito modularia a estimulação ionotrópica neuronal. Estudos mais recentes demonstram que a hiperalgesia induzida por PGE₂ é abolida com substância que inibem a síntese de AMPc. (Wang e cols., 1996)

Baseados em resultados de Ferreira e Lorenzetti (1981), demonstrando a participação de AMPc na hiperalgesia (em patas de rato), e em estudos clínicos e fisiológicos de Wiesenfeld-Hailin e Hailin (1984), que sugeriam a existência de uma modulação simpática em impulsos somatossensórios; Ferreira e Nakamura (1987), estudaram a participação de aminas simpatomiméticas na hiperalgesia. Através da administração intraplantar, em patas de ratos, de substâncias adrenérgicas como noradrenalina, adrenalina, isoprenalina, dopamina, e aminas de ação indireta como

a tiramina, observaram que todas estas substâncias eram capazes de causar hiperalgisia semelhante à prostaglandina E₂. Além disso, este quadro hiperalgésico induzido por estas substâncias era revertido ou abolido com a administração de drogas simpato-líticas como atenolol, propranolol, antagonista seletivo de dopamina (D₁; SCH 23390), ou através da depleção periférica dos terminais nervosos adrenérgicos com guanetidina. Estas drogas simpato-líticas inibiram também a hiperalgisia induzida por agonista seletivo D₁ (SKF38393), sugerindo então que além da prostaglandina, existia um outro componente hiperalgésico, denominado componente simpático, e que provavelmente era mediado pelo receptor do tipo D₁. Estes resultados também foram reproduzidos na metodologia de contorção abdominal em camundongos por Duarte e cols., em 1988 (figura 2).

Corroborando com os estudos acima, Khasar e cols. (1999), demonstraram que a administração de epinefrina no dorso de patas de ratos induz hiperalgisia de forma dose dependente, sendo que o pré tratamento com propranolol ou com inibidores de proteína quinase A, mas não com fentolamina ou indometacina, atenuam significativamente a hiperalgisia (Khasar e cols., 1999). E estudos em humanos demonstraram que a administração de serotonina no músculo masseter era capaz de induzir hiperalgisia, sendo esta abolida por ganisetron (antagonista de receptor serotoninérgico) e propranolol (Ernberg e cols., 2000)

As citocinas já foram descritas como agentes importantes nas respostas imunológicas (Robbins e cols., 1994), e tem sido descritas como a via de comunicação entre a injúria celular, o reconhecimento do agente estranho ao organismo e o desenvolvimento de sinais e sintomas locais e/ou sistêmicos da inflamação, tais como: migração celular, edema, febre e hiperalgisia. (Dinarello e cols., 1986; Ferreira e cols., 1988; Faccioli e cols., 1990 e Dinarello, 1991).

Citocinas são proteínas produzidas por uma variedade de células, geralmente de tamanho pequeno (5-30kDa). Algumas são glicoproteínas e outras são sintetizadas na forma de precursor sendo necessário clivagem para tornarem-se ativas. As citocinas possuem papel essencial no controle da proliferação celular, no desenvolvimento embrionário e regulam as respostas imunes contra agentes patogênicos ou nocivos. São importantes no desenvolvimento da imunidade humoral

e celular e nas respostas inflamatórias. (para revisão ver Vane e Botting, 1987; Robbins e cols., 1994; Poole e cols., 1999)

Alguns estudos demonstram que as citocinas liberadas no processo inflamatório, são interleucina 1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral alfa e beta ($TNF\alpha$ e β), interleucina-8 (IL-8) (Tracey e Cerami, 1993) e interleucina 6 (IL-6) (Cunha e cols., 1992a), Fator de crescimento neuronal (NGF) (Schuligoi, 1998; Safieh-Garabedian e cols., 2000), Vários estudos tem sido realizados, procurando elucidar o papel destas e de outras citocinas na dor inflamatória (Westwick, 1989). Estudos iniciais com IL-1, descreveram duas proteínas inflamatórias, interleucina-1-alfa ($IL-1\alpha$) e interleucina-1-beta ($IL-1\beta$), produzidas por ativação de macrófagos (March, 1985). Confirmando os dados de Dinarello (1984), que sugere que a $IL-1\beta$ induz a produção de prostaglandina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, Ferreira e cols. (1988), demonstraram que a $IL-1\beta$ causa hiperalgesia, e inibidores de COX (indometacina) demonstraram que o efeito hiperalgésico da $IL-1\beta$ é depende da síntese de prostaglandinas (figura 2).

Posteriormente, foi demonstrada a participação da Interleucina-6 (IL-6) no processo hiperalgésico induzido por carragenina ou LPS em patas de ratos. Nesses estudos, Cunha e cols. (1992a), demonstraram que a hiperalgesia pode ser induzida com administração de IL-6 em patas de ratos. Esta hiperalgesia é bloqueada com o pré-tratamento com o antisoro anti-IL1 ou com anti-inflamatórios não-esteróidais (AINEs). Estes resultados sugerem que a hiperalgesia induzida por IL-6 é dependente da liberação de $IL-1\beta$, a qual libera prostaglandinas, via ativação da COX_2 (Figura 2).

Cunha e cols. (1991), demonstraram que a interleucina-8 (IL-8) era liberada mediante um estímulo hiperalgésico como a carragenina, de modo semelhante ao que se verificava para a $IL-1\beta$. Porém esta hiperalgesia, quando induzida por IL-8, não era abolida pela pré administração de AINEs, mas sim com a administração de simpatolíticos (atenolol, propranolol e guanetidina) ou antisoro anti-IL-8. Estes dados sugeriam que a hiperalgesia induzida pela IL-8 envolve a participação de aminas simpatomiméticas, diferente da $IL-1\beta$ que envolve a participação de prostaglandinas (figura 2). Estes autores sugerem também que a liberação de IL-8 depende da ativação de macrófagos e de células endoteliais, e que essa liberação pode ser uma

03308511

forma de ligação ou comunicação humoral entre o tecido injuriado e a hiperalgesia mediada pelo sistema nervoso simpático.

Em outros estudos, Cunha e cols. (1992b), demonstraram a participação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), no processo hiperalgésico induzido por carragenina ou LPS, onde uma pequena dose de antisoro anti-TNF α , abole completamente a hiperalgesia induzida pela carragenina. Nestes mesmos estudos, demonstrou-se que o TNF- α induz hiperalgesia de forma dose-dependente, e esta hiperalgesia foi bloqueada de forma parcial pela prévia administração de indometacina ou atenolol. E a hiperalgesia foi praticamente abolida quando foram administradas simultaneamente estas duas drogas antes da administração do TNF- α , sugerindo que ambas as vias de indução de hiperalgesia (prostaglandinas e componente simpático) em patas de ratos, são dependentes da participação do TNF- α (figura 2). Esta hipótese foi reforçada, quando a hiperalgesia induzida pelo TNF- α foi atenuada com a prévia administração de antisoros anti-IL-1 α , anti-IL6 e anti-IL8, e obteve-se bloqueio total da hiperalgesia induzida pelo TNF- α , quando foi pré-administrado a associação dos antisoros. Portanto, TNF- α desempenha um papel primordial na cascata de liberação de citocinas pró inflamatórias, sendo ele o responsável pela liberação de IL-6 e IL-1 β levando a produção de prostaglandinas e também a liberação de IL-8 que induz a ativação do componente simpático. (Figura 2)

O sistema de cininas participa da gênese da resposta inflamatória. Através da ativação da pré-calecreína e formação da calecreína plasmática, que resulta na formação do nonapeptídeo, denominado bradicinina, que é agonista não seletivo de receptores B1 e B2. (Robbins e cols., 1994)

A bradicinina foi descoberta por Maurício Rocha e Silva e colaboradores em 1949, que descreveram que a tripsina e certos venenos de cobra agiam na globulina plasmática para produzirem uma substância que reduzia a pressão arterial e provocava contração intestinal de desenvolvimento lento, por isso a denominação bradicinina (palavras derivadas do grego = *bradys*, que significa "lento" e *kineina* que significa "mover") (Rocha e Silva e cols., 1949).

A bradicinina foi demonstrada como sendo um mediador de dor, quando detectou-se sua liberação imediata em processo de dor declarada em humanos

(Armstrong e cols., 1957). A bradicinina aumenta a permeabilidade vascular, causa relaxamento da musculatura lisa e participa do processo de gênese da dor, quando injetada subcutaneamente na pele. (Sicuteri e cols., 1965; Ferreira, 1972; Whalley e cols., 1987; Robbins, e cols., 1994)

Estudos de eletrofisiologia e comportamento tem relatado que a ação nociceptiva da bradicinina é resultado da ativação dos nociceptores de alto limiar, associados às fibras C. Estudos experimentais demonstraram um efeito mais demorado da bradicinina em instalar hiperalgisia, porém quando instalado este efeito perdura por muito tempo. (Steranka e cols., 1987; Costelo e Hargreaves, 1989; Fujiyoshi e cols., 1989)

Analisando a bradicinina como agente hiperalgésico, Ferreira e cols. (1993a, 1993b), demonstraram que a bradicinina, assim como a carragenina e o LPS, induziam hiperalgisia dose-dependente em patas de rato. A hiperalgisia induzida por baixas doses de LPS (0.5 a 2 μ g) ou pela carragenina era abolida com o prévio tratamento com o antagonista do receptor B2 da bradicinina, o HOE-140 (1 mg/kg), demonstrando que a bradicinina é liberada em processos hiperalgésicos induzidos por estas substâncias. A hiperalgisia induzida pela bradicinina é bloqueada pelo prévio tratamento com antisoro anti-TNF α . No entanto, a hiperalgisia induzida por altas doses de LPS (5 μ g), não é bloqueada nem com altas doses de HOE-140 (10 mg/kg), mas é sensível ao bloqueio por antisoro anti-TNF α , o que sugere uma interação direta de TNF α , sem a necessidade da liberação prévia de bradicinina (Figura 2).

Recentemente, Poole e cols. (1999), demonstraram que o agonista B1, DABK, hiperalgisia de forma semelhante à bradicinina, tanto em intensidade como induz duração do efeito hiperalgésico, e o antagonista de receptor B1, DALBK, bloqueia de forma significativa a hiperalgisia induzida não só pelo DABK, como pela bradicinina e pela carragenina. Porém em contraste com o HOE-140 (antagonista de receptor B2), que bloqueia as respostas hiperalgésicas tanto de altas quanto de pequenas doses de bradicinina, o antagonista de receptor B1, DALBK inibe somente a hiperalgisia induzida por altas doses de bradicinina. Isto sugere que pequenas doses de bradicinina ativam receptores B2 predominantemente, e que esta em altas doses ativa receptores B1 em adição aos receptores B2 que já foram ativados.

Portanto existe um papel predominante de receptores B2, mediando a hiperalgisia induzida por bradicinina e por outras substâncias nociceptivas que estimulam a liberação de bradicinina, como carragenina e LPS. Contudo, nestes mesmos estudos, os autores demonstram que a hiperalgisia induzida por altas doses de LPS (5 μ g), não é bloqueada nem com a associação dos antagonistas HOE-140 e DALBK. Estes dados corroboram com os resultados de Ferreira e cols. (1993 a, 1993b) que demonstraram que a ativação da cascata de citocinas hiperalgésicas torna-se independente da ativação de receptores B1 e B2, quando o estímulo hiperalgésico é de grande magnitude, como a administração de altas doses de LPS.

No contexto geral, a bradicinina precede a liberação de $TNF\alpha$, e este por sua vez ativa a liberação das duas vias de citocinas: a IL-6/IL-1 β e a IL-8, que por sua vez ativam os componentes de prostaglandina e simpático, respectivamente. A formação de prostaglandinas, é devida à indução da COX₂ pela IL-1 β , e a liberação de aminas simpatomiméticas é devida a estimulação dos neurônios adrenérgicos pela IL-8 (Figura 2).

Existem descritos na literatura outras substâncias como Substância P, CGRP, glutamato, aspartato, neuropeptídeo Y, fator de crescimento neural (NGF), peptídeo vasoativo intestinal (PIV), dentre outras que são capazes de ativar nociceptores. (Yashpal e Henry, 1992; Nahin e cols, 1994; Munglani e cols., 1995; Amann e cols., 1996; Neugebauer e cols., 1996; Watkins e cols., 1997; Schuligoi e Amann, 1998; McLeod e cols, 1999; McLeod e cols., 2000;)

1.10 Controle da Hiperalgisia Inflamatória

A idéia de controle da dor é bastante antiga dentro da espécie humana, e portanto é natural que o homem venha buscando analgésicos de ação central ou periférica, tais como o ópio e salicilatos. (Ferreira, 1993c)

Visto que são muitos os mediadores químicos envolvidos na gênese da dor inflamatória, também são muitas as drogas, utilizadas para prevenir e/ou controlá-la. O controle da hiperalgisia inflamatória pode ser realizada de duas formas: através de substâncias que previnem a hiperalgisia inflamatória, ou que causam a “down regulation” dos nociceptores quando o processo hiperalgésico já foi instalado.

As drogas que previnem a hiperalgesia são aquelas que impedem a liberação de mediadores químicos hiperalgésicos (Figura 2). Desta forma, relacionaremos algumas drogas que previnem a hiperalgesia.

1.10.1 Drogas que previnem a hiperalgesia

1.10.1.1 - Antinflamatórios não esteroidais

Através do esclarecimento do papel das prostaglandinas na dor inflamatória, foi possível demonstrar o mecanismo de ação de drogas do tipo da aspirina, considerados antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (Vane, 1971; Ferreira e cols., 1971; Ferreira, 1972; Ferreira e cols., 1978a e 1978c).

O mecanismo de ação dos antiinflamatórios acídicos não esteróides, foi descrita por Vane, em 1971, determinando assim, que estes inibiam a síntese de prostaglandinas. Este mecanismo de ação previne o desenvolvimento da hiperalgesia, ou seja, a sensibilização dos nociceptores por estímulos físicos ou químicos (Ferreira, 1972; Ferreira, 1982). Vários estudos (Ferreira e cols., 1971; Smith e Willis, 1971 e Vane, 1971). Demonstraram em diferentes protocolos experimentais *in vitro* e *in vivo* que a síntese das prostaglandinas era inibida por drogas do tipo da aspirina e indometacina.

Ferreira e cols. (1978a), demonstraram que ao induzir hiperalgesia em patas de rato com carragenina, esta era inibida de forma parcial pela prévia administração de salicilato (aspirina), derivado de indol (indometacina) e o paracetamol (acetaminofeno).

Definiu-se então que AINEs são drogas que inibem a ciclooxigenase, prevenindo a indução da hiperalgesia (Vane, 1971; Ferreira e cols., 1978a). As substâncias mais utilizadas são a aspirina, indometacina, meloxicam e paracetamol (figura 2).

O mecanismo de ação da aspirina e da indometacina pode ser diferenciado quanto ao sítio de ação destas drogas. A aspirina inativa a enzima COX por acetilação da serina 530, de forma irreversível e inespecífica (COX₁ e COX₂). Já a indometacina, compete com o substrato, ácido araquidônico, no sítio ativo da

enzima, mas sendo de forma parcialmente reversível e de forma inespecífica. (Kulmacz, 1989; Laneuville e cols., 1994)

Com a descoberta de uma segunda forma da enzima ciclooxigenase (COX₂) (Hemler e cols., 1976; Fu J-Y e cols., 1990; Masferrer e cols., 1990), tem-se procurado um AINE mais seletivo para esta segunda forma. A COX₂ é praticamente inexistente em tecido saudável, porém os níveis desta enzima durante a inflamação aumentam significativamente, ou seja, a expressão da isoforma é induzida através de lesão tecidual. Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) que é uma toxina bacteriana normalmente de *Echerichia coli*, presente em altas concentrações em infecções bacterianas, citocinas e fator de crescimento podem induzir COX₂, induzindo dor e migração celular (que possui caráter reparador). (Robbins e cols., 1994)

O meloxicam é um dos novos potentes AINEs que preferencialmente inibem a COX₂, e por isso apresenta menos efeitos lesivos gastrointestinais. (Engelhardt, 1994)

O paracetamol e a dipirona são mais potentes no cérebro, em relação a síntese de prostaglandinas, do que em outros tecidos (Flower e Vane, 1972; Dembiska-Kiec e cols., 1976), demonstrando um poder antipirético e analgésico intenso, e pouco efeito inibitório sobre o edema ou o eritema.

O paracetamol é amplamente utilizado na clínica, para reverter o quadro de dor moderada. Contudo, o paracetamol apesar de ser um excelente analgésico, vários estudos tem demonstrado seu efeito hepatotóxico com altas dosagens. (Clissold, 1986; Eschaliere e cols., 1994)

1.10.1. 2 - Drogas simpatolíticas

Vários estudos demonstram a participação de um componente simpatomimético na nocicepção inflamatória em distintos protocolos experimentais (Coderre e cols., 1984; Nakamura e Ferreira, 1987; Duarte e cols., 1988).

Nakamura e Ferreira (1987) demonstraram que o efeito hiperalgésico de aminas simpatomiméticas é abolido através do pré-tratamento das patas de rato, com atenolol e propranolol (antagonistas de receptores β-adrenérgicos), com guanetidina administrada crônicamente (que gera depleção dos estoques de aminas

periféricamente) ou com o antagonista seletivo para receptor D_1 para dopamina, o SCH 23390.

1.10.1.3 - Inibidores da síntese e liberação de citocinas

Recentemente, tem sido demonstrado o modo de ação do nimesulide em modelo de hiperalgisia em pata de ratos. Demonstrando que o nimesulide é eficiente em abolir a hiperalgisia induzida pela carragenina, bradicinina e $TNF\alpha$, e nenhum efeito na hiperalgisia induzida pelas prostaglandinas IL-1 β e IL-8, sugerindo que o nimesulide atua inibindo a liberação de citocinas, semelhantemente aos corticóides. (Ferreira, 1993c)

Os corticosteróides, possuem efeito analgésico e anti-inflamatório por inibirem a atividade da fosfolipase A_2 , que conseqüentemente reduz a liberação do ácido araquidônico e produção de metabólitos da ciclooxigenase e lipooxigenase. Este efeito inibitório dos corticosteróides sobre a fosfolipase A_2 , é através de um mecanismo indireto de liberação de uma proteína inibitória, denominada lipocortina-1 (Vallner e cols., 1986; Flower e Rothwel, 1994). Além da produção de lipocortina 1, os corticosteróides inibem a síntese e liberação de citocinas, bem como inibem a síntese protéica da enzima ciclooxigenase (figura 2).

Ferreira e cols. (1997), demonstraram que o efeito hiperalgésico, em patas de ratos, induzido por carragenina, bradicinina, e citocinas como $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 foi inibido pela prévia administração de corticosteróides (dexametasona), porém este corticosteróide não inibiu a hiperalgisia induzida por IL-8, prostaglandina e dopamina. A resposta analgésica da dexametasona na hiperalgisia induzida por bradicinina e IL-1 β foi revertida pelo tratamento com o antisoro anti-lipocortina 1, e a administração de antisoro anti-lipocortina-1 ou da lipocortina-1 sintética não alteraram a hiperalgisia induzida pela prostaglandina, demonstrando que o produto da dexametasona, a lipocortina-1, somente inibe a síntese e liberação de citocinas e a indução de COX_2 . Em estudos *in vitro*, a lipocortina-1 aboliu a liberação de prostaglandina de macrófagos estimulados com LPS, demonstrando que a lipocortina-1 possui ação inibitória sobre as ciclooxigenases. Estes dados relatados

por Ferreira (1997) sugerem que a dexametasona atua via produção de lipocortina-1 que inibe a ativação da fosfolipase A_2 e da COX_2 na hiperalgesia inflamatória.

Além disso, outros estudos corroboram com a teoria que os corticosteróides inibem diretamente a síntese da COX, inibindo assim a síntese de prostaglandinas (Poole e cols., 1999). Outros estudos, sugerem outro mecanismo de ação analgésico para os corticóides, atuando em fibras C, alterando os níveis de limiar de excitabilidade da fibra. (Ahluwalia e cols., 1995)

A pentoxifilina (uma metilxantina que inibe as enzimas fosfodiesterases) tem sido usado amplamente na clínica, no processo terapêutico da dor e inflamação, da endotoxemia, (Zabel e cols., 1991) e no tratamento da artrite reumatóide (Dubost e cols., 1997).

A pentoxifilina utilizada experimentalmente tem sido descrita como um inibidor de $TNF\alpha$ e IL-1 derivado de neutrófilos, durante o processo de inflamação (Sullivan e cols., 1988) e inibidor de $TNF\alpha$ derivado de macrófagos (Striter e cols., 1988; Schandene e cols., 1992).

1.10.1.4 - Antagonistas de receptores B₂ da bradicinina

A bradicinina tem papel importante na cascata de mediadores inflamatórios nociceptivos, devido a ativação do $TNF\alpha$ (Figura 2). Vários estudos utilizando diferentes protocolos experimentais *in vivo* e *in vitro*, demonstraram a ação de um potente antagonista de receptor B₂ para bradicinina, o HOE-140. E utilizaram o HOE-140 para inibir a inflamação e a hiperalgesia experimental. (Varvrek e Stewart, 1985; Hock e cols., 1991; Heapy e cols., 1991; Beresford e Birch, 1992)

1.10.2 Drogas que revertem a hiperalgesia instalada

A dipirona (metamizol) é um potente analgésico e antitérmico, em trabalhos clínicos, tem-se relatado que a dipirona é mais potente que drogas AINEs, como a aspirina (Murkherjee e Sudha, 1980; Petrova e cols., 1980) ou o paracetamol (Daftary e cols., 1980)

Lorenzetti e Ferreira (1985), demonstraram que a dipirona bloqueia tanto o edema quanto a hiperalgisia induzida pela carragenina, em patas de ratos. E que este bloqueio ocorre de forma dose dependente, porém a dipirona para desencadear seu efeito antiedematogênico necessita de uma dose muito maior que a dose necessária para causar analgesia, bloqueando a hiperalgisia induzida pela carragenina. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que a dipirona, é capaz de reverter o quadro de hiperalgisia instalado por prostaglandina E₂ (PGE₂), isoprenalina e cálcio, diferentemente da indometacina que não reverte a hiperalgisia induzida por estes estímulos. Estes dados sugerem que a dipirona possui um mecanismo de ação diferente dos clássicos AINEs, atuando de forma efetiva, como analgésico em quadro de hiperalgisia instalada, causando a down regulation do nociceptor.

Estudos realizados por Duarte e cols. em 1990, demonstraram que o MY5445 (um seletivo inibidor da Guanosina Monofosfato cíclico fosfodiesterase), o nitroprussiato de sódio (doador de NO) e a ACh são capazes de reverter o quadro de hiperalgisia induzido por PGE₂, e esta analgesia gerada por estas substâncias foi abolida pelo prévio tratamento com N^G-monometil-L-arginina (LNMMA, um inibidor da enzima de biossíntese de óxido nítrico) ou Azul de metileno (AzM, um inibidor da enzima Guanilato Ciclase ativada via óxido nítrico). Sugerindo a participação da Guanilato ciclase/GMPc como analgésico, na hiperalgisia instalada pela prostaglandina.

Posteriormente, estudos realizados por Duarte e cols. (1992), demonstraram que a dipirona administrada intraplantar é capaz de reverter a hiperalgisia induzida por baixas doses de Db-AMPC, mas é ineficiente quando o Db-AMPC é administrado em altas doses.

Na associação de MY5445 com dipirona, o MY5445 potencia o efeito analgésico da dipirona sobre a hiperalgisia induzida por Db-AMPC. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o pré-tratamento com LNMMA ou Azul de metileno, são capazes de abolir o efeito da dipirona em reverter a hiperalgisia induzida por PGE₂.

Todos estes dados sugerem primeiramente que a hiperalgisia ocorre devido a um aumento da AMPC intracelular, e que drogas que aumentam a concentração de

Guanilato Monofosfato cíclico (GMPc), são capazes de causar a down regulation do nociceptor. E nos estudos realizados por Duarte e cols. (1992) sugere-se que a dipirona atua no nociceptor via liberação de óxido nítrico (NO), que por sua vez ativa a enzima Guanilato Ciclase a produzir GMPc, esta conclusão se deve ao fato de que drogas como LNMMA e AzM, foram capazes de abolir a resposta analgésica da dipirona em quadros de dor instalada.

Estudos realizados posteriormente por Lorenzetti e Ferreira (1996) demonstraram que a dipirona administrada intraplantar e intratecal revertem o quadro de hiperalgisia induzida por administração intraplantar de PGE₂, e que a associação de uma pequena dose de dipirona administradas intratecal e intraplantarmente, abole o efeito hiperalgésico da PGE₂ intraplantar. Neste mesmo estudo, os autores demonstram que o efeito analgésico da dipirona (sistêmica, intraplantar ou intratecal), sobre a hiperalgisia induzida pela PGE₂ foi abolida pela prévia administração de LNMMA e AzM. Estes dados sugerem que o efeito analgésico da dipirona é atuando em nível espinhal e periférico, através da estimulação da via arginina/GMPc no neurônio sensorial primário aferente.

Em estudos relacionando a potência dos AINEs, através de medidas de inibição da enzima COX₂/ COX₁, o diclofenaco tem se destacado como um potente agente anti-inflamatório. Agindo preferencialmente sobre a enzima COX₂, diferenciando do efeito anti-inflamatório da aspirina e da indometacina, que agem de forma inespecífica. (Mitchell e cols., 1993; Meade e cols., 1993).

Alguns estudos, tem sugerido um possível mecanismo de ação para o diclofenaco, além da inibição da enzima COX. Tonussi e Ferreira (1994), demonstraram que diclofenaco reverte a hiperalgisia induzida pela administração de carragenina e este efeito analgésico se dá de forma dose-dependente, diferenciando-se da indometacina que não reverte de forma dose dependente o quadro de dor instalado pela carragenina. O diclofenaco também demonstrou-se eficiente em reverter a hiperalgisia induzida pela administração de PGE₂, e ainda, a prévia administração de LNMMA e AzM foram capazes de abolir a resposta analgésica do diclofenaco no quadro de dor instalada pela PGE₂, sugerindo que de forma semelhante à dipirona, o diclofenaco também causa a "down regulation" do nociceptor por ativar a via arginina/NO/GMPc. Nestes mesmos estudos, os autores

demonstraram que antagonistas inespecíficos opióides, como naloxona e N-metilnalorfina, não são capazes de abolir a resposta do diclofenaco, sugerindo que seu efeito analgésico é independente da liberação de opióides de tanto de origem central quanto periférica.

Outros estudos, realizados por Rocha e Lorenzetti (1997), demonstram que o diclofenaco inibe de forma dose-dependente a hiperalgisia induzida por prostaglandina (i.pl.), e é eficiente em reverter quadros de hiperalgisia instalada. O efeito analgésico obtido pela administração (i.pl.) do diclofenaco após a indução da hiperalgisia com prostaglandina (i.pl.) é revertido pela prévia administração de LNMMA ou AzM. O mesmo estudo demonstram ainda que administração intratecal (it.) de diclofenaco é capaz de abolir a hiperalgisia induzida por prostaglandina (i.pl.), e da mesma forma o efeito analgésico do diclofenaco é revertido pela prévia administração de AzM ou LNMMA. Porém o diclofenaco administrado sistemicamente (ip.), não apresenta nenhuma ação analgésica em teste de Tail flick, o que sugere que o diclofenaco não possui ação analgésica central. Estes dados corroboram resultados obtidos por Tonussi e Ferreira (1994).

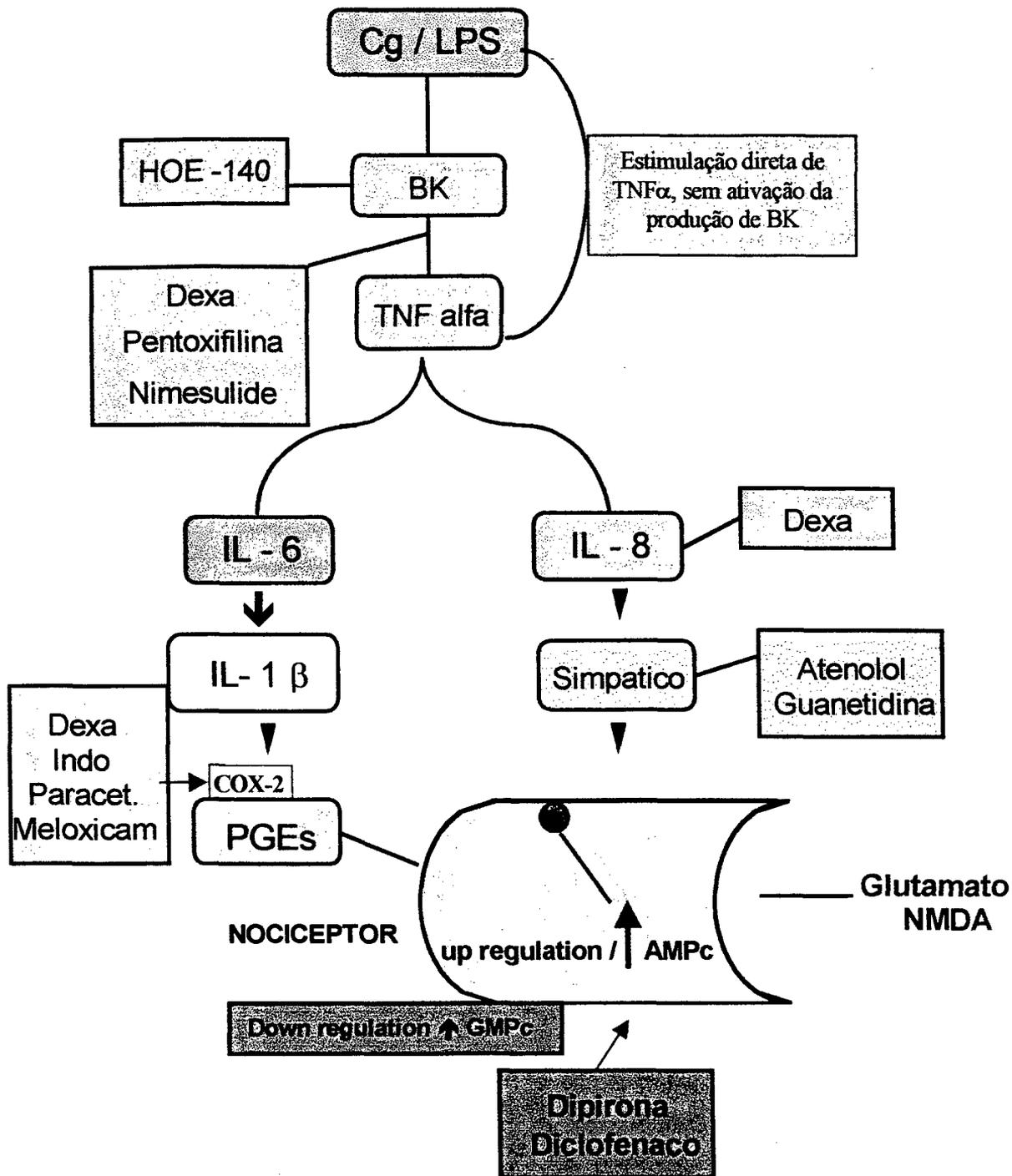


Figura 2- Cascata de liberação de mediadores que participam na gênese da dor inflamatória e controle terapêutico da mesma. Cg = carragenina e LPS= Lipopolissacarideo de E. coli (estímulos injuriantes) . BK = bradicinina; TNF alfa = Fator de Necrose Tumoral alfa; IL-1 β = Interleucina-1-beta; IL-8 = Interleucina-8; IL-6 = Interleucina-6; PGEs = prostaglandinas; DEXA = dexametasona; HOE-140 = antagonista de receptores de BK do tipo B2; Indo = indometacina; Paracet. = paracetamol, AMPc = Adenosina Monofosfato cíclico e GMPc = Guanina monofosfato cíclico

2 - OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Devido ao fato de existirem muitos relatos de que indivíduos picados pelo *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo) apresentam dor intensa no local da picada, e também fortes dores abdominais, o presente estudo tem como objetivo geral verificar se o veneno bruto induz hiperalgesia em patas de rato, e se induzir hiperalgesia verificar os possíveis mediadores envolvidos neste quadro hiperalgésico, e propor uma terapêutica com analgésicos para o alívio da dor intensa relatada por pacientes picados.

2.2 Objetivos específicos

- 1- verificar se o veneno induz hiperalgesia em pata de ratos, utilizando o método de Randall-Selitto modificado (Ferreira e cols., 1978). Com este intuito analisaremos se o mesmo produz este efeito de forma dose dependente e em diferentes tempos. Através deste protocolo, se o veneno induzir hiperalgesia em pata de ratos, analisaremos o tempo e dose, que serão utilizados em todos os protocolos experimentais restantes.
- 2- determinar a participação de prostaglandinas na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, verificando se drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) como o meloxicam e a indometacina são capazes de inibir a hiperalgesia induzida pelo veneno.

- 3- determinar a participação de componentes simpatomiméticos na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, verificando se drogas simpatolíticas como o atenolol e a guanetidina são capazes de inibir a hiperalgesia induzida pelo veneno.
- 4- verificar se associação de inibidores da síntese de prostaglandinas (AINEs) e de simpatolíticos (atenolol e guanetidina) apresentam sinergismo inibitório na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.
- 5- verificar se ocorre a liberação de citocinas na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, utilizando drogas que inibem a liberação de citocinas tais como: dexametasona, nimesulide e pentoxifilina.
- 6- verificar se ocorre a liberação de bradicinina na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, utilizando o antagonista de receptor B2 para bradicinina, o HOE-140.
- 7- verificar se drogas do tipo NO/GMPc dependentes são eficazes em inibir a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.
- 8- verificar se o paracetamol inibe a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.
- 9- investigar a participação de leucotrienos na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, através da prévia administração de MK888 que inibe a enzima lipooxigenase.
- 10- investigar a participação de histamina na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, através da prévia administração de meclisina (anti-histamínico) e através do tratamento crônico com o composto 48/80 que depleta os estoques de histamina de mastócitos.

- 11- avaliar, através do método de ELISA se o veneno bruto de *Tityus serrulatus* induz a liberação de citocinas como IL-1 β e TNF- α .
- 12- propor, por meio de diversos analgésicos e anti-inflamatórios que serão utilizados neste trabalho, uma terapêutica no intuito de alívio e/ou bloqueio da dor relatada por indivíduos picados por *Tityus serrulatus*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados, em todos os experimentos, foram ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180 a 200 gramas.

Estes animais provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, permaneceram com água e ração à vontade, com ciclo de claro e escuro (12 horas) e em temperatura constante (21-22°C).

Quarenta e oito horas antes de cada sessão experimental, os animais foram transportados cuidadosamente para o laboratório no departamento de Farmacologia, para aclimação. No laboratório, os animais foram agrupados homogeneamente quanto ao peso, preservando-se as condições do biotério quanto à alimentação, água, temperatura e ciclos de luz.

3.2 DROGAS:

As drogas utilizadas nos experimentos, foram cedidas pelo professor Dr. Sérgio Henrique Ferreira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo (FMRP-USP).

A lista das drogas utilizadas com seus respectivos diluentes está representada na tabela 5.

Tabela 5: Lista de drogas e diluentes utilizados neste trabalho

DROGAS	DILUENTES
Atenolol (Sigma, USA)	salina 0,9%
Azul de metileno (Sigma, USA)	salina 0,9%
composto 48/80 (Sigma, USA)	salina 0,9%
dexametasona (Merck-Sharp, Suíça)	salina 0,9%
dextrana (Sigma, USA)	salina 0,9%
diclofenaco sódico (Ciba-Geigy, Suíça)	salina 0,9%
dipirona (Hoechst, Brasil)	salina 0,9%
guanetidina (Ciba-Geigy - Suíça)	salina 0,9%
HOE-140 (D-arg { Hyp ³ - Thi ⁵ - Dllc ⁷ -Oic ⁸ } BK) (Hoescht, Alemanha)	salina 0,9%
Indometacina (Merck - Sharp & Dohme, USA)	tampão TRIS, pH=7,8
LNMMMA (acetato de N ^G – monometil - L arginina) (Sigma, USA)	salina 0,9%
meclisina (Sigma, USA)	cremofor 10%, salina 0,9%
meloxicam (Hoechst, Brasil)	tampão TRIS, pH=7,8
MK886 (Merck-Sharp & Dohme, USA)	salina 0,9%
nimesulida (Schering-Plough)	salina 0,9%
paracetamol (Sigma, USA)	salina 0,9%
pentoxifilina (Sigma, USA)	salina 0,9%
SNAP (S - nitroso - N - acetil - D, L –penicilamina) (Sigma, USA)	salina 0,9%

Para a diluição do veneno foi utilizada a solução tampão fosfato (PBS 10%), que descrita abaixo, como foi realizada a solução-mãe (concentrada).

Solução tampão fosfato - PBS

Para o preparo da solução-mãe de PBS, foram utilizados os seguintes sais:

- a) 80 g de NaCl
- b) 2 g de KCl
- c) 11,5 g de Na₂HPO₄
- d) 2 g de KH₂PO₄

Os sais foram misturados em uma proveta e diluídos em um litro de água MilliQ (água bi-destilada e deionizada). Em seguida, a solução-mãe foi alíquotada e acondicionada em frascos de 250 mililitros (ml), que foram autoclavados.

Antes do início de cada experimento a solução-mãe de PBS era diluída 1:10 em água MilliQ estéril (PBS 10%), para solubilizar o veneno liofilizado.

3.3 VENENO

O veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, utilizado nestes protocolos experimentais foi cedido pelo Professor Carlos Cháves-Olortégui, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais. O veneno enviado pela FUNED na forma liofilizada e mantido em freezer (-20°C).

3.4 MÉTODO DE RANDALL-SELITTO MODIFICADO:

Esta metodologia corresponde a uma modificação da técnica de Randall-Selitto (1957), realizada por Ferreira e cols., 1978a.

DESCRIÇÃO DO APARELHO UTILIZADO PARA MEDIR A HIPERALGESIA

O esquema do aparelho utilizado para medir a hiperalgisia está representado na figura 3a.

O rato é colocado sobre a plataforma (PL) e a sua pata traseira (direita ou esquerda) posicionada entre a plataforma e a barra (B). A pressão no êmbolo (E) é estabelecida através de uma válvula solenóide (VS) que possui duas posições: a posição 1 que está aberta e na qual o ar, proveniente do compressor (C) é continuamente deixado escapar; e a posição 2 que permanece fechada se o pedal não for acionado.

Quando o pedal (P) é acionado pelo experimentador a válvula de solenóide é acionada, fechando a saída de ar 1 e ao mesmo tempo a saída de ar 2 é aberta. Dessa forma quando o ar é dirigido na posição 2, ocorre uma pressão no êmbolo,

que pressiona a pata do rato. A válvula de escape (V) mantém a pressão constante em 20 mmHg, e é aferida por um manômetro (M). O pedal (P), quando acionado, ativa simultaneamente um cronômetro digital (CR), que mede o tempo em segundos.

O êmbolo que comprime a pata do rato possui uma superfície plana de aproximadamente 1,7 cm de diâmetro. O cronômetro mede o tempo a partir do momento em que o êmbolo se encontra em contato com a pata do rato até o momento em que o animal apresenta a reação nociceptiva, adotada como critério de medida (tempo de reação em segundos). No momento que o animal apresenta a reação nociceptiva, o experimentador imediatamente desativa o pedal, sendo assim interrompida a pressão na pata do rato.

O animal é segurado pelo experimentador sobre a plataforma, colocando-se uma das patas posteriores na cavidade entre a barra e o êmbolo.

Ao acionar-se o pedal, o êmbolo é deslocado em direção a pata traseira do animal, exercendo uma pressão constante de 20 mmHg. O pedal está ligado simultaneamente a um cronômetro. Inicialmente o animal apresenta um quadro de respostas facilmente observado, caracterizado por movimentos intensos da cabeça, enrijecimento do corpo tentando erguê-lo, sendo que a cauda fica enrijecida na posição que tende a ser vertical. Os pêlos tendem a ficar eriçados e o animal nessa reação de fuga tenta escapar da mão do experimentador.

A seguir observa-se uma reação comportamental composta por uma diminuição da reação de fuga, seguida de uma alteração da frequência respiratória, fasciculações da musculatura do dorso, um relaxamento da cauda e, algumas vezes, deslocamento muito discreto em direção à pata. Neste momento o experimentador para imediatamente de pressionar o pedal. E anota o tempo correspondente à latência para a resposta nociceptiva.

A figura 3b explica como realizar o cálculo da intensidade de hiperalgesia, na metodologia utilizada, usando prostaglandina como exemplo hiperalgésico.

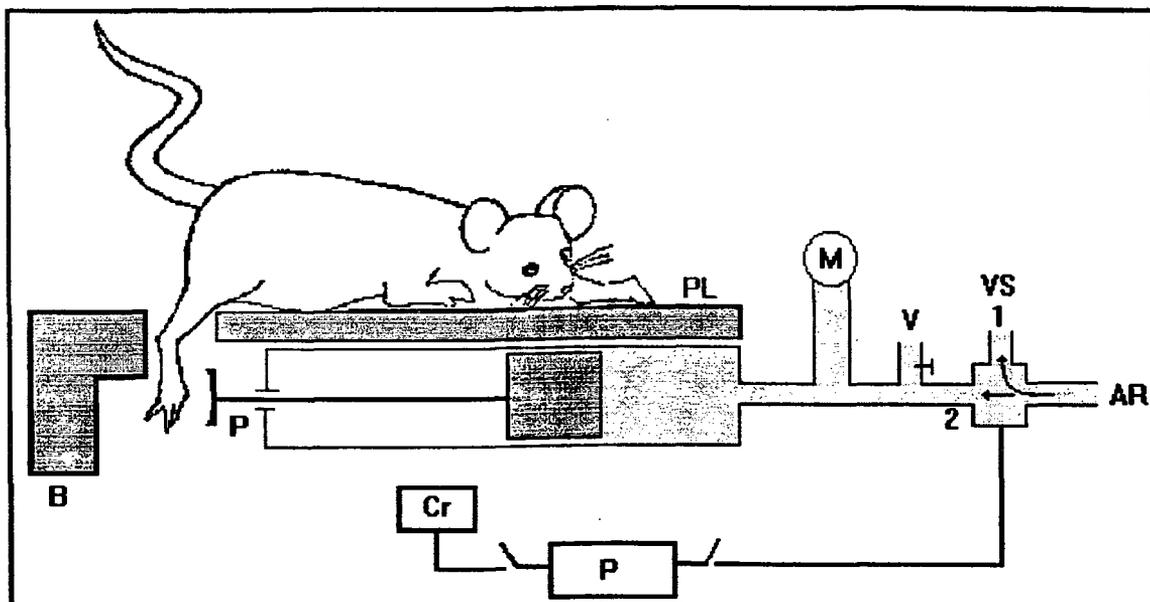


Figura 3a - Diagrama do aparelho utilizado para a medida de hiperalgesia. O rato é colocado sobre uma plataforma (PL) e sua pata posicionada entre o embolo (E) e a barra (B). O ar é pressionado constantemente dentro do sistema, mas uma válvula solenóide (VS) o direciona no sentido indicado pelo número 1. O pedal (P) ativa simultaneamente um cronômetro (CR) e a válvula de solenóide, dirigindo o fluxo de ar para dentro da seringa de teflon (direção 2), empurrando o embolo (E) em direção a pata do rato. A válvula de escape (V) mantém a pressão constante, a qual é mensurada por um manômetro (M).

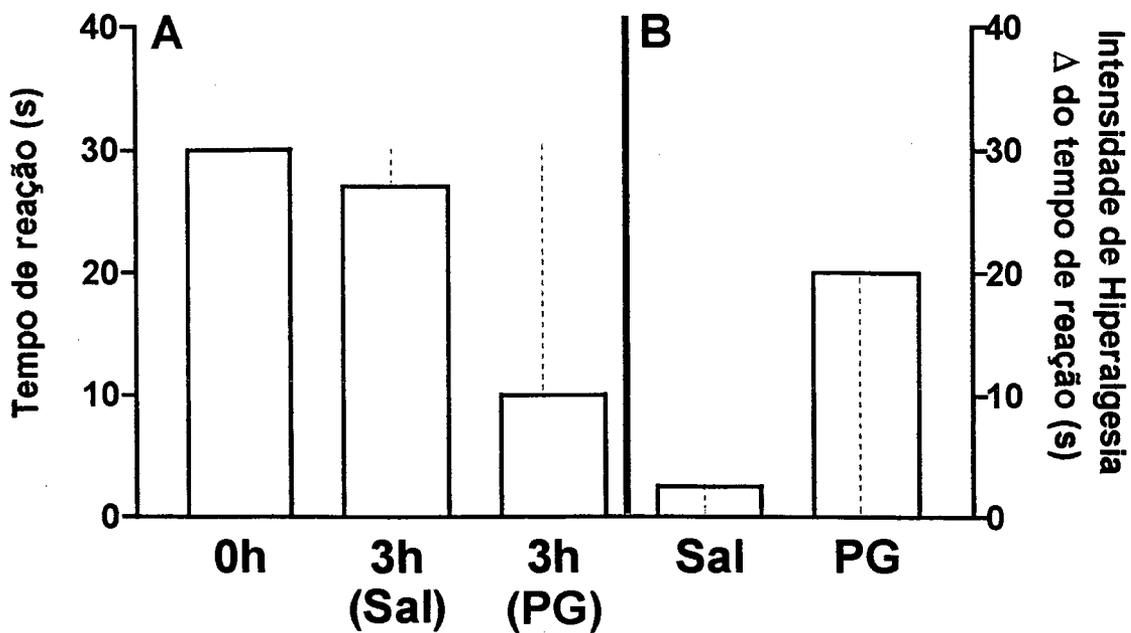


Figura 3b: Gráfico explicativo do cálculo da intensidade de hiperalgesia na metodologia utilizada. Painel A demonstra o tempo em segundos, que o animal leva para apresentar reação correspondente à latência para a resposta nociceptiva, sem receber nenhum estímulo hiperalgésico na pata, determinado como zero hora (0h). Após a medida de zero hora os animais receberam salina (Sal) intraplantar ou prostaglandina (PGE₂, 100 ng/i.pl.), e 3 horas após a administração destas drogas, o animal foi submetido novamente ao teste de hiperalgesia, onde verifica-se que o animal que recebeu salina apresenta um tempo de reação semelhante ao tempo de reação na zero hora, porém o animal que recebeu PG, após 3 horas da administração, o tempo de reação para a resposta nociceptiva diminui. **Painel B:** Demonstra o cálculo para a variação do tempo de reação em segundo, que é determinado como Intensidade de hiperalgesia. As linhas pontilhadas correspondem ao tempo de zero hora menos o tempo de reação 3 horas após o estímulo injetado intraplantarmente.

3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS EM PATAS DE RATOS

A metodologia para a dosagem de citocinas em pele de patas de ratos é descrita em GARABEDIAN e cols.,1995. Resumidamente, amostras de pele da região plantar de ratos foram obtidas e homogeneizadas em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo: 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0.5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1mM de fluoreto de fenil- metil- sulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI ml⁻¹ aprotinina (Sigma). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 RPM/ 10min) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de TNF α e IL-1 β por ELISA (enzyme-linked immunoassay). Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas por toda a noite a 4°C com anticorpos contra TNF α e IL-1 β de rato (10 μ g/ml). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas e incubadas a 4°C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinizados contra TNF α e IL-1 β de rato, diluídos 1/2.000 foram adicionados (100 μ l/poço). Após uma incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 100 μ l de avidina-HRP diluídas 1:5000 foi adicionada. Em seguida (quinze minutos após), 100 μ l do reagente colorido (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma USA) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1M e as absorbâncias foram determinadas em 490 nM.

3.6 DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS EM PATA DE RATOS

DI ROSA e cols., (1971) descreveram a capacidade do composto 48/80 em depletar o conteúdo granular de histamina dos mastócitos. CUNHA e cols., 1999, utilizando o composto 48/80 descreveram a eficácia do mesmo em depletar histamina dos mastócitos em patas de ratos após tratamento crônico. Dessa maneira, o composto 48/80 foi administrado diariamente pela via intraplantar, em

volume de 50µl, durante quatro dias, nas doses de 1µg/pata (primeiro dia), 3µg/pata (segundo dia) ou 10µg/pata (terceiro e quarto dias).

O protocolo utilizando o composto 48/80 foi realizado com o intuito de verificar se após a depleção de histamina dos mastócitos, o veneno bruto de *Tityus serrulatus* seria eficaz em induzir hiperalgesia.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM) de pelo menos 5 animais por grupo. A análise das curvas obtidas foi feita por análise de variância (ANOVA). Quando esta análise indicou diferenças entre as curvas, os diferentes tratamentos foram avaliados por análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY) seguida por teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. Resultados foram considerados significativos, onde utilizamos asterisco (*) para caracterizar esta diferença. As diferenças citadas neste trabalho são para $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,0001$.

4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 Hiperalgisia induzida pela administração intraplantar do veneno bruto de *Tityus serrulatus*

O estudo para a determinação da atividade hiperalgésica do veneno bruto de *Tityus serrulatus* em ratos, foi realizado administrando-se diferentes doses do veneno, observando-se seu efeito cinético em diferentes tempos. Para tanto, administramos doses crescentes de veneno intraplantarmente (i.pl.) em patas traseiras de ratos, e realizamos as medidas de hiperalgisia em diferentes tempos até observarmos o declínio da intensidade de hiperalgisia.

Este protocolo experimental teve o intuito de determinar a dose e o tempo ideal das medidas de hiperalgisia, para os protocolos experimentais subsequentes. Desta forma realizamos o experimento utilizando um grupo controle, que recebeu PBS 10% (C, 100 μ l/pata), que foi utilizado para diluir o veneno. Os demais grupos foram tratados com doses crescentes de veneno (0,312 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 ; 5,0 e 10,0 μ g/pata), e em um volume constante estabelecido (100 μ l). As medidas de hiperalgisia foram realizadas em diferentes tempos após a injeção do veneno: 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Os dados apresentados na figura 4, demonstram que o veneno não induziu hiperalgisia na 1ª hora após a sua administração, com exceção da dose máxima de 10 μ g/pata. Todavia, na 3ª hora após a administração do veneno, verificamos que as doses de 2,5; 5,0 e 10 μ g/pata, causaram hiperalgisia significativamente diferente das doses menores que 2,5 μ g/pata. As doses de 5,0 e 10 μ g/pata atingiram um platô hiperalgésico a partir da 3ª hora, e este permaneceu por pelo menos 48 horas após a injeção do veneno. Na dose de 10 μ g/pata a intensidade de hiperalgisia começou a diminuir somente a partir de 96 horas após a administração do veneno. A dose de 2,5 μ g/pata de veneno causou uma hiperalgisia que entra em declínio a partir da 11ª hora, e que é abolida 24 horas após a administração do mesmo. A dose de 1,25 μ g/pata do veneno, apresentou uma atividade hiperalgésica relevante na

7^a hora após a sua administração, entrando em declínio na 9^a hora. Com as menores doses (0,312 e 0,625 $\mu\text{g/pata}$), observamos que o efeito hiperalgésico não foi relevante.

Ao analisarmos os resultados da figura 4, observamos que o pico hiperalgésico do veneno ocorreu entre a 3^a e 6^a hora, para todas as doses utilizadas. Desta forma analisando as diferentes doses utilizadas, verificamos que a hiperalgesia induzida pelas mesmas, três horas após a sua administração, foi significativamente diferente do grupo controle (figura 5). Entretanto, a dose de 1,25 $\mu\text{g/pata}$ ou menores que esta, difere estatisticamente da dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$. A dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$ não diferiu estatisticamente da dose de 5,0 $\mu\text{g/pata}$, mas diferiu estatisticamente da dose de 10 $\mu\text{g/pata}$. Baseando-se nestes dados, a dose de 2,5 μg de veneno bruto de *Tityus serrulatus*, avaliada 3 horas após a sua administração na pata, foi considerada uma dose submáxima e por nós escolhida como dose e tempo padrão para os protocolos experimentais subsequentes.

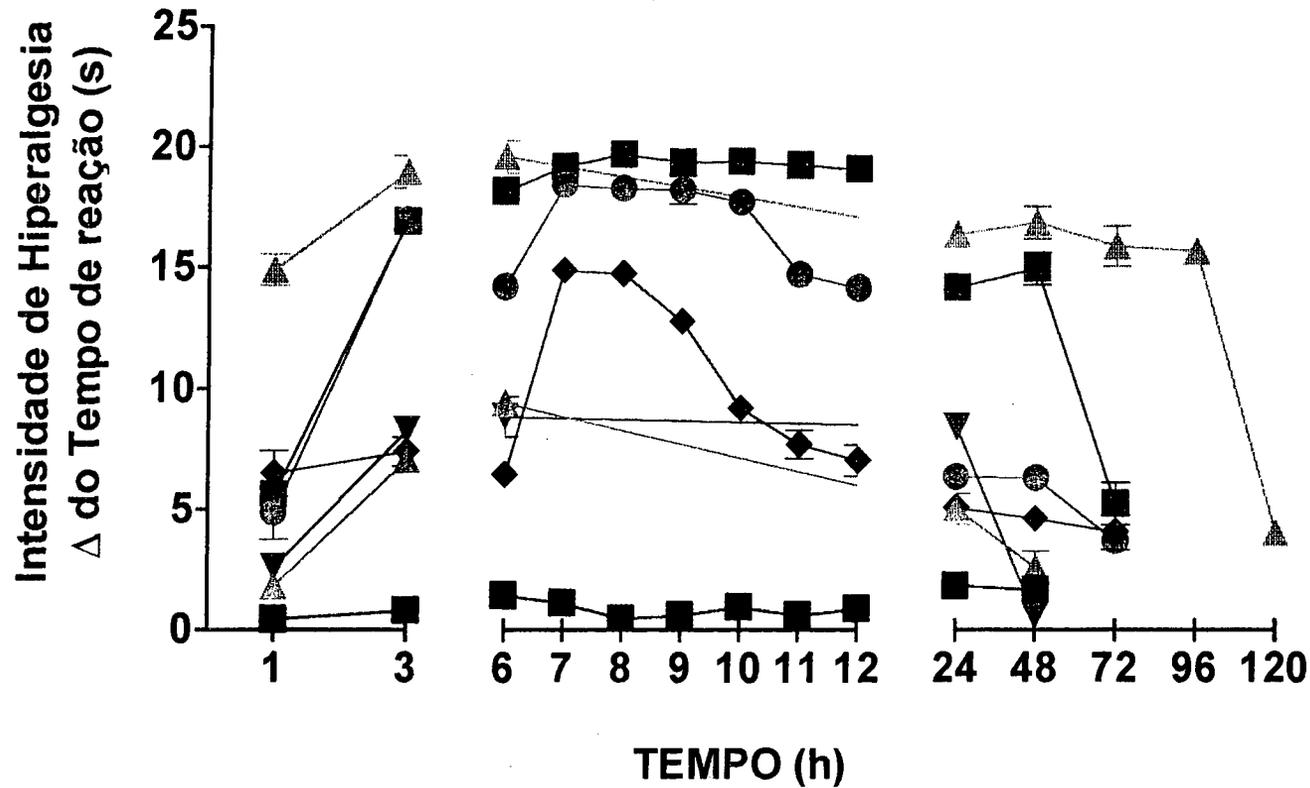


Fig. 4 – Tempo e dose-dependência do efeito hiperalgésico induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno de *Tityus serrulatus*. A figura demonstra o efeito hiperalgésico do veneno, administrado i.pl. em doses crescentes, num volume constante de 100 μ l: PBS 10% (■), 0,312 (▲), 0,625 (▼), 1,25 (◆), 2,5 (●), 5,0 (■) e 10 (▲) μ g/pata. As medidas de hiperalgesia foram realizadas de 1 até 120 horas após a injeção do veneno. Os dados referem-se à média da diferença (delta) do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. O teste estatístico realizado foi ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Para clareza da figura * foram suprimidos.

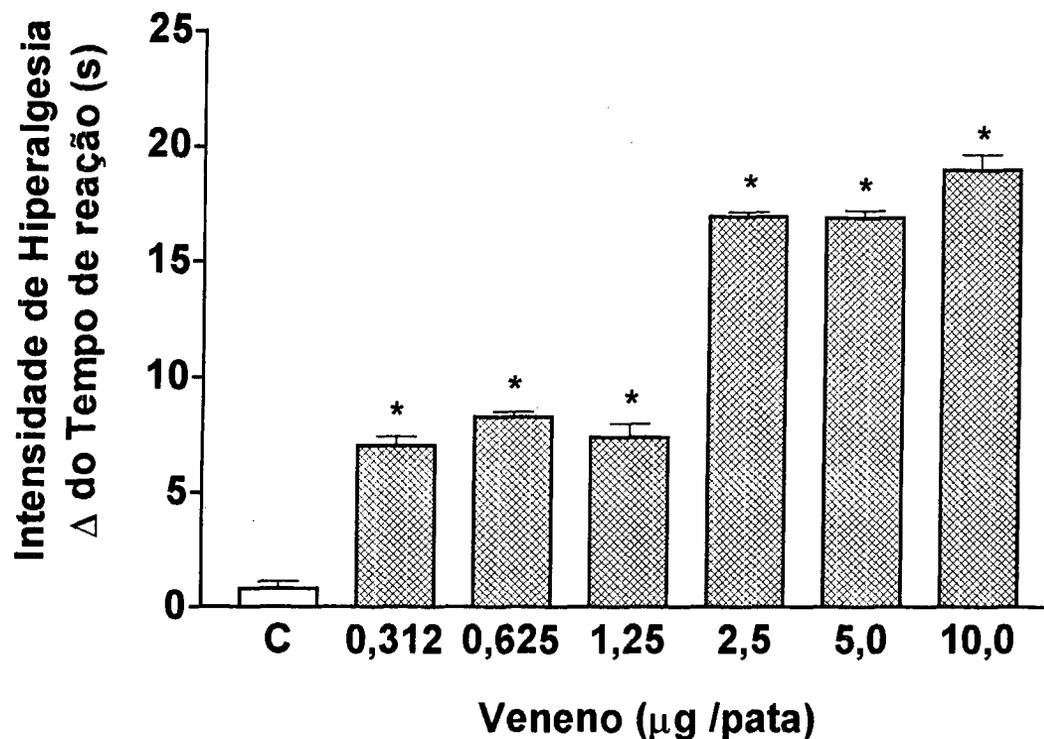


Fig. 5 - Efeito hiperalgésico dose dependente do veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Estes dados foram obtidos da figura 4, e referem-se à intensidade de hiperalgésia na 3ª hora após as injeções de doses crescentes de veneno. As colunas hachuradas representam as diferentes doses de veneno: 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 μg/pata em volume constante de 100 μl., e a coluna aberta representa o grupo controle (C, 100 μl de PBS). Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa estatisticamente diferente para $p < 0,001$.

4.2 Participação de prostaglandinas na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Para verificar se ocorria a presença de prostaglandinas, na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, utilizamos duas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), a indometacina e o meloxicam, sendo esta última mais seletiva em inibir a enzima ciclooxigenase do tipo 2.

Trinta minutos antes da administração do veneno, os diferentes grupos de animais foram tratados com doses crescentes de indometacina (25, 50, 100 e 200 µg/pata) ou com uma única dose sistêmica de 2 mg/kg, i.p.

O tratamento com o meloxicam também foi realizado trinta minutos antes da administração do veneno, em doses crescentes de 3, 9 e 27 mg/kg, i.p. O grupo controle (C) recebeu salina 1 ml.

Trinta minutos após estes tratamentos, os grupos receberam 2,5 µg/pata de veneno, na mesma pata previamente tratada com indometacina, meloxicam ou salina. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a injeção do veneno.

Os resultados apresentados na figura 6, demonstram que a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus* (2,5 µg/pata), foi inibida pelo pré-tratamento com indometacina, em todas as doses utilizadas, sendo essa inibição de 10, 19,7, 55,7, 73,33 e 57,33%, respectivamente.

Observamos na figura 7, que o meloxicam, da mesma forma que a indometacina, também foi efetivo em prevenir a hiperalgesia induzida pelo veneno em 47%, 24% e 63% nas respectivas doses crescentes (3, 9 e 27 mg/kg, i.p.).

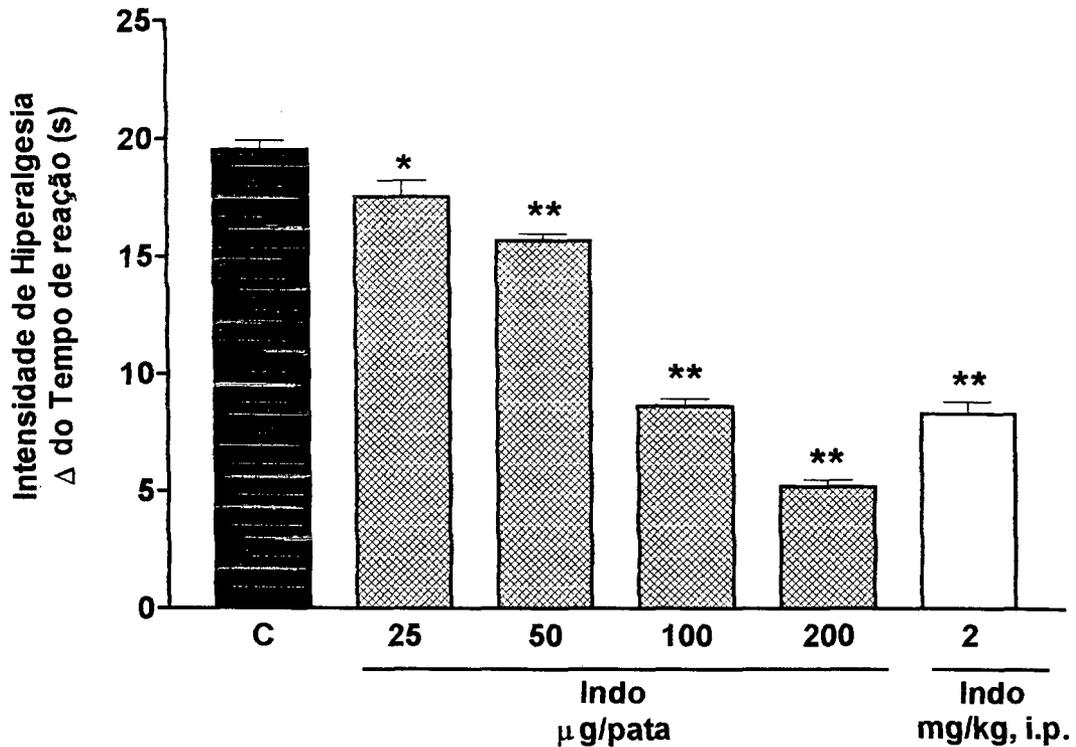


Fig. 6 - Efeito da indometacina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os diferentes grupos de animais foram tratados com indometacina (Indo) em doses crescentes (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/pata}$) ou Indo 2 mg/kg, ip.). O grupo controle (C), recebeu TRIS 100 $\mu\text{l/pata}$. Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam injeções de veneno bruto de *Tityus serrulatus* (2,5 $\mu\text{g/pata}$). As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,05$ e (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

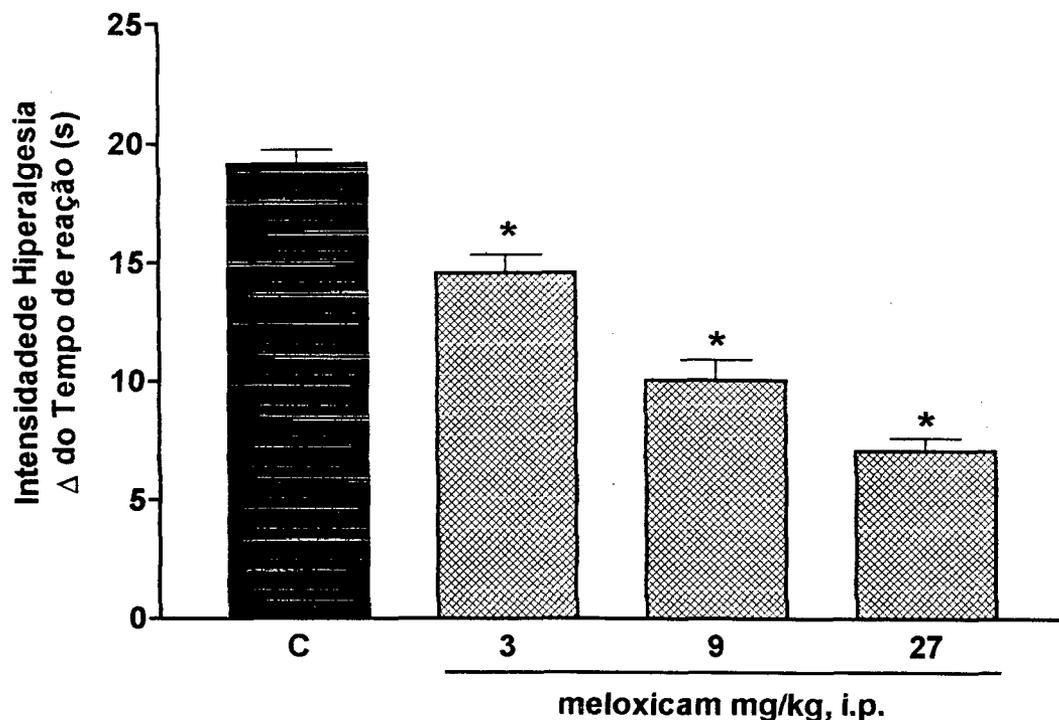


Fig. 7 - Efeito do meloxicam na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os diferentes grupos de animais foram tratados com meloxicam em doses crescentes de 3, 9 e 27 mg/kg, ip. O grupo controle (C), recebeu salina 100 μ l/pata. Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam injeções de veneno bruto de *Tityus serrulatus* (2,5 μ g/pata). As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.3 Participação de aminas simpatomiméticas na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Para verificar se ocorria a participação de aminas simpatomiméticas, na hiperalgesia induzida pelo veneno, utilizamos duas drogas, o atenolol (um β -bloqueador) e guanetidina que depleta os estoques neuronais adrenérgicos de aminas simpatomiméticas periféricamente. A hiperalgesia foi induzida através da administração intraplantar de veneno bruto de *T. serrulatus* (2,5 $\mu\text{g/pata}$).

Para executarmos este protocolo experimental, realizamos o tratamento crônico com guanetidina 30 mg/kg, via subcutânea (s.c.), em dois grupos de animais, durante três dias consecutivos, no intuito de depletar os terminais nervosos adrenérgicos de estoques de aminas simpatomiméticas.

No dia do experimento, realizamos tratamentos nos diferentes grupos de animais. Quatro grupos foram injetados com doses crescentes de atenolol (2,7; 8, 24 e 72 $\mu\text{g/pata}$), e nos dois grupos tratados com guanetidina, um recebeu salina (100 $\mu\text{l/pata}$) e o outro recebeu atenolol (24 $\mu\text{g/pata}$). O grupo controle (C) recebeu salina 100 $\mu\text{l/pata}$. Trinta minutos após os tratamentos, os grupos receberam 2,5 $\mu\text{g/pata}$ de veneno, na mesma pata previamente tratada com atenolol, guanetidina ou salina.

Os resultados apresentados na figura 8, demonstram que a hiperalgesia induzida pela administração i.pl. de veneno bruto de *Tityus serrulatus* (2,5 $\mu\text{g/pata}$), foi prevenida pelos tratamentos com atenolol, guanetidina e com associação de atenolol mais guanetidina de forma semelhante.

O atenolol em doses crescentes 2,7, 8, 24 e 72 $\mu\text{g/pata}$, inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno em 29%, 42,5%, 63,33% e 65% respectivamente. O tratamento com guanetidina (SAL) inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus* em 62,95%. A associação de guanetidina (administrada cronicamente) mais atenolol causou uma inibição de 58% da hiperalgesia induzida pelo veneno, sendo essa inibição semelhante ao efeito de cada substância (atenolol ou guanetidina) administrada isoladamente.

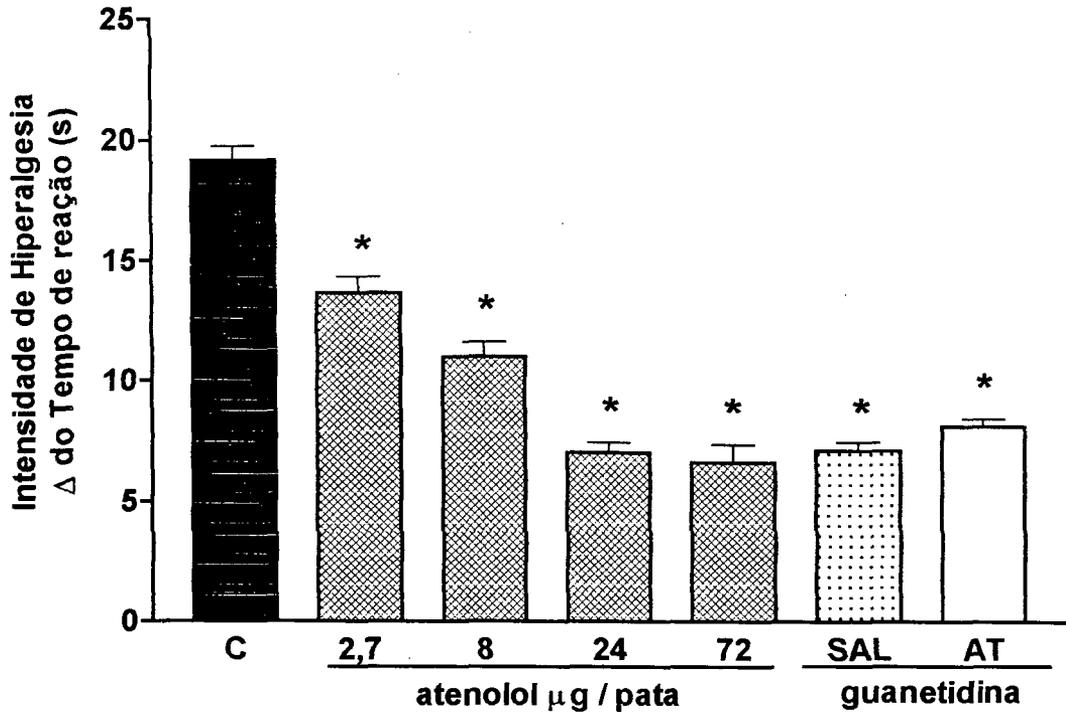


Fig. 8 - Efeito do atenolol e da guanetidina na hiperalgésia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os diferentes grupos animais receberam atenolol em doses crescentes (2,7 ; 8, 24 e 72 μg / pata) ou salina (100 μl /pata) para o grupo controle (C). Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam veneno 2,5 μg /pata. Outros dois grupos foram tratados durante 3 dias consecutivos com guanetidina 30 mg/kg, s.c., e trinta minutos antes da injeção do veneno, estes grupos receberam salina (SAL, 100 μl /pata) ou atenolol (AT, 24 μg /pata). As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno, para todos os grupos experimentais. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.4 Efeito da associação de inibidores da síntese de prostaglandinas e de simpatolíticos na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Conforme dados obtidos temos verificado a presença de prostaglandinas e de componente simpático na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Entretanto mesmo utilizando altas doses de substâncias AINEs ou simpatolíticas, não foi possível prevenir totalmente a hiperalgesia ocasionada pelo veneno. Assim, testamos o efeito da associação dos dois grupos de substâncias meloxicam com atenolol e meloxicam com guanetidina.

O protocolo experimental foi conduzido da seguinte forma: 3 grupos de animais foram tratados por 3 dias consecutivos com guanetidina 30 mg/kg, s.c. No dia do experimento, realizamos tratamentos associando: guanetidina (G, 30 mg/kg, s.c.) com meloxicam (27 mg/kg, i.p.) e guanetidina (G, 30 mg/kg, s.c.) com atenolol (AT, 24 µg/pata). Trinta minutos após os tratamentos, administramos injeção de veneno (2,5 µg/pata em todos grupos). As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração intraplantar do veneno nos diferentes grupos tratados.

Os resultados na figura 9, demonstram que ao associarmos os inibidores da síntese de prostaglandinas (meloxicam) e simpatolíticos (atenolol e guanetidina), prevenimos a hiperalgesia induzida pelo veneno. Os pré tratamentos realizados com meloxicam inibiu a hiperalgesia em 63%, com atenolol em 63,33% e com a guanetidina em 62,95%. Porém, quando associamos atenolol com meloxicam obtivemos uma inibição de 92,47%, e quando associamos guanetidina com meloxicam obtivemos uma inibição de 91,25%.

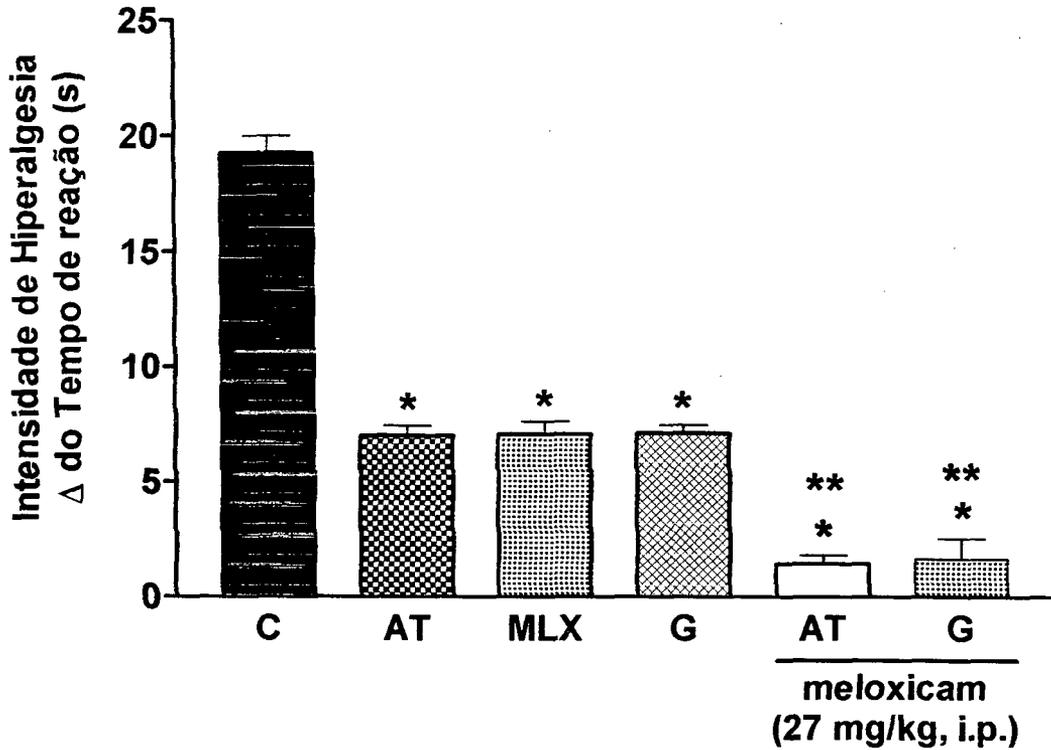


Fig. 9 - Efeito da associação de meloxicam com atenolol ou guanetidina na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os diferentes grupos, receberam os seguintes tratamentos: atenolol (AT, 24 μ g/pata), guanetidina (G, animais tratados com 30 mg/kg, sc., tratados por 3 dias consecutivos) ou meloxicam (MLX, 27 mg/kg, i.p.), e ainda, associações de meloxicam (27 mg/kg, i.p.) com atenolol (AT, 24 μ g/pata) ou com guanetidina (G). O grupo controle (C, recebeu salina 100 μ l/pata). Após trinta minutos dos tratamentos, todos os grupos receberam injeções de 2,5 μ g/pata de veneno. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$ dos tratamentos para o controle e onde () significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$ dos tratamentos para as associações.**

4.5 Participação de citocinas na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

A dexametasona é um glicocorticóide, considerado um anti-inflamatório esteroide, que entre outras ações, inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Para verificarmos se ocorria a participação de citocinas, realizamos tratamento com dexametasona em doses crescentes, administradas na pata de ratos. Ainda neste mesmo propósito, realizamos um experimento utilizando doses crescentes de nimesulida (inibidor da liberação de citocinas) e outro utilizando doses crescentes de pentoxifilina, para verificarmos se estes possuíam um efeito inibitório na hiperalgesia causada pelo veneno.

No experimento realizado com dexametasona, os animais foram pré tratados com dexametasona nas doses crescentes de 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/pata}$, e o grupo controle (C) recebeu salina 100 $\mu\text{l/pata}$. Sessenta minutos após os tratamentos, os grupos receberam 2,5 $\mu\text{g/pata}$ de veneno, na mesma pata previamente tratada com dexametasona ou salina. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

A figura 10, demonstra que o pré tratamento com dexametasona, causa uma prevenção da hiperalgesia nas suas diferentes doses 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/pata}$, sendo que a inibição da hiperalgesia foi de 27,47, 62,19, 84,17 e 86,26%, respectivamente. Verificamos que o efeito analgésico da dexametasona é dependente da dose, sendo observado a inibição da hiperalgesia já com a menor dose (1 $\mu\text{g/pata}$), observamos também que não há diferença estatística entre as doses de 10 e 30 $\mu\text{g/pata}$.

No experimento realizado com nimesulida, 12 horas antes do início do protocolo experimental, os grupos de animais, foram privados de ração, mantendo somente água à vontade (jejum de 12 hs). Realizamos os tratamentos nos diferentes grupos com doses crescentes de nimesulida (1, 3 e 10 mg/kg, 1ml/v.o.), e o grupo controle (C) recebeu salina 1ml/v.o. Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam a administração de veneno 2,5 $\mu\text{g/pata}$. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno nos grupos.

Os dados da figura 11, demonstram que o nimesulida, preveniu

significativamente a hiperalgesia causada pela administração do veneno. A prevenção da hiperalgesia para as doses de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/pata}$ de nimesulida, foi de 18,56; 58,78 e 79,88 %, respectivamente. E ainda, verificamos que o efeito analgésico do nimesulida é dependente da dose.

No protocolo experimental utilizando pentoxifilina, diferentes grupos de ratos foram tratados com doses crescentes de pentoxifilina 10, 30 e 100 mg/kg e outro grupo controle (C) recebeu salina. Todos os tratamentos, foram em volume constante de 1ml/i.p. Os grupos receberam o tratamento com pentoxifilina 30 minutos antes da administração do veneno (2,5 $\mu\text{g/pata}$). As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

Os dados da figura 12, demonstram, que a pentoxifilina foi eficiente em prevenir a hiperalgesia 3 horas após a administração do veneno. Reduzindo a hiperalgesia em 23, 62,5 e 89,3 %, quando comparado com o grupo tratado somente com veneno (C).

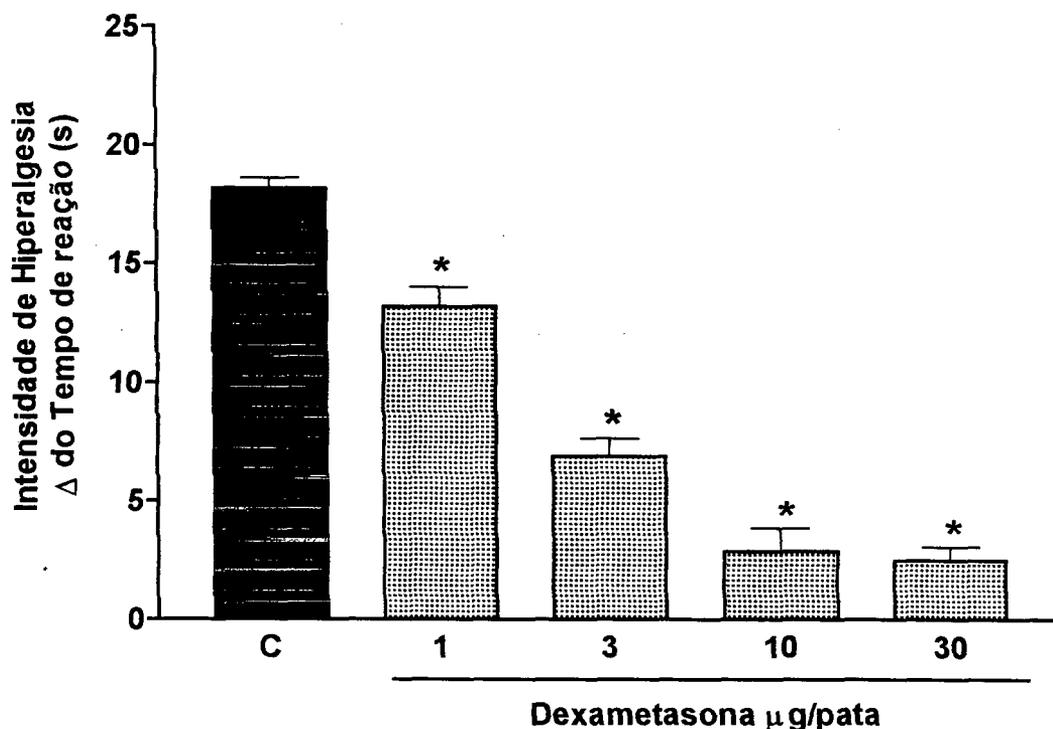


Fig. 10 - Efeito da dexametasona sobre a hiperalgésia induzida pela administração intraplantar do veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos de animais foram tratados com salina (C, 100 μl/pata) ou com doses crescentes de dexametasona 1, 3, 10 e 30 μg/pata, sempre em volume constante de 100 μl/pata. Sessenta minutos após, todos os grupos receberam injeções de veneno 2,5 μg/pata, na mesma pata previamente tratada. As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,01$ e (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

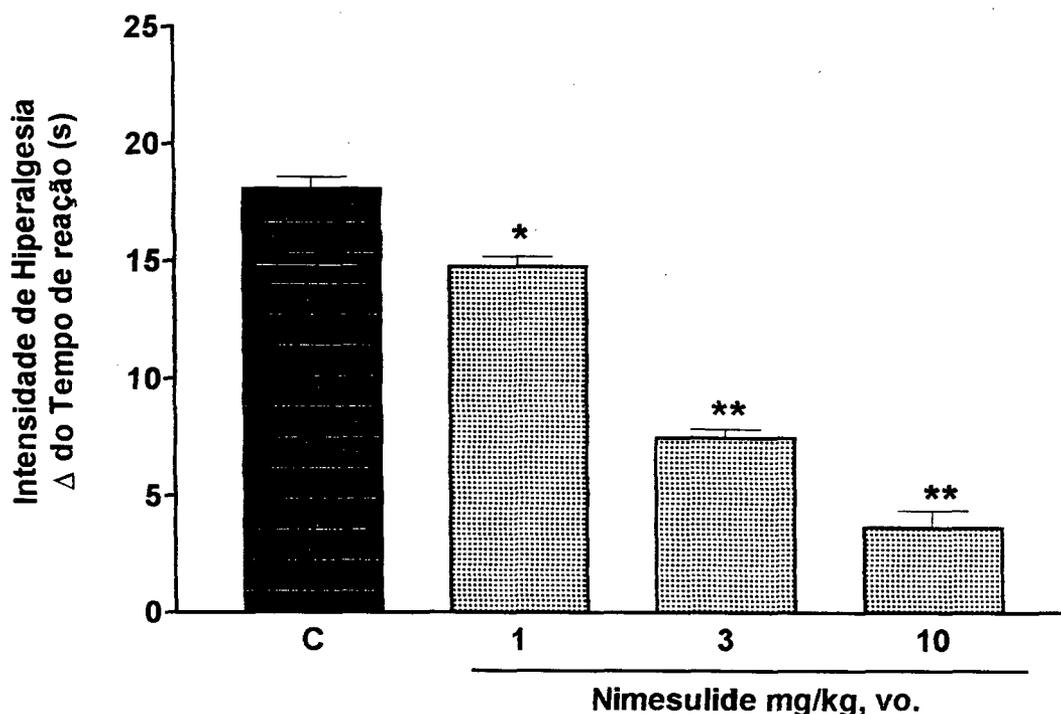


Fig. 11 - Efeito do nimesulide sobre a hiperalgisia induzida pela administração intraplantar do veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os animais, permaneceram em jejum de sólido por doze horas, até o momento do protocolo experimental. Os grupos foram tratados com doses crescentes de nimesulide 1, 3 e 10 mg/kg, vo., em volume constante de 1 ml. O grupo controle recebeu 1ml/v.o. de salina. Trinta minutos após, os grupos receberam injeções de veneno na dose de 2,5 µg/pata. As medidas de hiperalgisia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,01$ e (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

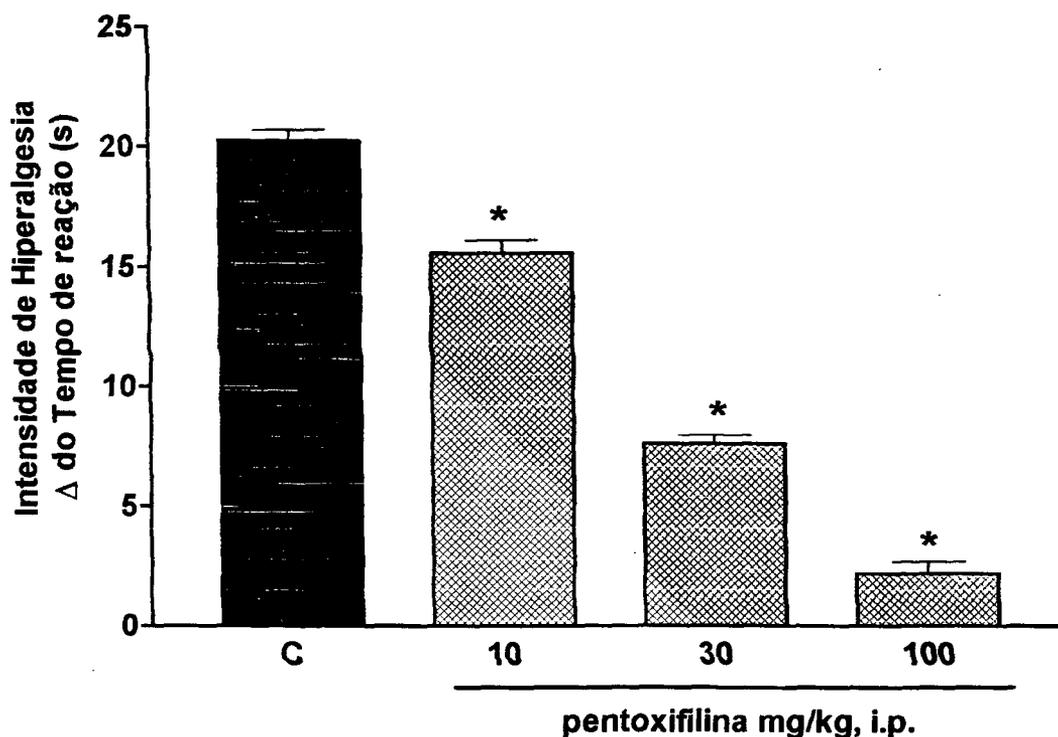


Fig. 12 - Efeito da pentoxifilina sobre a hiperálgia induzida pela administração intraplantar (2,5 μ g/pata) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos foram tratados com salina (C, 1ml / i.p.) ou com doses crescentes de pentoxifilina (10, 30 e 100 mg/kg, i.p., 1 ml). Trinta minutos após, todos os grupos receberam injeções de veneno na dose de 2,5 μ g/pata. As medidas de hiperálgia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.6 Avaliação do efeito analgésico do HOE-140 sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

Para avaliarmos a participação de bradicinina na hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*, administramos previamente ao veneno, HOE-140, um antagonista de receptor B2 para bradicinina.

Para tanto, o grupo controle foi tratado com salina (C, 1ml/i.p.) e os demais grupos tratados com doses crescentes de HOE-140 (0,1; 0,3; 1,0 e 10 mg/kg, ip., sempre em volume constante de 1 ml por cavidade peritoneal). Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam injeções de veneno 2,5 µg/pata. As medidas de hiperalgesia, foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

Os resultados da figura 13, demonstram que o pré-tratamento com HOE-140 preveniu a hiperalgesia causada pelo veneno, 3 horas após a sua administração. Este efeito foi observado em todas as doses testadas, sendo de forma dose dependente, (0,1 mg/kg = 24,75%; 0,3 mg/kg = 27,84%; 1,0 mg/kg = 69,83% e 10 mg/kg = 92,81%).

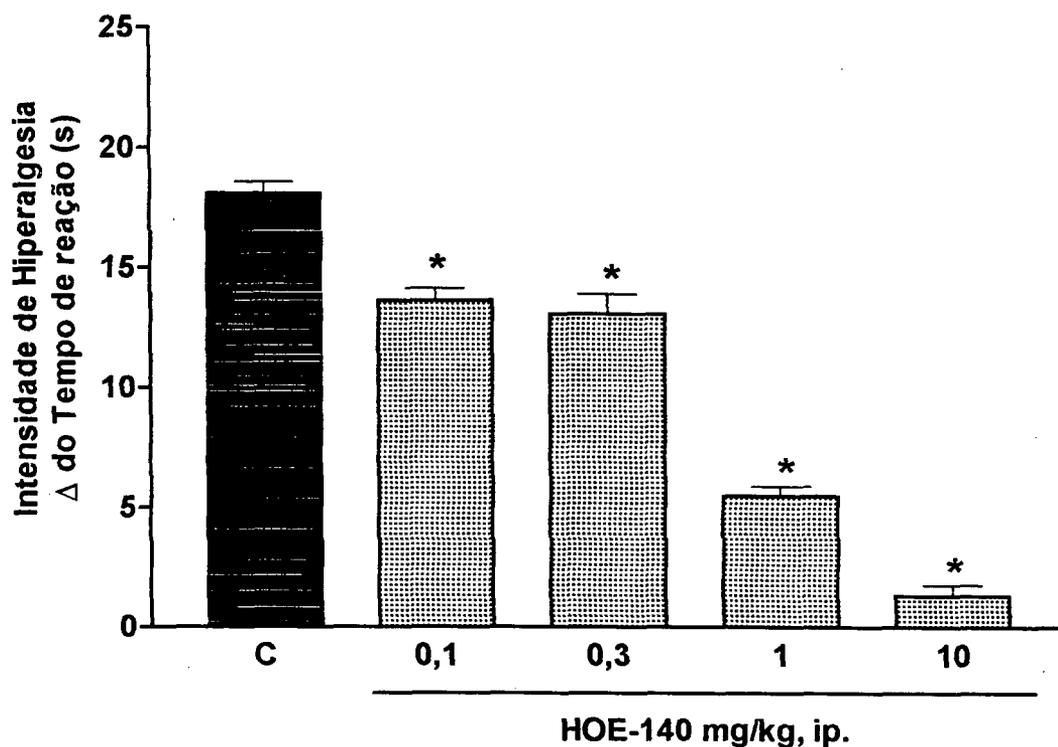


Fig. 13 - Efeito do HOE-140 sobre a hiperalgésia induzida pela administração intraplantar do veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos de animais foram tratados com salina (C, 1 ml/i.p.) ou com doses crescentes de HOE-140 (0,1; 0,3; 1,0 e 10 mg/kg, i.p.), sempre em volume constante de 1ml/i.p. Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam injeções de veneno na dose de 2,5 µg/pata. As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 três horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.7 Efeito de analgésicos NO/GMPc dependente na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

4.7.1 Efeito da dipirona sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*.

Diferentes grupos foram tratados com dipirona nas doses crescentes de 10, 30, 90 e 270 $\mu\text{g/pata}$, e o grupo controle (C) recebeu 100 $\mu\text{l/pata}$ de salina. Trinta minutos após os tratamentos, todos os grupos receberam 2,5 $\mu\text{g/pata}$ de veneno, na mesma pata previamente tratada com dipirona ou salina. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

Observamos na figura 14, que o efeito analgésico da dipirona foi dependente da dose. A prevenção da hiperalgesia causada pelo veneno (2,5 $\mu\text{g/pata}$), obtida com a administração das doses de dipirona 10, 30, 90 e 270 $\mu\text{g/pata}$, foi de 21,20; 55,49; 76,81 e 79,78 %, respectivamente, sendo que a dose de 90 $\mu\text{g/pata}$ não foi diferente estatisticamente da dose de 270 $\mu\text{g/pata}$.

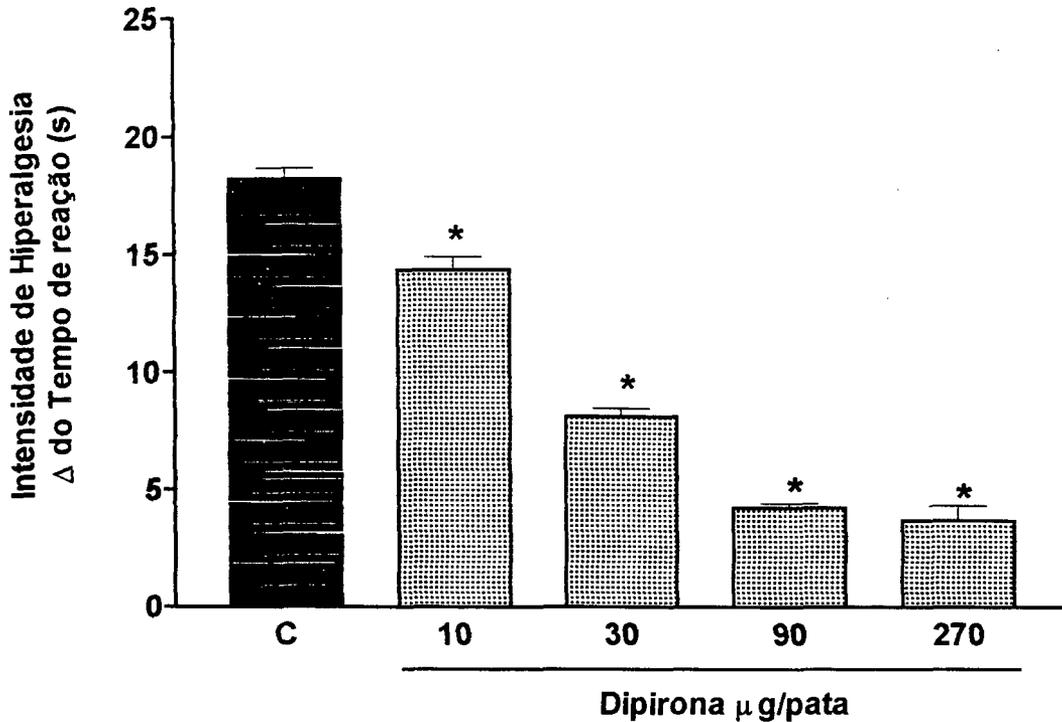


Fig. 14 - Efeito da dipirona sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado intraplantarmente. Os diferentes grupos receberam tratamentos com doses crescentes de dipirona (10, 30, 90 e 270 μg/pata), e os animais controle (C, receberam salina 100 μl/pata). Após trinta minutos administrou-se o veneno (2,5 μg/pata), nas mesmas patas previamente tratadas, em todos os grupos. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0.001$.

4.7.2 Reversão do efeito analgésico da dipirona, sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*, através da administração de LNMMA e azul de metileno.

Todos os grupos inicialmente foram tratados com veneno bruto de escorpião na dose de 2,5 µg/pata. Uma hora e trinta minutos e duas horas após a administração do veneno, o grupo controle (C) foi tratado com salina 100µl/pata. Os demais grupos foram tratados com azul de metileno (500µg/pata), LNMMA (N^G-monomethyl-L-arginine acetate), ou salina em uma das patas. Trinta minutos após estes tratamentos, foi administrada a dipirona 90 µg na mesma pata que fora previamente tratada.

As medidas de hiperalgesia foram realizadas em todos os grupos três horas após a administração do veneno, como mostra a figura 15.

Verificamos na figura 15, que quando administramos dipirona (SAL) duas horas após a administração do veneno, ocorreu uma redução da hiperalgesia induzida por este em 66,53%. Abolimos este efeito analgésico da dipirona com a pré administração de azul de metileno (AzM) e LNMMA .

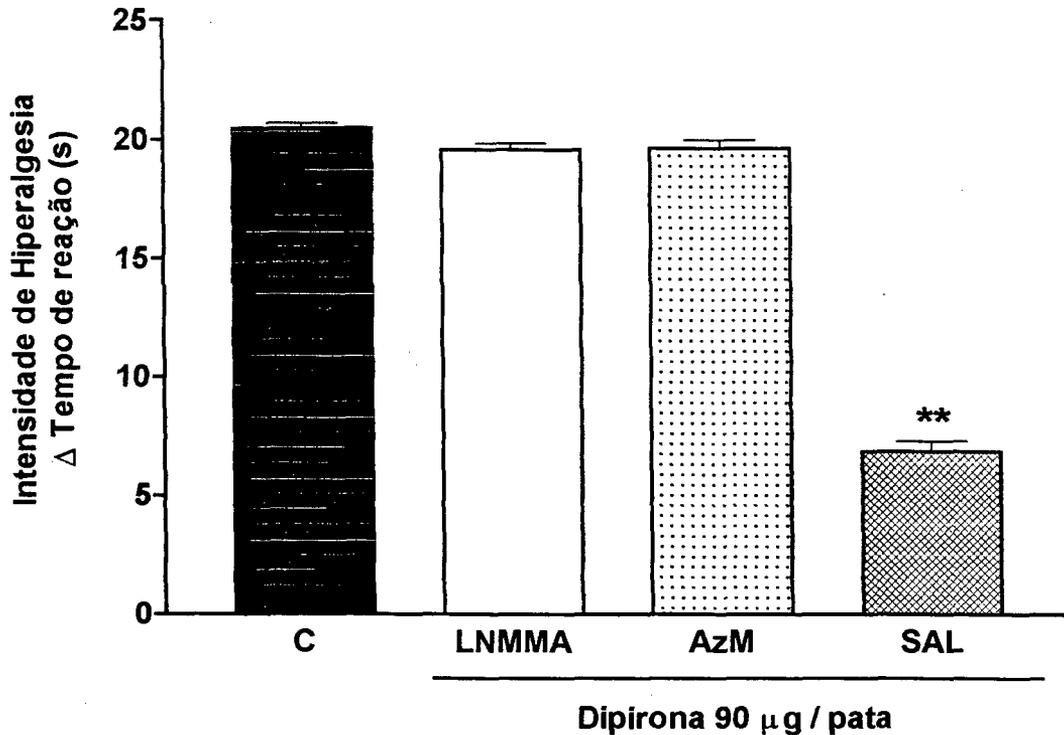


Fig. 15 - Bloqueio do efeito analgésico da dipirona sobre a hiperalgésia induzida pela injeção i.pl. de veneno de *Tityus serrulatus*, pelo LNMMA e azul de metileno. Em todos os grupos, a hiperalgésia foi induzida inicialmente por injeção intraplantar de veneno (2.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l/pata}$). Nos grupos controles (C) foi injetado salina 1h30min e 2h após a injeção de veneno. Uma hora e trinta minutos após a injeção do veneno, foi realizado o tratamento com azul de metileno (AzM, 500 $\mu\text{g/pata}$) ou LNMMA (LNMMA, 50 $\mu\text{g/pata}$), e 30 min após os animais foram tratados com dipirona (90 $\mu\text{g/pata}$). O grupo que recebeu somente dipirona, foi injetado com salina (SAL, 100 $\mu\text{l/pata}$) 1h30min após o veneno e 30 min após com dipirona (90 $\mu\text{g/pata}$). As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 horas após a injeção do veneno em todos os grupos. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.7.3 Efeito do diclofenaco na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Os animais foram tratados com diclofenaco sódico nas doses crescentes de 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/pata}$, e o grupo controle (C) recebeu salina 100 $\mu\text{l/pata}$. Trinta minutos após todos os grupos receberam 2,5 $\mu\text{g/pata}$ de veneno, na mesma pata previamente tratada com diclofenaco ou salina. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

Verificamos na figura 16, que o efeito analgésico do diclofenaco foi dependente da dose. A prevenção da hiperalgesia induzida pelas injeções do veneno, com as diferentes doses de diclofenaco (3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/pata}$), foram de 6,92; 49,78; 86,37 e 83,73 %, respectivamente, sendo que a dose de 30 $\mu\text{g/pata}$ não diferiu estatisticamente da dose de 90 $\mu\text{g/pata}$.

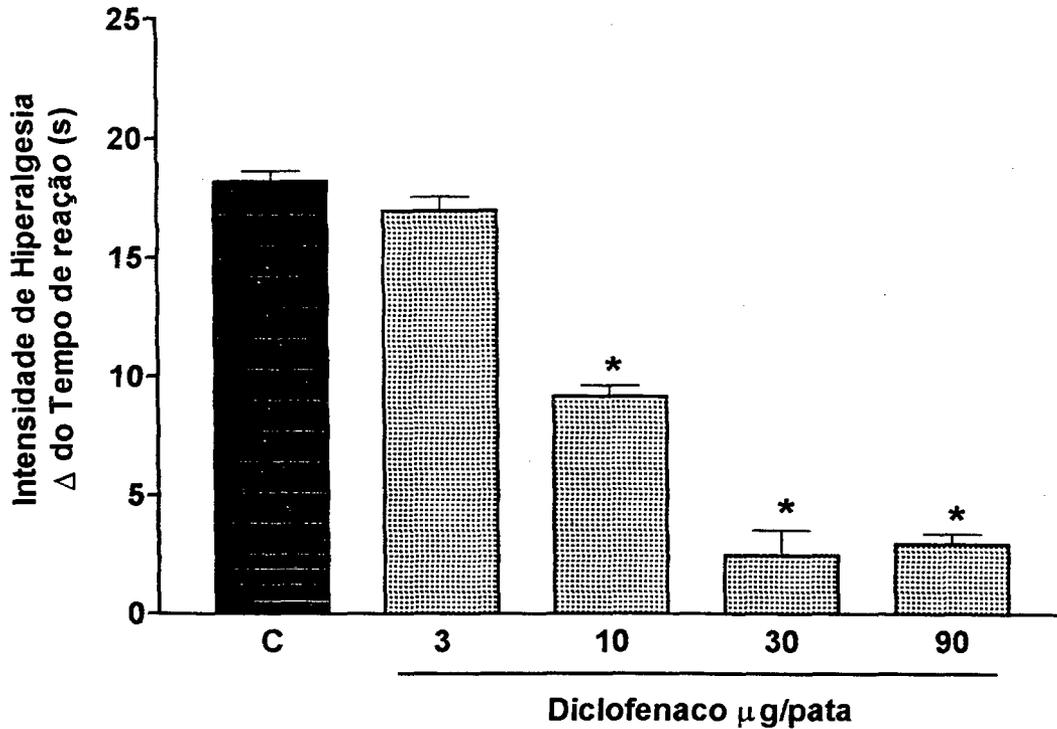


Fig. 16 - Efeito do diclofenaco na hiperalgésia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado i.pl. Os diferentes grupos receberam tratamentos com as doses crescentes de dipirona (3, 10, 30 e 90 μg/pata), e o grupo controle (C), recebeu salina 100 μl/pata. Trinta minutos após os tratamentos com salina ou diclofenaco, todos grupos receberam injeção de veneno 2,5 μg/pata. As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.7.4 Reversão do efeito analgésico da diclofenaco sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*, através da administração de LNMMA e azul de metileno.

Todos os grupos inicialmente foram tratados com veneno bruto de escorpião na dose de 2,5 µg/pata. Uma hora e trinta minutos e duas horas após a administração do veneno, o grupo controle (C) foi tratado com salina 100µl/pata.

Os demais grupos foram tratados com azul de metileno (500µg/pata), LNMMA 50µg/pata (N^G-monomethyl-L-arginine acetate), ou salina em uma das patas. Trinta minutos após estes tratamentos, foi administrado o diclofenaco 30 µg na mesma pata que fora previamente tratada.

As medidas de hiperalgesia foram realizadas em todos os grupos três horas após a administração do veneno, como mostra a figura 17.

Verificamos na figura 17, que quando administramos diclofenaco (SAL) duas horas após a administração do veneno, ocorreu uma redução da hiperalgesia induzida por este em 80,49%. Abolimos este efeito analgésico do diclofenaco com a pré administração de azul de metileno (AzM) e LNMMA .

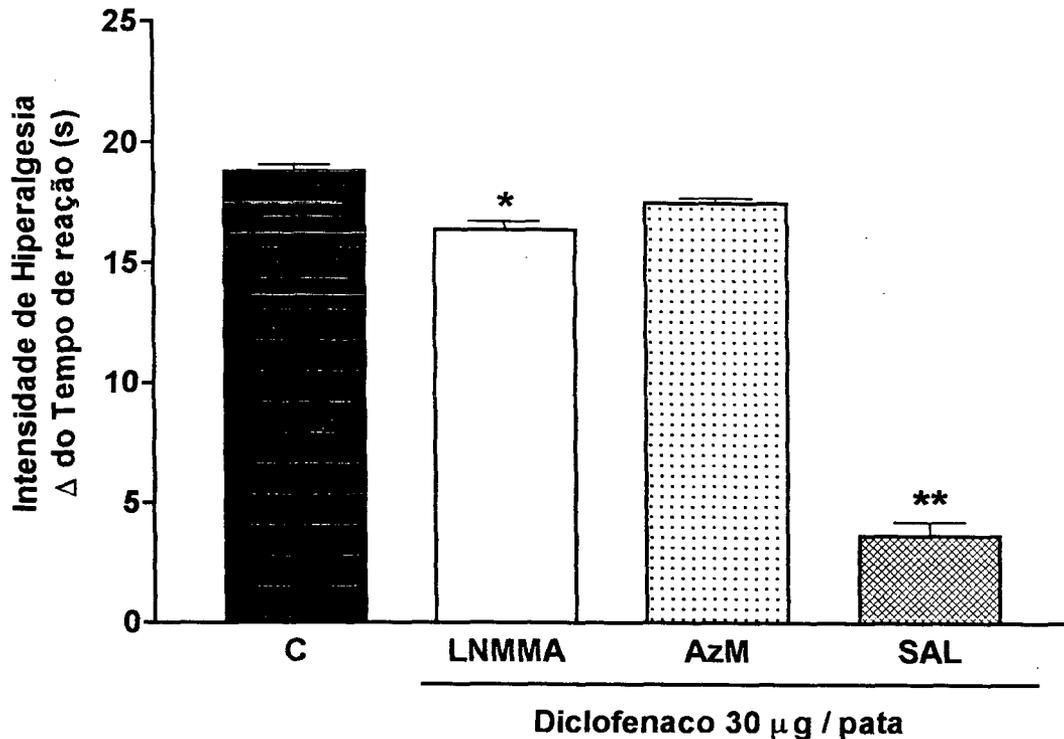


Fig. 17 - Bloqueio do efeito analgésico do diclofenaco sobre a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de veneno de *Tityus serrulatus*, pelo LNMMA e azul de metileno. Todos os grupos primeiramente foram tratados com injeção de veneno (2.5 µg/100 µl/pata). O grupo controle (C, somente veneno) foi tratado com injeção de salina 1h30min e 2h após a injeção do veneno. Os grupos tratados 1h30 min após a injeção do veneno com azul de metileno (AzM, 500µg/pata) ou LNMMA (LNMMA, 50 µg/pata), foram tratados 30 min após o LNMMA ou AzM com diclofenaco (30µg/pata). O grupo tratado com diclofenaco, foi injetado salina (SAL, 100 µl/pata) 1h30min após o veneno e 30 min após a salina, foi injetado o diclofenaco (30 µg/pata). As medidas de hiperalgesia foram realizadas após 3 horas da injeção do veneno em todos os grupos. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,01$ e (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.7.5 Efeito do SNAP (S-nitroso-N-acetil-D, L-penicilamina) sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

O SNAP (S-nitroso-N-acetil-D, L-penicillamine), é uma droga doadora direta de NO. Portanto, para verificarmos se o NO possuía uma atividade analgésica frente a hiperalgesia induzida pelo veneno, realizamos a administração de SNAP em doses crescentes. O veneno foi administrado intraplantarmente, antes do SNAP, no intuito de averiguar se este possuía a capacidade de reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno de escorpião amarelo.

Inicialmente, a hiperalgesia foi induzida nos diferentes grupos, através da administração de veneno 2,5 µg/pata. Duas horas após a administração do veneno, os animais foram tratados com SNAP nas doses crescentes de 50, 100 e 200 µg/pata, e o grupo controle (C) recebeu salina 100µl/pata. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno.

Ao administrarmos SNAP em doses crescentes, observamos na figura 18, a reversão do quadro hiperalgésico instalado com o veneno de forma dose dependente, quando administrado duas horas após o veneno. A dose de 50 µg/pata inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno em 13,53 %, a dose de 100 µg/pata inibiu a hiperalgesia em 34,75 %, e por fim a dose de 200 µg/pata inibiu a hiperalgesia em 78,14 %.

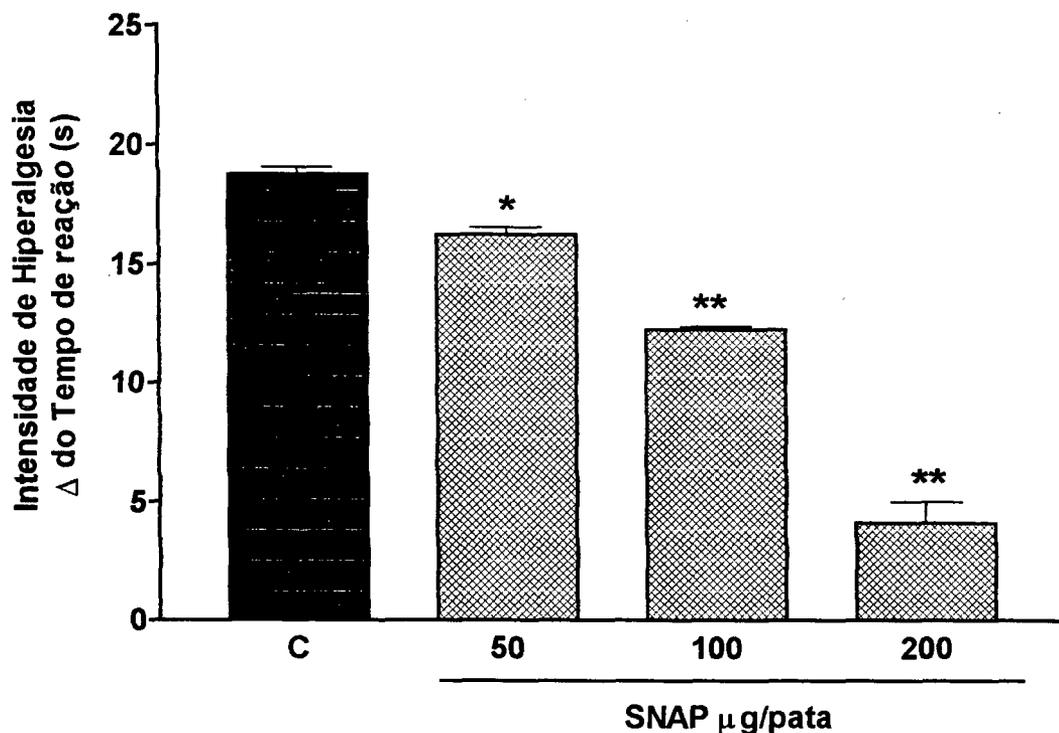


Fig. 18 - Efeito do SNAP na hiperalgésia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, administrado i.pl. Os diferentes grupos receberam injeções de veneno, 2,5 $\mu\text{g/pata}$. Duas horas após a administração do veneno, os grupos foram tratados com as doses crescentes de SNAP (50, 100 e 200 $\mu\text{g/pata}$), e o grupo controle (C), recebeu salina 100 $\mu\text{l/pata}$. As medidas de hiperalgésia ocorreram 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,05$ e (**) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.8 Efeito do paracetamol sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

O paracetamol é considerado um antiinflamatório não esteroideal, porém dados clínicos sugerem que o mesmo apresenta um efeito analgésico e antipirético mais potente que as substâncias deste grupo, como por exemplo a indometacina ou meloxicam. Procuramos neste protocolo experimental averiguar se o paracetamol, em uma única dose amplamente utilizada de acordo com a literatura, possuía efeito analgésico na hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*.

Para tanto, os grupos foram tratados trinta minutos antes da administração do veneno com salina 100 µl/pata (C) ou com paracetamol 400 µg/pata. O veneno, na dose de 2,5 µg/pata, foi administrado na mesma pata previamente tratada com salina ou paracetamol. As medidas da intensidade de hiperalgesia foram realizadas após 3 horas da administração do veneno.

Como demonstra a figura 19, o paracetamol preveniu a hiperalgesia causada pela injeção intraplantar de veneno de *Tityus serrulatus* (2,5 µg/pata) em 86,24%.

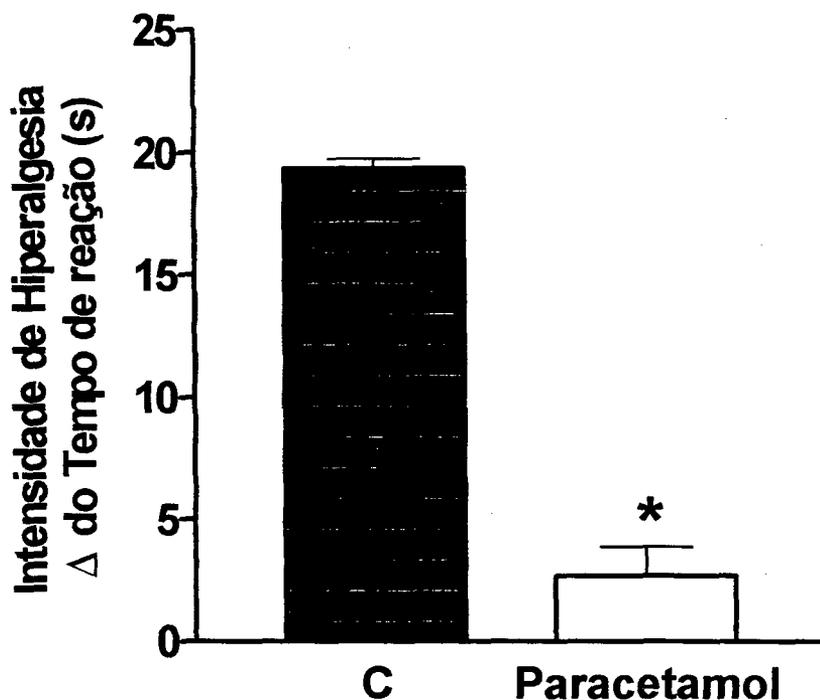


Fig. 19 - Efeito do paracetamol sobre a hiperalgésia induzida pela administração intraplantar ($2,5 \mu\text{g/pata}$) de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos foram tratados com salina (C, $100\mu\text{l/pata}$) ou com paracetamol ($400 \mu\text{g/pata}$). Trinta minutos após, ambos os grupos foram injetados com veneno ($2,5 \mu\text{g/pata}$) na mesma pata previamente tratada. As medidas de hiperalgésia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico t-student, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,001$.

4.9 Investigação da participação de leucotrienos e histamina na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*

Para verificar se havia a participação de leucotrienos na hiperalgesia induzida pelo veneno (2,5 µg/pata), uma hora antes da injeção do veneno, foi realizado o tratamento com MK886 (um inibidor da síntese de leucotrienos), nas doses de 1 e 3 mg/kg, i.p. O grupo controle (C) recebeu salina 1ml/i.p. uma hora antes do veneno (2,5 µg/pata).

E para verificarmos se havia liberação de histamina no processo hiperalgésico induzido pelo veneno, realizamos em diferentes grupos o tratamento com doses crescentes de meclisina (2,5 ; 7,5 e 22,5 mg/kg, ip.), em volume constante de 1ml/i.p. Estes tratamentos foram realizados trinta minutos antes da administração do veneno (2,5 µg/pata).

Os dados da figura 20, mostram que o MK886, nas doses de 1 e 3 mg/kg, i.p., inibem a hiperalgesia induzida pelo veneno, em 9,8 e 9,4% respectivamente.

Os dados da figura 21, mostram que as doses crescentes de meclisina, não interferiram com a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de veneno.

Para confirmar a participação ou não de histamina, durante o processo de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno de *Tityus serrulatus*, realizamos um protocolo experimental com composto 48/80, que administrado cronicamente, possui a capacidade de depletar os mastócitos dos estoques de histamina.

Durante 4 dias consecutivos administramos o composto 48/80, em dois grupos de animais, nas seguintes doses: 1º dia: 3 µg/100µl/pata, 2º dia: 3 µg/100µl/pata, 3º dia: 5 µg/100µl/pata e 4º dia: 10 µg/100µl/pata). O grupo controle (naive) recebeu durante os 4 dias salina 100 µl/pata.

No 4º dia, trinta minutos após o tratamento com o composto 48/80, nos diferentes grupos, foram administrados salina (C, 100 µl/pata), dextrana (200 µg/pata) ou veneno (2,5 µg/pata). Nos ratos naive foi administrado veneno e nos ratos tratados com o composto 48/80, em um grupo foi administrado veneno e no outro dextrana. As medidas de hiperalgesia foram realizadas 3 horas após a administração do veneno ou da dextrana.

A figura 22 mostra que em relação ao grupo controle (C, animais tratados somente com veneno), o grupo depletado de histamina com o composto 48/80, não houve redução da hiperalgesia. A dextrana administrada em animais não depletados de histamina, não induziu hiperalgesia, porém animais pré tratados com o composto 48/80 e tratados com dextrana, é o controle da depleção de mastócitos, e conseqüentemente não apresentam histamina.

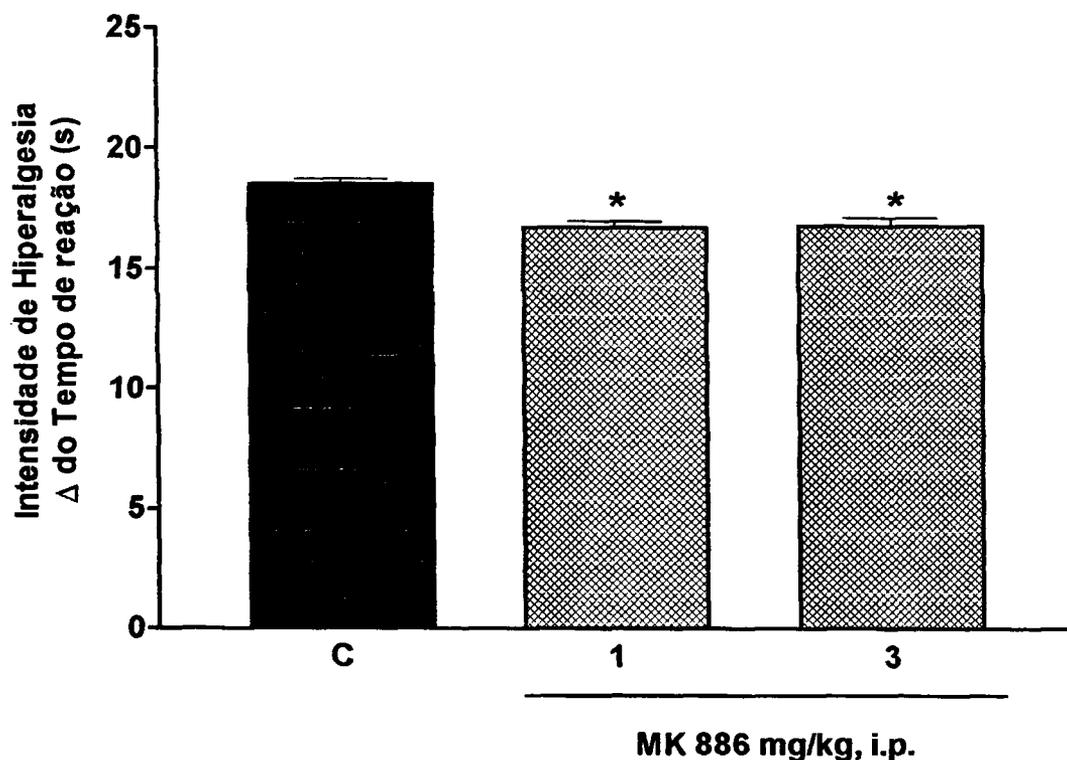


Fig. 20 - Efeito do MK886 na hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus* 2,5 µg/pata. Os grupos que receberam MK886 nas doses de 1 e 3 mg/kg, ip., foram pré tratados sessenta minutos antes da administração do veneno, o mesmo ocorrendo com o grupo controle (C, 1ml/i.p.) que recebeu salina antes do veneno. As medidas de hiperalgesia ocorreram três horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para $p < 0,05$.

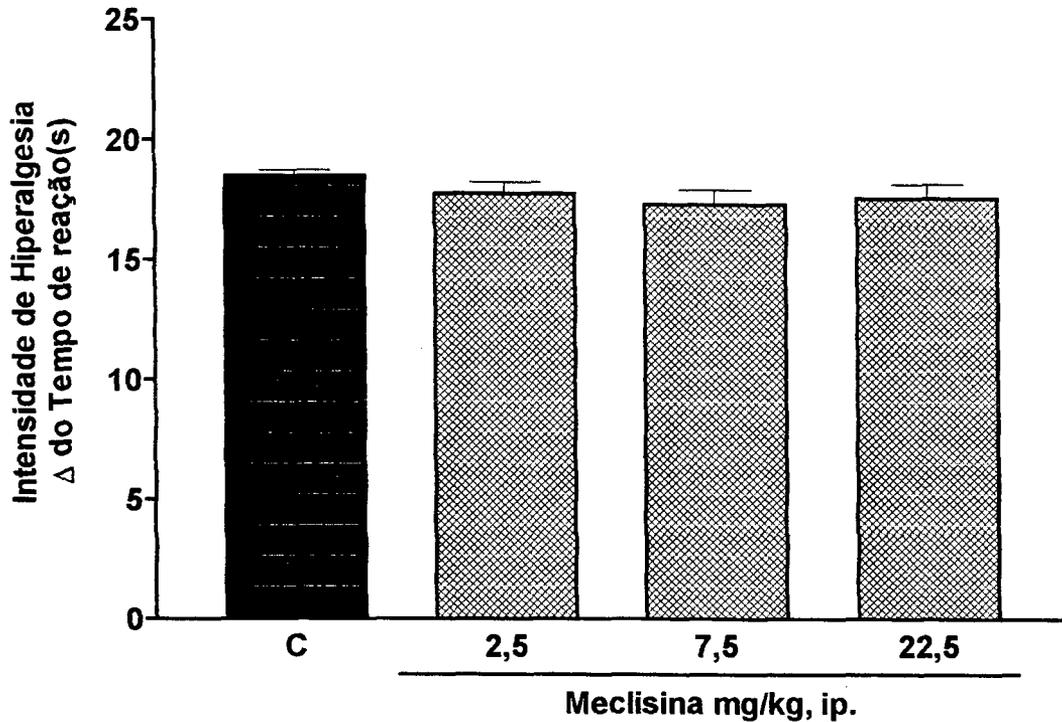


Fig. 21 - Efeito da meclisina na hiperalgésia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos de animais que receberam meclisina em doses crescentes (2,5 ; 7,5 e 22,5 mg/kg, ip.), foram pré tratados trinta minutos antes da administração do veneno, o mesmo ocorrendo com o grupo controle (C, 1ml/i.p.) que recebeu salina antes do veneno. As medidas de hiperalgésia ocorreram três horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) \pm EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

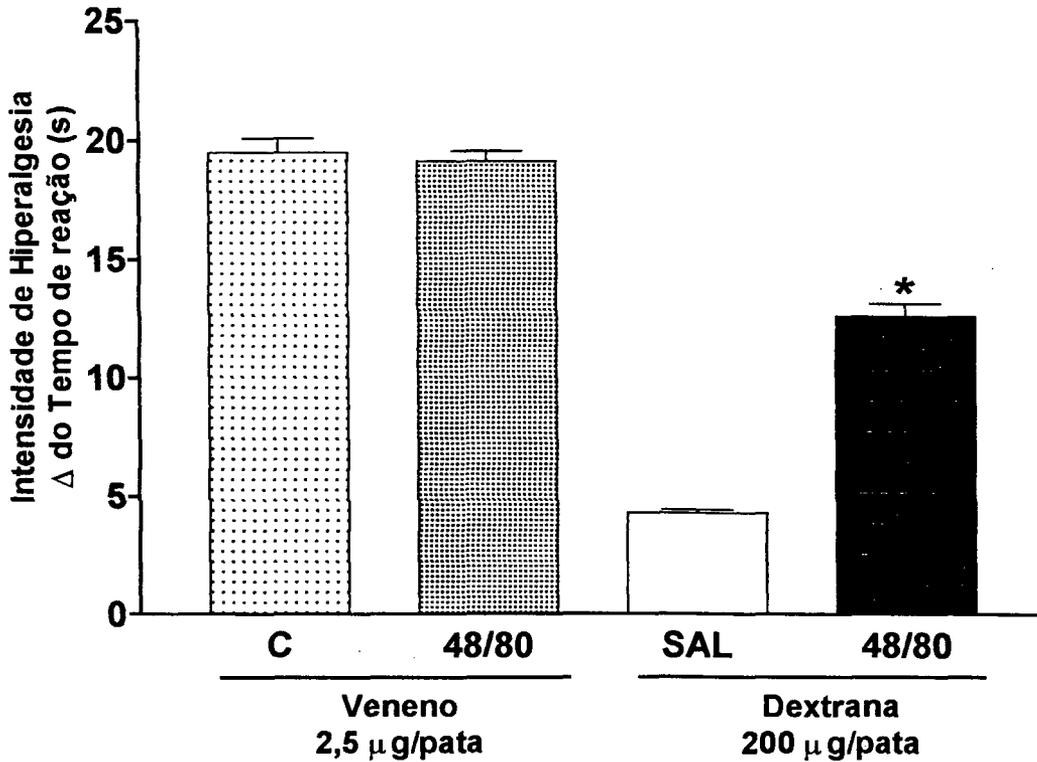


Fig. 22 - Efeito hiperalgésico do veneno bruto de *Tityus serrulatus*, em patas de ratos com mastócitos depletados de histamina. Os diferentes grupos foram tratados com o composto 48/80 por 4 dias consecutivos conforme as seguintes doses: 1º dia: 3 µg/100µl/pata, 2º dia: 3 µg/100µl/pata, 3º dia: 5 µg/100µl/pata e 4º dia: 10 µg/100µl/pata). C é o grupo controle (naive), onde a hiperalgesia foi induzida com veneno (2,5 µg/pata). Nos grupos tratados com o composto 48/80, a hiperalgesia foi induzida com veneno ou com dextrana. O veneno (2.5 µg/pata) ou a dextrana (200 µg/pata) foram administrados 30 min depois da administração em ratos naive (C, salina, 100 µl/pata). As medidas de hiperalgesia ocorreram 3 horas após a administração do veneno. Os dados referem-se à média do delta do tempo de reação (em segundos) ± EPM, de 5 animais por grupo. Realizou-se o teste estatístico ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.10 Dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α uma e duas horas após a administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus* (2,5 μ g/pata)

Os animais receberam veneno (2,5 μ g/pata) ou PBS (100 μ l/pata), e em uma e duas horas após o tratamento, os grupos foram sacrificados, suas patas tratadas retiradas e homogeneizadas em triturador de tecido. O sobrenadante foi coletado e a dosagem de TNF- α e IL-1 β foi avaliada em pg/ml e ng/ml, respectivamente, através do método de Elisa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (absorbância 490 nm).

Verificamos, na figura 23, que tanto em uma quanto em duas horas após a administração do veneno, ocorreu aumento nos níveis de liberação de interleucina 1 beta (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). O aumento em relação ao grupo controle ($0.30 \pm 0,08$ - 1^a hora e $0,305 \pm 0,0810$ - 2^a hora) para IL-1 β foi de 70.5% para a primeira hora e 74,79% para a segunda hora após a administração do veneno. O aumento em relação ao grupo controle (15 ± 1.020 - 1^a hora e 15 ± 1.022 - 2^a hora) de TNF- α foi de 75,4% para a primeira hora e de 77,94% para a segunda hora após a administração do veneno.

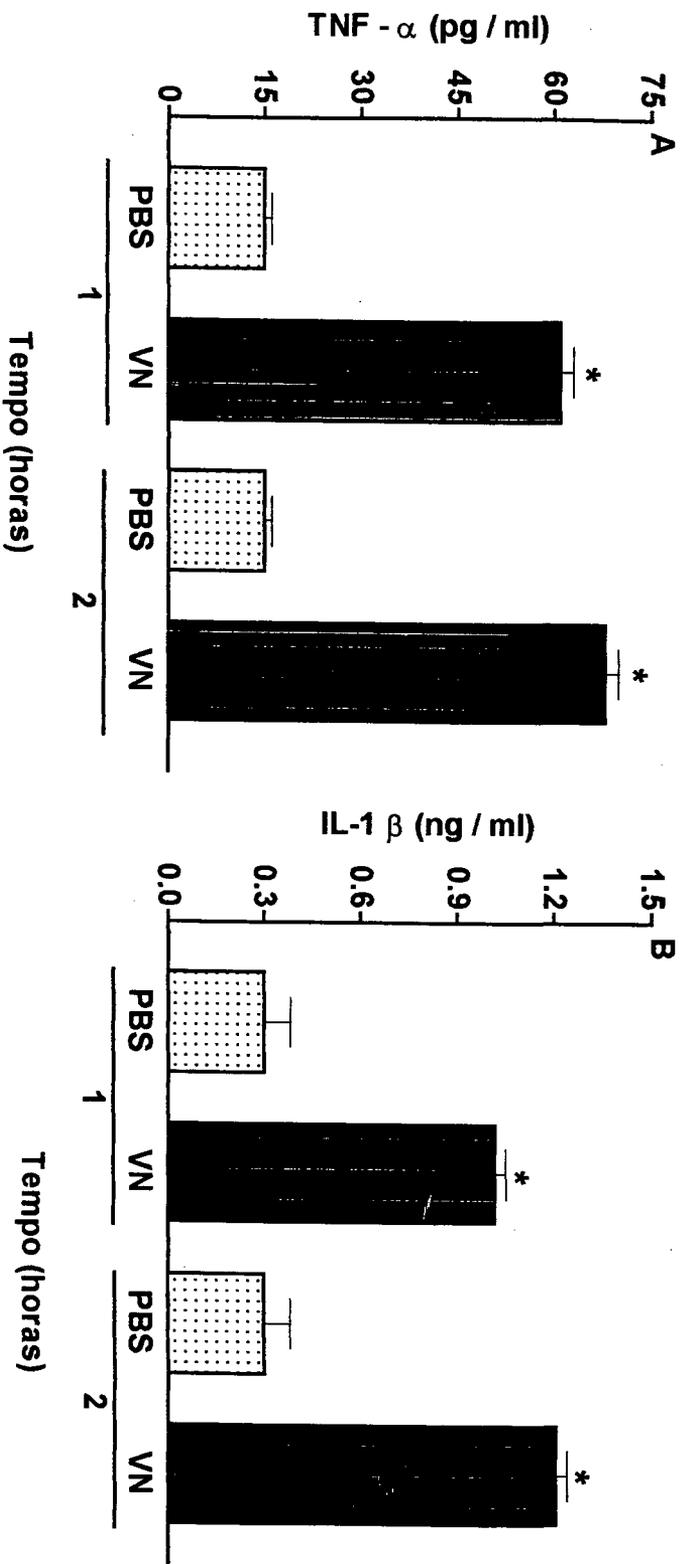


Fig. 23 - Dosagem das citocinas TNF - α (A) e IL-1 β (B), uma e duas horas após a administração i. pl. de veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os grupos foram tratados com veneno (VN) (2,5 μ g / pata), e após uma ou duas horas, da pata foram retiradas a pele, estas homogeneinizadas e a dosagem de TNF - α e IL-1 β , foi realizada através do método de ELISA, e a leitura em espectrofotômetro (abs 490 nm). Os grupos controles receberam PBS i. pl. Os dados referem-se à média \pm EPM das concentrações das citocinas em ml, n=3 animais por grupo. Os testes foram realizados em triplicata Realizou-se teste ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, onde (*) significa diferente estatisticamente para p < 0,001.

5 - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

O veneno de *Tityus serrulatus*, coletado em diferentes localidades do Brasil não apresenta diferenças bioquímicas e farmacológicas detectáveis (Possani e cols., 1992), demonstrando ser estável e constante nas suas propriedades químicas.

Neste trabalho, procuramos primeiramente verificar se o veneno bruto de *Tityus serrulatus*, induzia hiperalgisia em patas de ratos, utilizando o método de Randall-Selitto (1957) modificado por Ferreira e cols. (1978a). Administramos doses crescentes de veneno intraplantar e realizamos medidas de hiperalgisia em diferentes tempos. O veneno de *Tityus serrulatus* induziu hiperalgisia em todas as doses administradas, e os fatores que diferenciaram entre as doses utilizadas foi o tempo de latência na instalação do quadro hiperalgésico, a intensidade de hiperalgisia e o tempo de declínio e supressão da hiperalgisia (figura 4).

Na figura 4, observamos que ocorreu um pico hiperalgésico entre 3 e 6 horas após a administração das diferentes doses do veneno, e a dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$ foi a dose que demonstrou efeito hiperalgésico submáximo, diferenciando estatisticamente da dose de 1,25 $\mu\text{g/pata}$ e da dose de 10 $\mu\text{g/pata}$ (figura 5). Esta dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$, está abaixo da dose letal do veneno bruto de *Tityus serrulatus* em camundongos, que é de 25 $\mu\text{g}/20\text{g}$. (Possani e cols., 1992)

Portanto, o veneno de *Tityus serrulatus*, administrado em patas de ratos induz hiperalgisia de forma dose dependente (doses avaliadas na terceira hora após a administração do veneno) (figura 5), e quando administrado numa dose alta (10 $\mu\text{g/pata}$) a hiperalgisia permanece por até 96 horas após a sua administração (figura 4). A dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$ causa uma hiperalgisia que perdura por aproximadamente 10 horas após a sua administração (figura 4).

Neste trabalho procuramos dividir as drogas em duas classes: **1) as drogas que previnem a estimulação dos nociceptores inibindo a cascata de liberação de citocinas pró-inflamatórias, a produção das prostaglandinas e a liberação do componente simpático e 2) as drogas que bloqueiam o impulso nos**

nociceptores através do aumento de GMPc, ou seja, drogas que previnem a “*up-regulation*” ou fazem “*down-regulation*” dos nociceptores respectivamente (figura 2).

Testamos inicialmente as drogas que previnem a estimulação dos nociceptores inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias ou hiperalgésicas, a produção das prostaglandinas e a liberação do componente simpático. São as drogas que previnem a *up-regulation* dos nociceptores.

A enzima COX₂ é uma proteína bifuncional ligada na membrana do lado intracelular, que catalisa por bi-oxigenação o ácido araquidônico em PGG₂ e a redução da PGG₂ em PGH₂, estas por catalisação levam a formação de prostaglandina PGE₂ (Xie e cols., 1992). A COX₂ pode ser induzida por uma variedade de fatores como LPS de bactéria, IL-1 e ésteres de forbol (O'Sullivan e cols., 1992; O'Banion e cols., 1992; Hoff e cols., 1993). Em infecções bacterianas e virais ocorre a liberação de IL-1, que induz a ativação da enzima COX₂, que sintetiza prostaglandina E₂ (PGE₂) considerada um potente agente pirético. (Saxena e cols., 1979)

Grossman e cols., 1995, demonstraram através da estimulação “*in vitro*” de células mononucleares com LPS, que este induz a ativação da enzima COX₂. E vários estudos tem demonstrado que diferentes estímulos como carragenina e LPS, causam hiperalgesia via liberação de mediadores químicos, como as prostaglandinas (Ferreira e cols., 1978a; Ferreira e cols., 1978c; Vane e Botting, 1996).

Todos estes dados demostram que a PGE₂ apresenta papel importante, sendo um mediador hiperalgésico, liberado por diferente estímulos.

Neste modelo de hiperalgesia aguda procuramos verificar se o veneno de *Tityus serrulatus*, liberava prostaglandinas. Para tanto utilizamos diferentes tipos de AINEs. AINEs são drogas anti-inflamatórias, utilizadas no tratamento da dor, que atuam inibindo a COX e previnem a produção de prostaglandinas (Vane e Botting, 1987). A inibição da COX pela aspirina ocorre de forma irreversível através da acetilação da enzima, diferente de outros AINEs como indometacina e ibuprofeno que atuam inibindo a enzima COX de forma reversível porque competem com o

substrato ácido araquidônico no sítio ativo da enzima. (Van der Ouderaa e cols., 1980; Vane e cols., 1990)

A indometacina e meloxicam, são AINEs que inibem a enzima COX₂ de forma não seletiva e seletiva, respectivamente (Vane e Botting, 1987; Vane e cols., 1990). O meloxicam foi recentemente descrito como uma droga que atua seletivamente inibindo COX₂, onde a razão de inibição COX₂/COX₁ é na ordem de 0,33, demonstrado em macrófagos de peritônio de cobaia ativados com LPS (Engelhardt e cols., 1995). Em estudos com pacientes com osteoartrite em joelho, o meloxicam foi equipotente ao diclofenaco na cura após seis semanas de tratamento. E ainda, o meloxicam demonstrou causar menos efeitos adversos no trato gastrointestinal. (Goei e cols., 1997)

A prostaglandina parece exercer um papel fundamental na hiperalgesia induzida pelo veneno, visto que a prévia administração de indometacina ou do meloxicam inibiram de forma significativa este quadro hiperalgésico. As doses de indometacina inibiram a hiperalgesia de forma dose dependente, sendo que as doses de 100 µg e 200 µg intraplantar, inibiram 55,7 e 73,33%, respectivamente, e a dose de 2 mg/kg inibiu 57,33% (figura 6). As doses de meloxicam utilizadas, inibiram a hiperalgesia de forma dose dependente, semelhante à indometacina, sendo que a dose de 27 mg/kg inibiu a hiperalgesia em 63% (figura 7). Estes dados demonstram que os AINEs utilizados não abolem totalmente a hiperalgesia induzida pelo veneno. Sugerindo a participação de outros mediadores químicos inflamatórios que não somente a prostaglandina, e que estes também ativem os nociceptores.

Vários estudos clínicos, fisiológicos e farmacológicos evidenciam a existência de uma modulação simpática influenciando o impulso somatossensorio (Wiesenfeld-Hallin e Hailin, 1984). Outros estudos demonstram a participação do sistema simpático na nocicepção inflamatória (Coderre e cols., 1984; Moura e Ferreira, 1984) e de um componente simpatomimético na hiperalgesia inflamatória em distintos protocolos experimentais (Nakamura e Ferreira, 1987; Duarte e cols., 1988). Nakamura e Ferreira, em 1987, demonstraram que ocorre a liberação de aminas simpatomiméticas que atuam no neurônio sensorial primário aferente, induzindo hiperalgesia.

Cunha e cols. (1991), demonstraram que o efeito hiperalgésico de aminas simpatomiméticas é induzido através da liberação IL-8, sendo que este efeito foi abolido através do prévio tratamento das patas de rato, com atenolol e propranolol (antagonistas de receptores β -adrenérgicos), guanetidina (depleta os estoques de aminas simpatomiméticas dos neurônios adrenérgicos periféricos) e por antissoro anti-IL8, mas não foi abolido com a prévia administração de indometacina.

Com o objetivo de verificar se o veneno de *Tityus serrulatus*, liberava aminas simpatomiméticas, realizamos a prévia administração de atenolol e guanetidina, e associação de atenolol (24 μ g/pata) com guanetidina (30 mg/kg). A administração do atenolol inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente, sendo que as doses de 24 e 72 μ g/pata, inibiram o quadro hiperalgésico instalado pelo veneno, em 63,3 e 65% respectivamente, demonstrando a ocorrência de um platô de inibição. A associação de atenolol com guanetidina inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno em 62,95%, não demonstrando serem somatórios em seus efeitos inibitórios. Estes dados sugerem a participação de um componente simpático na hiperalgesia induzida pelo veneno, e os dados demonstram que os simpatolíticos utilizados não inibem totalmente a hiperalgesia induzida pelo veneno (figura 8).

Estudos realizados por Cunha e cols. (1991), utilizando a associação de AINEs e simpatolíticos, demonstraram que a hiperalgesia induzida pela carragenina em patas de ratos, foi atenuada pelo pré-tratamento com atenolol (antagonista de receptores β -adrenérgicos), com indometacina e com antissoro anti-IL8. E ainda, os efeitos da associação da indometacina e antissoro anti-IL8 foram aditivos, abolindo a hiperalgesia induzida pela carragenina.

Com base nestes dados, realizamos a associação de simpatolíticos (atenolol e guanetidina) com AINEs (meloxicam), para verificar se estes aboiam completamente a hiperalgesia induzida pelo veneno, visto que estas drogas administradas isoladamente não abolem completamente a hiperalgesia, mesmo em altas doses (figura 6, 7 e 8).

A administração associada de atenolol com meloxicam inibiram a hiperalgesia induzida pelo veneno em 92,47% e a associação de guanetidina com meloxicam inibiram a hiperalgesia em 91,25% (figura 9).

Através da obtenção destes dados, sugerimos a participação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas na hiperalgisia induzida pelo veneno (figuras 6, 7 e 8). Estes dois tipos de mediadores apresentam efeito somatório, uma vez que a hiperalgisia somente é inibida de forma quase que completa, quando ocorre a associação de drogas que inibem tanto a síntese de prostaglandinas quanto a ação das aminas simpatomiméticas (figura 9).

Cunha e cols. (1991), demonstraram que a hiperalgisia induzida pela IL-1 β somente é atenuada com prévia administração de indometacina, mas não com a administração de atenolol ou SCH 23390 (antagonista seletivo de receptor DA1 - dopamina). Ferreira (1996) reforça esta teoria, onde o meloxicam, reduz a hiperalgisia (em patas de rato) induzida pela IL-1 β e pela carragenina de forma dose dependente, bem como reduz o edema gerado pela carragenina.

Estudos tem demonstrado que citocinas, podem ser produzidas através da ativação de macrófagos (March, 1985) ocorrendo a liberação de outras citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF, que induzem hiperalgisia (Cunha e cols., 1991; Cunha e cols., 1992a; Cunha e cols., 1992b; Poole e cols., 1999). No intuito de verificar se estas citocinas estão presentes na hiperalgisia induzida pelo veneno, realizamos experimentos administrando previamente drogas que inibem a liberação de citocinas.

Visando este objetivo, utilizamos glicocorticóides que são amplamente utilizados na clínica como analgésico e anti-inflamatório, sendo que estes efeitos dos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ocorre através da inibição da atividade da fosfolipase A₂, via síntese da proteína lipocortina-1, com consequente inibição da liberação dos eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanas e leucotrienos). Muitos mediadores inflamatórios são capazes de aumentar a expressão de fosfolipases A₂, que consequentemente aumentam os níveis de produção de prostaglandinas. (Chepenik e cols., 1994)

Os glicocorticóides também inibem a síntese e liberação de citocinas e inibem a síntese da enzima ciclooxigenase (Blackwell e cols., 1982; Calignano e cols., 1985; Wallner e cols., 1986; Sautebin e cols., 1992; Flower e Rothwel, 1994).

A proteína lipocortina-1 previne a liberação de eicosanóides em tecidos de humanos (Geisow e cols., 1987; Cirino e cols., 1987) e é considerado um potente agente anti-inflamatório experimental por inibir edema de patas de rato (Cirino e cols., 1989). Vários estudos demonstram que a dexametasona é um anti-inflamatório esteroide (glicocorticóide), que inibe a síntese de citocinas e ativa a síntese de lipocortina-1, que inibe a fosfolipase A₂ (Fu J-Y e cols., 1990; Lee e cols., 1992; Coyne e cols., 1992; Barnes e cols., 1993). Estudos realizados por Ferreira e cols. (1997), demonstraram que a hiperalgesia em patas de rato, induzida por TNF- α , IL-1 β e IL-6 é inibida pela prévia administração de dexametasona 10 μ g/pata, e ainda que este efeito anti-nociceptivo da dexametasona é abolido com a administração de antisoro anti-lipocortina-1.

Em nossos estudos, avaliando a liberação de citocinas, a figura 10 mostra que a dexametasona administrada 60 minutos antes do veneno, inibe a hiperalgesia deste de forma dose dependente, sendo que as doses de 10 e 30 μ g/pata produziram uma inibição de 84,17 e 86,26% respectivamente, atingindo um platô inibitório. Demonstramos que a dexametasona inibe efetivamente a hiperalgesia induzida pelo veneno (figura 10), sugerindo a participação de outros mediadores, possivelmente citocinas, na hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*.

Clinicamente o nimesulide é amplamente utilizado com analgésico e anti-inflamatório, porém difere dos AINEs clássicos no que diz respeito a ação anti-inflamatória, visto que é menos potente. (Sengupta e cols., 1998)

Em ratos, a administração de nimesulide previne a elevação dos níveis de TNF- α no plasma induzido por LPS. (Azab e cols, 1998)

Ferreira em 1993, demonstrou que a prévia administração de nimesulide, utilizando doses crescentes (1, 3 e 10 mg/kg), é capaz de abolir a hiperalgesia em ratos induzida por carragenina, bradicinina e TNF- α , inibe pouco a hiperalgesia induzida por prostaglandinas e não inibe a hiperalgesia induzida pelas citocinas IL-1 β e IL-8. Sugerindo que o nimesulide além de ser classificado com um AINEs, possui a capacidade de inibir a síntese e/ou liberação de TNF- α , que dentro da cascata de citocinas inflamatórias possui papel chave na liberação das citocinas IL-6 e IL-8 (ver figura 2).

Neste trabalho, demonstramos que a prévia administração de nimesulide nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, preveniram a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente em 18,56; 58,78 e 79,88% respectivamente. Estes dados sugerem que o nimesulide possui um efeito (na dose de 10 mg/kg), anti-hiperalgésico tão potente quanto a dexametasona (figura 11).

A pentoxifilina, de forma semelhante aos corticosteróides, é amplamente utilizada na clínica, em casos de endotoxemia e no tratamento de artrite reumatóide (Zabel e cols., 1991; Dubost e cols., 1997). Em cultura celular, a pentoxifilina foi capaz de inibir a síntese de IL-1 e TNF- α derivado de neutrófilos (Sullivan e cols., 1988; Zabel e cols., 1989) e a síntese de TNF- α derivado de macrófagos que foram estimulados com LPS (Striter e cols., 1988; Schandene e cols., 1992). Recentemente demonstrou-se que a administração intratecal ou intraperitoneal em ratos aumenta o limiar nociceptivo para estímulos hiperalgésicos mecânicos, e os animais tratados com pentoxifilina apresentaram níveis menores de citocinas como TNF alfa e IL-6. (Wordliczek e cols., 2000)

Baseados nestes dados, em que a pentoxifilina causa a inibição da produção de citocinas em células importantes no processo inflamatório, realizamos a prévia administração de doses crescentes de pentoxifilina, 10, 30 e 100 mg/kg via ip., e esta inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno administrado intraplantar de forma dose dependente em 23; 62,5 e 89,3% respectivamente (figura 12). Estes dados demonstram que a pentoxifilina é eficiente em prevenir a hiperalgesia induzida pelo veneno, tanto quanto a dexametasona 10 μ g/pata (inibição de 84,17%).

Ferreira em 1972 demonstrou que a bradicinina causa dor declarada de curta duração, em contraste a administração equimolar de prostaglandinas que causa hiperalgesia duradoura. Posteriormente, estudos de eletrofisiologia e comportamental demonstraram que a bradicinina induz a ativação de nociceptores de alto limiar, associados à fibras do tipo C (Steranka e cols., 1987; Costelo e Hargreaves, 1989; Fujiyoshi e cols., 1989). Estudos realizados por Ferreira e colaboradores (1993a; 1993b) demonstram que assim como a carragenina e o LPS, a bradicinina induz hiperalgesia em patas de rato, e possui a capacidade de induzir a liberação de TNF α . Poole e cols. (1999) demonstraram que a hiperalgesia

induzida pela bradicinina, parece ser predominantemente mediada pelos receptores do tipo B2, os estudos realizados anteriormente por Ferreira e cols. (1993a; 1993b) demonstram que a hiperalgesia induzida pela bradicinina, carragenina ou LPS, pode ser inibida pela prévia administração de HOE-140, um antagonista seletivo para receptores do tipo B2.

Dentro desta visão de que a bradicinina é produzida na hiperalgesia inflamatória induzida por outros estímulos (carragenina e LPS) e é importante devido a sua capacidade de ativar a produção e liberação de TNF- α , procuramos verificar se o veneno induzia a liberação de bradicinina, para tanto, realizamos a prévia administração de HOE-140 em doses crescentes de 0,1; 0,3; 1,0 e 10 mg/kg, que inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente em 24,75; 27,84; 69,83 e 92,81% respectivamente. Estes dados sugerem que o veneno bruto de *Tityus serrulatus*, induz a ativação do sistema de cininas plasmáticas com consequente formação de bradicinina (figura 13).

Como já foi descrito anteriormente, o endotélio possui papel importante na resposta inflamatória, no que diz respeito ao aumento da permeabilidade vascular, ao extravasamento de líquido intersticial e a formação de edema. Em 1980, Furchgott e Zawadzki, devido a um erro experimental de um de seus técnicos, descobriram um fato que durante muitos anos foi um grande enigma da farmacologia: o porquê da ACh em algumas situações, ser um vasoconstritor e, em outros, agir como um vasodilatador. A simples verificação de que a ACh só age como vasodilatador na presença do endotélio desencadeou uma era de intensos trabalhos na década de 1980, quando se estabeleceu o endotélio como a sede do desencadeamento de muitas doenças cardiovasculares. Postulou-se, então a existência de uma fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Nestes estudos, determinou-se que o EDRF não era um prostanóide, pelo fato que a indometacina, um bloqueador da via ciclooxigenase, não inibia o relaxamento dependente do endotélio produzido pela ACh e por uma série de outros agonistas, tais como ADP, serotonina, histamina e outros (Evora e cols., 1996). Posteriormente, descobriu-se que o relaxamento dependente do endotélio, associava-se à elevação de GMPcíclico na musculatura lisa vascular, podendo ser inibido pelo azul de metileno

(inibidor não seletivo da enzima guanilato ciclase) e pela hemoglobina (sequestrador de EDRF). Furchgott (1988) e Ignarro (1988) propuseram independentemente, que o EDRF era o óxido nítrico (NO), e Palmer e cols. no mesmo ano (1988), postularam ser a L-arginina a fonte do NO sob a ação de uma enzima, a óxido nítrico sintetase.

Em 1998, estudos realizados por Teixeira e cols. (1998) demonstram a participação do veneno de *Tityus serrulatus* no relaxamento de corpo cavernoso isolado de coelhos. O veneno provocou um relaxamento de forma dose dependente, e a aplicação de azul de metileno (inibidor não seletivo de guanilato ciclase) inibiu este relaxamento induzido pelo veneno, semelhante ao ODQ (inibidor seletivo de guanilato ciclase). As drogas, L-NAME e L-NIO (inibidores da enzima NOS) inibiram o efeito relaxante do veneno. No entanto, o inibidor da enzima neuronal NOS (TRIM) não teve nenhum efeito sobre o tônus do corpo cavernoso isolado de coelho ou sobre o relaxamento induzido pelo veneno, ACh e bradicinina. Drogas como inibidor de protease, antagonista do receptor B2, antagonistas do canal de cálcio e potássio também não alteraram o efeito relaxante do veneno.

No entanto, o bloqueador do canal de sódio tetrodotoxina inibiu a ação do veneno e reverteu o relaxamento causado pelo veneno quando colocado na infusão durante o processo de relaxamento do corpo cavernoso. Sugerindo que no relaxamento induzido pelo veneno ocorre não só a participação do NO, mas também a participação de canais de sódio neuronais. O veneno de *Tityus serrulatus* causa despolarização de nervos periféricos com liberação excessiva de neurotransmissores, sendo este processo mediado pela ativação de canal de sódio. Em presença de L-arginina este efeito relaxante em musculatura lisa, que normalmente os venenos geram é potenciado e em presença de L-NAME este efeito relaxante é inibido (Gwee, e cols., 1995)

No processo de dor inflamatória, estudos com drogas colinérgicas, demonstraram que a administração intracerebroventricular de ACh, bem como a sua administração intratecal, gera analgesia (Metys e cols., 1965; Headiey e cols., 1969; Pedigo e cols., 1975; Yaksh e cols., 1985; Brodie e cols., 1984; Katayama e cols., 1984 e Ossipov e cols., 1986).

Em adição a estes estudos, Ferreira e Nakamura (1979), descreveram o efeito analgésico periférico de agentes coiinérgicos, e ainda, demonstraram que antagonistas de cálcio são analgésicos e que estes agentes colinérgicos podem gerar analgesia por um aumento nos níveis de GMPc no nociceptor.

Ferreira e Lorenzetti, propuseram em 1981, que a hiperalgésia induzida pela prostaglandina, seria atuando em receptores do tipo metabotrópicos, aumentando os níveis de AMPc nos nociceptores, e diante desta teoria testaram um análogo de AMPc o Db-AMPc. O Db-AMPc induziu hiperalgésia em patas de rato, e o efeito hiperalgésico da prostaglandina mas não do Db-AMPc foi bloqueado com o pré tratamento com cicloheximida (inibidor de síntese protéica). Sugerindo desta forma que a hiperalgésia induzida pela prostaglandina é dependente da síntese de um fator neuronal que modula aos efeitos da estimulação ionotrópica nos nociceptores.

Posteriormente, Duarte e colaboradores (1990), demonstram que o efeito analgésico da ACh, era mediada pelo aumento de GMPc via NO.

Através dos dados relatados acima, muitos experimentos foram realizados no intuito de verificar o mecanismo de ação de drogas que atuam de forma a inibir ou abolir um quadro de dor ou hiperalgésia instalada. São as drogas que bloqueiam o impulso nos nociceptores através do aumento de GMPc, sendo classificadas como drogas que causam a *down-regulation* dos nociceptores.

Dipirona é um derivado da pirazolona, muito utilizada na clínica para o alívio e supressão de dores das mais diversas origens.

Estudos experimentais realizados por Lorenzetti e Ferreira (1985), relatam que a dipirona causa analgesia sem efeito anti-inflamatório significativo em quadro de inflamação induzida por carragenina.

Tatsuo e cols. (1994) demonstraram posteriormente que em modelo de artrite em ratos, a dipirona inibe a hiperalgésia e o edema induzido pelo adjuvante, porém a potente dose analgésica da dipirona foi muito inferior à dose anti-inflamatória.

No protocolo experimental de Lorenzetti e Ferreira (1985), quando foram utilizados outros estímulos hiperalgésicos, como prostaglandinas (PGE₂) e isoprenalina, a dipirona teve o mesmo efeito inibitório de hiperalgésia como

demonstrado com a carragenina, diferindo da indometacina (um AINEs) que não possui o efeito de reverter a hiperalgesia causada por estes estímulos.

Posteriormente, Marquez e Ferreira (1987), demonstram que em pacientes com quadro de hiperalgesia persistente (*up-regulation* do nociceptor), a dipirona foi efetiva no bloqueio desta hiperalgesia persistente. Diferente dos AINEs, que não bloqueiam esse quadro de hiperalgesia persistente e nem causam a *down regulation* do nociceptor. No processo de indução da hiperalgesia persistente, através da administração intraplantar de prostaglandina, dopamina ou isoprenalina, em ratos, a administração de um única dose de dipirona aboliu completamente este tipo de hiperalgesia. (Ferreira e cols., 1990)

O LNMMA (N^G -monomethyl-L-arginine), tem sido descrito por muitos autores como inibidor da enzima responsável pela síntese do NO. (Rees e cols., 1984; Palmer e cols., 1988; Rees e cols., 1989; Duarte, Lorenzetti e Ferreira, 1990; McCall e cols., 1991; Ferreira, Duarte e Lorenzetti, 1991; Duarte e cols., 1992; Ialenti e cols., 1992; Ferreira e Lorenzetti, 1993; Lorenzetti e Ferreira, 1996; Aley e cols., 1998); da mesma forma, o azul de metileno, tem sido amplamente utilizado no intuito de inibir a ativação da enzima guanilato ciclase (Palmer e cols., 1988; Moncada e cols., 1988; Duarte, Lorenzetti e Ferreira, 1990; Ferreira, Duarte e Lorenzetti, 1991; Meller e cols., 1992; Duarte e cols., 1992; Kawabata e cols., 1993; Mayer e cols., 1993; Lorenzetti e Ferreira, 1996) e o MY5445 é utilizado devido a sua propriedade farmacológica em inibir a enzima GMPc fosfodiesterase, que degrada GMPc (Duarte, Lorenzetti e Ferreira, 1990; Duarte e cols., 1992).

Duarte e cols., em 1992, demonstraram que a hiperalgesia induzida por prostaglandina (em patas de ratos), era inibida por dipirona sendo este efeito abolido com a prévia administração de N^G -monomethyl-L-arginine acetate (LNMMA, inibidor das enzima oxido nítrico sintase) ou azul de metileno (AzM, inibidor da enzima guanilato ciclase), e potenciado com a prévia administração de MY5445 (um inibidor da GMPc fosfodiesterase), sugerindo assim que o mecanismo de ação analgésico da dipirona, era devido à estimulação da via NO/GMPc. Lorenzetti e Ferreira (1996), demonstraram também que este efeito analgésico da dipirona é periférico, e que a hiperalgesia induzida por prostaglandina (em pata de ratos), não foi abolida pela

administração intracerebroventricular (i.c.v.) de dipirona. O efeito analgésico da dipirona somente foi observado quando administrado por via intratecal e/ou intraplantar, e este efeito periférico foi inibido com a prévia administração de L-NMMA ou AzM, sugerindo-se então que a anti-nocicepção mediada pela dipirona, é devido a uma combinação de efeitos espinhais e periféricos no neurônio sensorial primário aferente, via estimulação da via arginina/NO/GMPc.

Com base nos dados obtidos nos estudos da dipirona e via analgésica L-arginina/NO/GMPc dependente relatados acima, procuramos verificar se a dipirona prevenia o quadro de hiperalgisia induzido pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

Com este objetivo, realizamos a prévia administração de dipirona em doses crescentes 10, 30, 90 e 270 $\mu\text{g/pata}$ que inibiu a hiperalgisia induzida pelo veneno em 21,20; 55,49; 76,81 e 79,78% respectivamente (figura 14). Realizamos também um protocolo experimental, no intuito de verificar se a dipirona abolia o quadro de hiperalgisia induzida pelo veneno após sua indução e, para tanto administramos veneno 2,5 $\mu\text{g/pata}$ e duas horas após o veneno administramos na mesma pata dipirona 90 $\mu\text{g/pata}$, ao realizarmos a medida de intensidade de hiperalgisia (uma hora após a administração da dipirona) verificamos que a dipirona aboliu a hiperalgisia induzida pelo veneno em 66,53% e este efeito analgésico da dipirona foi abolido através da administração de LNMMA ou AzM trinta minutos antes da dipirona (figura 15). Estes dados sugerem que a dipirona é eficiente em prevenir e abolir a hiperalgisia induzida pelo veneno (figuras 14 e 15), e que este efeito analgésico da dipirona é dependente da produção e liberação de NO, visto que inibidor de NOS ou da guanilato ciclase, abolem o efeito analgésico da dipirona (figura 15).

Estudos realizados por Tonussi e Ferreira (1994), demonstraram que o diclofenaco é mais eficiente em abolir a hiperalgisia instalada pela carragenina do que a indometacina, e na hiperalgisia induzida pela PGE_2 somente o diclofenaco aboliu por completo a hiperalgisia, sendo que esta não foi revertida com a administração de naloxone ou N-metil-nalorfina. Estes dados indicam que o efeito analgésico do diclofenaco independe de efeitos de opióides de ação central ou periférica. E ainda neste mesmo trabalho, demonstrou-se que o efeito analgésico do

diclofenaco foi abolido pela prévia administração de LNMMA ou azul de metileno, indicando que o mecanismo de ação do diclofenaco pode ser via NO/GMPc dependente. (Tonussi e Ferreira, 1994; Rocha e Lorenzetti, 1997)

Com o objetivo de verificar se o diclofenaco possuía alguma ação analgésica, na hiperalgesia induzida pelo veneno, realizamos uma prévia administração de diclofenaco em doses crescentes 3, 10, 30 e 90 $\mu\text{g/pata}$ que inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno em 6,92; 49,78; 86,37 e 83,73% respectivamente (figura 16).

Realizamos também um protocolo experimental semelhante ao realizado com a dipirona, no intuito de verificar se o diclofenaco abolia uma quadro de hiperalgesia instalado, para tanto administramos veneno 2,5 $\mu\text{g/pata}$ e duas horas após o veneno administramos na mesma pata diclofenaco 30 $\mu\text{g/pata}$, ao realizarmos a medida de intensidade de hiperalgesia (uma hora após a administração do diclofenaco) verificamos que o diclofenaco aboliu a hiperalgesia induzida pelo veneno em 80,49% e este efeito analgésico foi abolido através da administração de LNMMA ou AzM trinta minutos antes do diclofenaco (figura 17). Estes dados sugerem que o diclofenaco, da mesma forma que a dipirona, é eficiente em prevenir e abolir a hiperalgesia induzida pelo veneno (figuras 16 e 17), sendo que este efeito analgésico do diclofenaco é dependente da produção e liberação de NO, visto que o LNMMA e o AzM, abolem o efeito analgésico do diclofenaco (figura 17).

O SNAP, tem sido utilizado em protocolos experimentais como um doador direto de NO independente da via L-arginina, e atua como anti-nociceptivo em diferentes estímulos hiperalgésico, como carragenina e citocinas. (Duarte e cols., 1990; Tonussi e Ferreira, 1994; Ferreira e Lorenzetti, 1993; Ferreira e Lorenzetti, 1994; Lorenzetti e Ferreira, 1996)

Para confirmar se doadores de NO induziam analgesia na hiperalgesia gerada pelo veneno de *Tityus serrulatus*, administramos o veneno (2,5 $\mu\text{g/pata}$) e duas horas após administramos injeção de SNAP em doses crescentes de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/pata}$, observamos que o SNAP reverteu o quadro hiperalgésico induzido pelo veneno de forma dose dependente, em 13,53; 34,75 e 78,14% respectivamente (figura 18). Estes dados sugerem que o doadores diretos de NO, como o SNAP ou drogas que atuam ativando a formação de NO e que atuam no neurônio sensorial

primário aferente, causando a down regulation do neurônio, sendo capazes de abolir e/ou reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

O paracetamol é classificado como AINEs, porém seu mecanismo de ação ainda não foi bem elucidado, visto que relatos clínicos demonstram que o paracetamol é muito mais potente como analgésico e antipirético, do que como anti-inflamatório (Smith, 1975; Goei e cols., 1997), sendo bastante eficiente em quadros de dor instalada (Eschaliere e cols., 1994). O paracetamol é bastante eficiente em inibir a síntese de prostaglandinas no Sistema Nervoso Central (SNC) (Dembínska-Kiec e cols., 1976)

Estudos experimentais realizados por Ferreira e cols. (1978c), demonstraram que a hiperalgesia induzida por carragenina é prevenida com a administração de paracetamol 400 µg/pata. Baseado neste estudo, administramos paracetamol, trinta minutos antes da administração do veneno e observamos que o paracetamol preveniu 86,24% a intensidade de hiperalgesia induzida pelo veneno (figura 19), este dado corrobora com dados da clínica, quanto à potente ação analgésica do paracetamol frente a diferentes quadros de dor.

Procuramos também neste trabalho, verificar se ocorria a participação de outros mediadores químicos liberados no processo inflamatório, como os leucotrienos e a histamina, que poderiam estar atuando de forma a induzir ou contribuir na hiperalgesia gerada pela injeção de veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

A migração de células para o sítio inflamatório, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos e/ou linfócitos, tem sido amplamente descrito por vários autores. Este processo de migração celular amplifica a resposta inflamatória, e um dos agentes quimiotáticos importante, no recrutamento celular, são os leucotrienos (Ferreira, 1993; Robbins e cols., 1994; Rang e Dale, 1997; Goodman, 1996; Page e cols., 1999). Os leucotrienos, são produtos da enzima 5-lipooxigenase, que tem como substrato o ácido araquidônico. (Goetzi e Pickett, 1980; Levine e cols., 1992; Murphy e cols., 1979; Robbins e cols., 1994; Goodman e cols., 1996; Rang e cols., 1997)

O MK886 (3-[1-(p-Chlorobenzyl)-5-(isopropyl)-3-tert-butylthioindol-2-yl]-2, 2-dimethylpropanoic acid), é uma droga amplamente utilizada para inibir a enzima

lipooxigenase, conseqüentemente inibindo assim, a migração leucocitária (Ferrandiz e Foster, 1991; Ishii e cols., 1994; Mion e cols., 1994; Rainsford e cols., 1994; Souza e cols., 1997). O mecanismo inibitório da síntese de leucotrienos, pelo MK886, foi sugerido como sendo através de dois efeitos, o de prevenir e reverter a translocação da enzima 5-lipooxigenase. (Rouzer e cols., 1990; Ferrandiz e Foster, 1991)

O efeito analgésico dos inibidores da lipooxigenase e ciclooxigenase, foram estudados por Griswold e cols. (1991), utilizando o método original de Randall-Selitto (1957), e demonstraram que o MK886 inibiu a ação hiperalgésica da fenilbenzoquinona. Estudos *in vitro*, demonstraram que os produtos da lipooxigenase, promovem a produção de $TNF\alpha$ via ativação de macrófagos. No modelo de bolsa de ar, em ratos, demonstrou-se que a inflamação induzida por zimosan produz TNF, precedido pela síntese de leucotrienos.

Para avaliar se o veneno bruto de *Tityus serrulatus* induzia a produção de leucotrienos, via ativação de lipooxigenase, sendo estes um dos mediadores químicos hiperalgésicos ativados pelo veneno, administramos 1 hora antes do veneno o MK886 nas doses de 1 e 3 mg/kg, que inibiram a hiperalgesia em 9,8 e 9,4% respectivamente, não sendo estes dados estatisticamente significativos, sugerindo que o veneno de *Tityus serrulatus* não induz a ativação de lipooxigenase e conseqüentemente não ocorre a produção de leucotrienos.

As aminas vasoativas, histamina e serotonina são mediadores químicos pré formados, ou seja, estão estocadas em células especializadas e são liberadas no processo inflamatório. A histamina encontra-se amplamente distribuída por todo o organismo, sendo sua fonte mais rica, os mastócitos presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sangüíneos. A histamina gera dilatação das arteríolas, e aumenta a permeabilidade vascular das vênulas. É considerada um mediador de fase imediata, e atua basicamente sobre a microcirculação, através de receptores H_1 . Para que ocorra a liberação de grânulos de histamina presentes nos mastócitos, é necessário que ocorra um aumento da concentração de cálcio intracelular, estimulado pelo complexo IgE (Robbins e cols., 1994, Rang e Dale, 1997; Page e cols., 1999).

A serotonina encontra-se em plaquetas e células enterocromafínicas, sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agrupam após entrarem em contato com o colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e complexos antígeno-anticorpo. (Robbins e cols., 1994)

Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de histamina dos mastócitos, via aumento de cálcio intracelular. A Histamina causa aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, através da estimulação da liberação de PAF, e ainda, causa hiperalgesia quando injetada intradermicamente, em humanos. (Page e cols., 1999, Goodman, 1996; Marney, 1992).

Vários estudos tem demonstrado que o composto 48/80 (uma poliamina), depleta os estoques de histamina dos mastócitos (Di Rosa, 1971; Mousii e cols., 1990a; Amann e cols., 1996, Cunha e cols., 1999). O mecanismo de ação do composto 48/80, foi sugerido por Mousli e cols. (1990a; 1990b), como um agente estimulante da atividade GTPásica da proteína G, ligando-se diretamente a subunidade alfa da proteína, de forma que mimetiza um agonista ligante do receptor nas células mastocitárias.

Para verificar se o veneno de *Tityus serrulatus* induz a liberação de histamina, utilizamos um anti-histamínico (meclisina) administrado trinta minutos antes do veneno em doses crescentes de 2,5; 7,5 e 22,5 mg/kg e verificamos que três horas após a injeção do veneno, a meclisina não alterou a intensidade de hiperalgesia induzida pelo veneno (figura 21). Estes dados sugerem que o veneno não ativa a liberação de histamina, porém para confirmar estes dados realizamos um outro protocolo experimental, onde os animais foram tratados por 4 dias consecutivos com composto 48/80, que depleta os mastócitos de histamina. O composto 48/80 não alterou a hiperalgesia induzida pelo veneno, quando comparado com o grupo controle (C), que não foi previamente tratado com composto 48/80 (figura 22). O controle de liberação de histamina deste experimento foi a dextrana (200 µg), que conhecidamente quando administrada em patas de rato libera histamina dos mastócitos (Carnuccio e cols., 1989), sendo este efeito abolido pela administração crônica do composto 48/80.

Embora a literatura não apresente nenhum trabalho de dor induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, nossos dados demonstram que o veneno é capaz de induzir hiperalgesia em patas de rato.

Para determinar os mediadores químicos envolvidos na gênese da hiperalgesia induzida pelo veneno nós utilizamos substâncias que previnem o quadro hiperalгésico, tais como: anti-inflamatórios não esteroidais (meloxicam e indometacina), simpatolíticos (guanetidina e atenolol) e inibidores da liberação de citocinas como dexametasona, nimesulide e pentoxifilina, que foram eficientes em inibir a resposta hiperalгésica.

Nossos estudos sugerem a participação mediadores químicos inflamatórios envolvidos na gênese da hiperalgesia induzida pelo veneno, e ainda sugerimos que substâncias que liberam ou são doadores diretos de NO, são eficientes analгésicos neste quadro de hiperalgesia. Estes dados, são clinicamente importantes em casos de envenenamento, visto que a utilização de analгésicos ocorre após o acidente escorpiônico.

6 - CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o veneno de *Tityus serrulatus* causa hiperalgesia de forma dose dependente em patas de rato.

Sugerimos a participação da bradicinina na hiperalgesia induzida pelo veneno, uma vez que esta foi abolida pelo HOE-140.

O veneno, possivelmente é capaz de liberar citocinas inflamatórias, visto que drogas como nimesulide, dexametasona e pentoxifilina foram capazes de abolir a hiperalgesia induzida pelo veneno. E o teste de ELISA para dosagem das concentrações de IL-1 β e TNF- α , demonstraram que estas concentrações aumentam uma e duas horas após a administração do veneno em patas de rato.

Substâncias que inibem as prostaglandinas, tais como indometacina, meloxicam, paracetamol e dexametasona foram capazes de atenuar ou até abolir a hiperalgesia induzida pelo veneno, sugerindo a participação de prostaglandinas na hiperalgesia induzida pelo veneno.

Substâncias que bloqueiam a ação de aminas simpatomiméticas, tais como atenolol e guanetidina atenuaram a hiperalgesia induzida pelo veneno, sugerindo a participação de aminas simpatomiméticas.

A liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas provavelmente é concomitante e possui efeito somatório, visto que a associação de AINEs e simpatolíticos aboliram a hiperalgesia induzida pelo veneno.

Nossos resultados também demonstram que substâncias como dipirona e diclofenaco, foram capazes de reverter o quadro de hiperalgesia induzido pelo veneno.

E ainda, demonstramos que estas substâncias agem de forma analgésica via a liberação de NO, visto que as ações analgésicas do diclofenaco e da dipirona foram abolidas pelo prévio tratamento com LNMMA ou azul de metileno.

Substâncias que inibem a ação da histamina como meclisina e composto 48/80, não foram capazes de reverter o quadro de hiperalgesia instalado pela administração intraplantar de veneno.

O MK886, que impede a síntese de leucotrienos, foi incapaz de atenuar ou reverter o quadro de hiperalgesia instalado pela administração intraplantar do veneno.

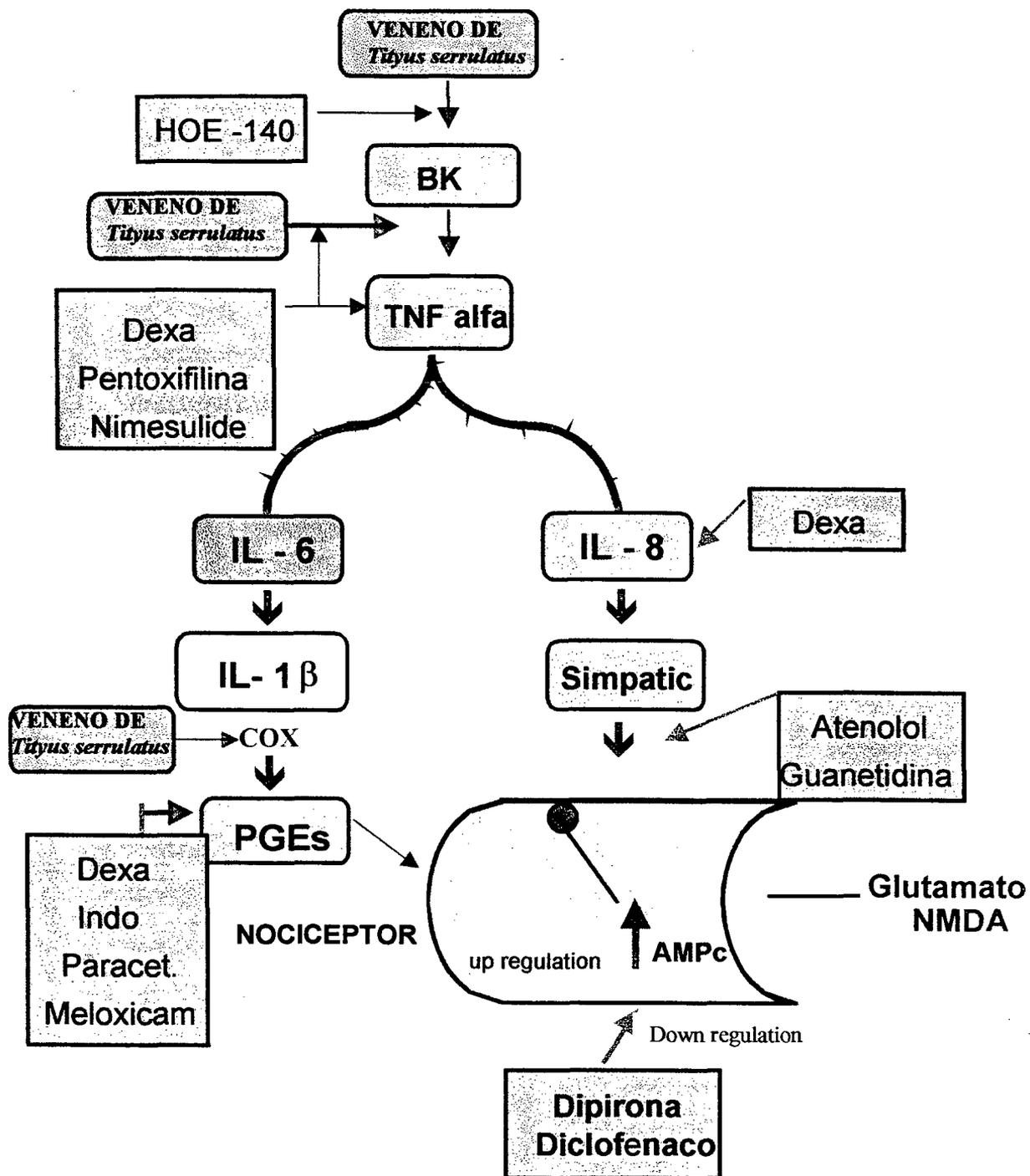


Figura 25 : Esquema explicativo das conclusões obtidas neste trabalho experimental. Os quadrados amarelos indicam possíveis locais de ação do veneno bruto de *Tityus serrulatus*. Os quadrados verdes indicam os possíveis locais de ação onde as drogas foram eficientes em atenuar ou abolir o quadro de hiperalgesia instalado pela administração intraplantar de veneno de *Tityus serrulatus*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - Referências Bibliográficas

- Abrahams LG; Reutter MA; McCarson KE; Seybold VS Cyclic AMP regulates the expression of neurokinin1 receptors by neonatal rat spinal neurons in culture: *J Neurochem*; 73(1):50-8, 1999 Jul.
- Adler-Graschinski, E. e Langer, S.Z. Mechanism of the enhancement in transmitter release from central and peripheral noradrenergic terminals induced by purified scorpion venom, tityustoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch, exp. Path. Pharmac.*, n. 303, p. 243-249, 1978.
- Aley KO; Levine JD Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain: *J Neurosci*; 19(6):2181-6, 1999 Mar 15.
- Aley, KO., McCarter, G., Levine, JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.* 18, p. 7008-7014, 1998.
- Amann R; Schuliqoi R; Herzeg G; Donnerer J Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold *Pain*; 64(2):323-9, 1996 Feb.
- Amann, R., Schuliqoi, R., Herzeg, G., Donnerer, J. Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold. *Pain.* 64, p. 323-329, 1996.
- Amaral, CFS., Rezende, NA., Freire-Maia, L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am. J. Cardiol.* 71, p. 242-245, 1993.
- Amitai, Y. *Public Health Rev.* 26 (3)p. 257-263, 1998.
- Andrew D; Greenspan JD Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat *J Neurophysiol*, 82(5):2649-56, 1999 Nov.
- Arantes, EC., Ricciopo-Neto, F., Sampaio, SV, Vieira, CA., Giglio, JR. The delay of the inactivation of Na⁺ channels by TsTX-V, new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 31, p. 108-109, 1993.
- Arantes, EC., Ricciopo-Neto, F., Sampaio, SV, Vieira, CA., Giglio, JR. *Biochim. Biophys. Acta.* 1199, p. 69-75, 1994.
- Armstrong, D., Dry, R.M.L., Keele, C.A., Markham, J.W. Observations on chemical excitants of cutaneous pain in man. *J. Physiol.* 120, p. 326-351, 1953.

- Armstrong, D., Jerson, J.B., Keele, C.A. e Stewart, J.M. Pain producing substance in human inflammatory exudates and plasma. *J. Physiol.* 135, p. 350-370, **1957**.
- Azevedo, AD., Silva, AB., Cunha-Melo, JR., Freira-Maia, EL. Cardiovascular and respiratory effects induced by a purified scorpion toxin (tityustoxin) in unanesthetized rats. *Toxicon.* 21, p. 753-759, **1983**.
- Balozet, L. Scorpionism in the Old World. In: *Venomous Animals and Their Venoms*. Vol. 3. New York, p. 349-371, **1971**.
- Barharini, J., Giglio, J.R., Léopold, P. Schmid, A. Sampaio, S.V. e Lazdunski, M. *Tityus serrulatus* venom contains two classes of toxins. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 257, n. 21, p. 2553-2558, **1982**.
- Barnes, P.J. Mediators and asthma. *Br. J. Hosp. Med.* 34, p. 339-344, **1985**.
- Becerril, B., Marangoni, S. e Possani, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon.* v. 35, n. 6, p. 821-835, **1997**.
- Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, PN., Brando, T., Martim, MF. Diniz, CR., Rochat, H. *Biochemi. Biophys. Acta.* 122, p. 1146-1153, **1984**.
- Beresford, I.J.M., Birch, P.J. Antinociceptive activity of the bradykinin antagonist HOE 140 in rat and mouse. *Br. J. Pharmacol.* 105 (suppl): 1p-314p, **1992**.
- Bessou, P. e Perl, E.R. *J. Neurophysiol.* 32, p. 1025-1043, **1969**.
- Birks, RI. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, p. 2573, **1963**.
- Blackwell, GJ., Carnuccio, R., Di Rosa, M., Flower, RJ., Langham, CS., Parente, L., Persico, P., Russei-Smith, NC. Stone, D. Glucocorticoids induce the formation and release of anti-inflammatory and anti-phospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 76, p. 185-194, **1982**.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J. Exp. Med.* 174, p. 1549-1555, **1991**.
- Brodie, M.S., Proudfit, H.K. Hypoaesthesia induced by local injection of cabacholinto the nucleus raphe magnum. *Brain Res.* 291, p. 337-342, **1984**.
- Bruce, NA. Vasodilator axon reflexes. *Q. J. Exp. Physiol.* 6, p. 339-354, **1913**.
- Bürchel, W. Classification, biology and venom extraction of scorpions. In: *Venomous animals and their venoms*. Volume 3. New York, p. 317-347, **1971**.
- Burchel, W. Diniz, CR. Arthropod venoms. In: *Handb Exp. Pharmacol.* Ed. Bettini, S. New York, p. 371-394, **1978**.

- Burgess, P.R. e Perl, E.R. Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors: In Handbook of Sensory Physiology, vol.2 . Somatosensory System. Ed. Iggo, A., p. 29-79, Heidelberg:Springer, **1973**.
- Calignano, A., Carnuccio, R., Di Rosa, M. Ialenti, A., Moncada, S. The anti-inflammatory effect of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. *Agents Actions*. 16, p. 60-62, **1985**.
- Campos, JÁ., Silva, AO, López, M, Freira-Maia, L. Signs, symptoms and treatment of severe scorpions sting in children,. In: Natural Toxins. Eds. Eaker and Wodstron, Oxford: Pergamon Press, p. 61, **1980**.
- Carnuccio, R., Di Rosa, M., Ialenti, A., Iuvone, T., Sautebin, L. Selective inhibition by vasocortin of histamine release induced by dextran and concanavalin-A from rat peritoneal cells. *Br. J. Pharmacol.* 98, p. 32-34, **1989**.
- Chang, SL. E Quastel, JH. *Biochem. Pharmacol.* 19, p. 1071, **1970**.
- Chau, T.T., Lewis, A.C., Walter, T.L., Carlson, R.P., Weichman, B.M. Evidence for a role of bradykinin in experimental pain models. *Agents Actions*. 34, p. 235-238, **1991**.
- Chávez-Olórtegui, C., Fonseca, SCG., Rezende, NA., Amaral, CFS., Diniz, CR. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenomig by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 32, p. 1649-1656, **1994**.
- Chávez-Olórtegui, C., Kalpothakis, E., Ferreira, A.M.B.M., Ferreira, A.P. e Diniz, C.R. Neutralizing capacity of antibodies elicited by non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. v. 35, n. 2, p. 213-221, **1997**.
- Clissold, SP. Paracetamol and pheacetin. *Drugs*. 32, p. 46-59, **1986**.
- Coderre, T.J., Abbot, F.V., Melzack, R. Effects os peripheral antisymphathetic treatments in the tail-flick, formalin and autotomy tests. *Pain*. 18, p. 13-23, **1984**.
- Corrado, A.P, Antonio, A. e Diniz, C.R. Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*), na unusual sympathetic postganglionic stimulant. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 164, p. 253-258, **1968**.
- Corrado, A.P, Ricciop Neto, F., Antonio, A. The mechanism of the hypertensive effect of brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus* Lutz e Mello). *Toxicon*, 12, p. 145-150, **1974**.

- Corrêa, M.M., Sampaio, S.V., Lopes, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, O.A.B., Franco, J.J. e Giglio, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its ajor neurotoxin tityustoxin-1. *Toxicon*. v. 35, n. 7, p. 1053-1067, **1997**.
- Costello, A.H., Hargreaves, K.M. Supression of carrageenan hyperalgesia: hyperthermia and edema by a bradykinin antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 171, p. 259-263. **1989**.
- Cunha FQ; Teixeira MM; Ferreira SH Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia : *Br J Pharmacol*; 127(3):671-8, 1999 Jun.
- Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Poole, S. e Ferreira, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br. J. Pharmacol.* 104, p. 765-767, **1991**.
- Cunha, FQ., Poole, S., Lorenzetti, BB., Ferreira, SH. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, p. 660-664, **1992**.
- Cunha-Melo, JR. Mecanismo da ação da Tityustoxina sobre a musculatura lisa intestinal isolada. *Revta. Bras. Pesq. Med. Biol.* 10, p. 65-66, **1977**.
- Daftary, S.N., Mehta, A.C. e Nanavati, M. A controlled comparasion of dypirone and paracetamol in post-episiotomy pain. *Curr. Med. Res. Opin.* 6, p. 614, **1980**.
- Dalessio, D.J. Wolff's headache and other head pain. New York: Oxford University Press. **1972**.
- De Campos, RO., Alves, RV., Kyle, DJ., Chakravarty, S., Mavunkel, BJ., Calixto, JB. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 316, p. 277-286, **1996**.
- De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennet, B., Figdor, C. G. e Devries, J. E. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: na autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, p. 1209-1220, **1991b**.
- De Waal Maiefyt, R., Haanen, J. Spits, J. Roncarolo, M.G., Tevelde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. e Devries, J. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II

major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174, p. 915-925, **1991a**.

Dembiska-Kiec, a., Zmuda, A., Krupinska, J. Inhibition of prostaglandin synthetase by aspirin-like drugs in different microsomal preparations. In: Advances in Prostaglandins and Tromboxane Research, vol.1. Ed. Samuelson, B. & Paoletti, R. New York: Raven Press, p. 99-103, **1976**.

Di Rosa, M. Giroud, J.P., Willoughby, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory responses in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *J. Pathol.* 104, p. 15-29, **1971**.

Di Rosa, M., Sorrentino, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Eur. J. Pharmacol.* 4, p. 340-342, **1968**.

Dinarello, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* 77, p. 1627-1652, **1991**.

Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Hgari, I.S., Palladino, J.R.M.A., O'Connor, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* 163, p. 1443-1449, **1986**.

Dinarello, CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *New England J. Medicine.* 311, p. 1413-1418, **1984**.

Diniz, CR. Chemical and pharmacological aspects of Titynae venoms. In: Arthropod Venoms, Handbook Of Experimental Pharmacology. (Bettini, S. ed) New York, p. 379-391, **1978**.

Diniz, CR. Gonçalves, JM. *Biochim. Biophys. Acta.* 41, p. 407, **1960**.

Diniz, CR., Pimenta AF., Coutinho-Neto, J. Gomez, MV. Effects of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (tityustoxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. *Experientia.* 30, p. 1304-1305, **1966**.

Dray, A., Perkins, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosc.* 16, p. 99-104, **1993**.

Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. In: Nitric Oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Ed. Moncada, S. e Higgs, E.A., Chapter 18, p. 165-170, **1990b**.

- Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186, p. 289-293, **1990a**.
- Duarte, I.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, p. 341-343, **1988**.
- Duarte, I.D.G., Santos, I.R., Lorenzetti, B.B. e Ferreira, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric-cGMP pathway. *European J. of Pharmacol.* 217, p. 225-227, **1992**.
- Dubost, J.J., Sourbrier, M., Ristori, J.M. Na open study of the anti-TNF alpha agent pentoxifylline in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev. Rhum. Engl. Ed.* 64, p. 789-793, **1997**.
- Engelhardt, G. Meloxicam. A potent inhibitor of COX-2. 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds. Florence (Italy), 6-10 June, p. 82, **1995**.
- Ernberg M; Lundeberg T; Kopp S Effect of propranolol and granisetron on experimentally induced pain and allodynia/hyperalgesia by intramuscular injection of serotonin into the human masseter muscle *Pain*; 84(2-3):339-46, 2000 Feb.
- Eschalier, A., Jourdan, D., Courteix, C. Drugs of relief of pain. *Rev. Prat.* 44, p. 1903-1909, **1994**.
- Evora, P.R.B., Pearson, P.J., Discigil, B., Seccombe, J.F., Oeltjen, M. e Schaff, H.V. Óxido nítrico e substâncias vasoativas derivadas do endotélio: papel no controle do tônus vascular. *Ver. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo.* 6, p. 129-137, **1996**.
- Faccioli, H., Souza, G.R.P., Cunha, F.Q., Poole, S., Ferreira, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induced neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions.* 30, p. 344-349, **1990**.
- Ferrandiz, M.L., Foster, S.J. Tumor necrosis factor production in rat airpouch model of inflammation: role of eicosanoids. *Agents Actions.* 32, p. 289-294, **1991**.
- Ferreira, S.H e Nakamura, M. Prostaglandin hyperalgesia. a cAMP/Ca⁺⁺ dependent process. *Prostaglandins.* 18, p. 179-190, **1979**.
- Ferreira, S.H. Are macrophages the body's alarm cells? *Agentes and Actions.* 10, p. 229-230, **1980**.

- Ferreira, S.H. Blockade of inflammatory hyperalgesia and cyclooxygenase-2. In: *New Targets in inflammation – Inhibitors of COX-2 or adhesion Molecules*. Chapter 4, Editors: Bazan, N., Botting, I. and Vane, J., p. 39-46, **1996**.
- Ferreira, S.H. e Lorenzetti, B.B. Prostaglandin hyperalgesia. IV: a metabolic process. *Prostaglandin*. 5, p. 789-792, **1981**.
- Ferreira, S.H. Lorenzetti, B.B e Campos, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*. 42, p. 365-371, **1990**.
- Ferreira, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biol*. 240, p. 200-203. **1972**.
- Ferreira, S.H. The role of interleukins and Nitric Oxide in the mediation of inflammatory Pain and its Control by Peripheral Analgesics. *Drugs* .46, p. 1-9, **1993c**.
- Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Michelin, M.A., Perretti, M., Flower, R.J. e Poole, S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *British J. Pharmacol*. 121, p. 883-888, **1997**.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B. e Corrêa, F.M.A Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmac*. 53, p. 29-48, **1978a**.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B. e Poole, S. Bradykinin initiates cytokines mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol*. 110, p. 1227-1231, **1993a**.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Bristow, A.F., Poole, S. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by tripeptide analogue. *Nature*. 334, p. 698-699, **1988**.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Castro, M.S.A e Corrêa, F.M.A. Antialgic effect of aspirin-like drugs and the inhibition of prostaglandin synthesis. *The recognition of anti-rheumatic Drugs*. P. 25-37, **1978c**.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Cunha, F.Q. e Poole, S. Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents and Actions*. 38, Special Conference Issue, p. c7-c9, **1993b**.
- Ferreira, S.H., Moncada, S. e Vane, J.R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from spleen. *Nature*. 231, p. 237-239, **1971**.
- Ferreira, S.H., Nakamura, M. e Castro, M.S.A The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins*. 16, p. 31-37, **1978b**.

- Ferreira, SH and Lorenzetti, BB. Glutamate Spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacol.* 33, p. 1479-1485, **1994**.
- Ferreira, SH. Peripheral and central analgesia. In: Advance in Pain Research and Therapy, eds. Bonica, JJ, Lindblom, U. and Iggo, A. , New York, p. 627, **1982**.
- Ferreira, SH, Vane, JR. Prostaglandins: their disappearance from and release in the circulation. *Nature.* 216, p. 864-873, **1967**.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mossmann, T.R., Howard, M. e O'Garra, A. Two types of mouse helper T cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp. Med.* 170, p. 2081-2095, **1989**.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mossmann, T.R., Howard, M. e O'Garra, IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, p. 3815-3822, **1991**.
- Flower, R., Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamido-phenol). *Nature.* 240, p. 410-411, **1972**.
- Flower, R.J., Rothwell, N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, p. 71-76, **1994**.
- Freire-Maia, L. e Campos, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. *Natural toxins-Characterization, Pharmacology and therapeutics.* p. 139-159, **1989**.
- Freire-Maia, L. e Ferreira, CF. Estudo do mecanismo da hiperglicemia e da hipertensão arterial produzidas pelo de escorpião no cão. *Mems Inst. Oswaldo Cruz.* 59, p. 11, **1961**.
- Freire-Maia, L., Pinto, Gl., Franco, I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 183, p. 207-213, **1974**.
- Fu, J-Y, Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P. The induction and supression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265, p. 16737-16740, **1990**.
- Fujiyoshi, T., Hayashi, I., Oh-ishi, S., Kuwashima, M. Iida, H. Dozen, M., Taniguchi, N., Ikeda, K. e Ohnishi, H. Kaolin-induced pain for assessment of anagesic agents. *Agents Actions.* 27, p. 332-334, **1989**.

- Furchgott, R.F. e Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, p. 373-376, **1980**.
- Furchgott, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activated inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing of vasodilation. New York: Raven Press, p. 401-414, **1988**.
- Goetzi, E.L. e Pickett, W.C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *J. Immunol.* 125, p. 1789-1791, **1980**.
- Goie, H.S., Lund, B., Distel, M.R., Bluhmki, E. A double-blind, randomized trial to compared meloxicam 15 mg with diclofenac 100 mg in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 5, p. 283-288, **1997**.
- Gomez, M.V. e Diniz, C.R. *Mem. Inst. Butantan (São Paulo)*. n. 33, p. 899-902, **1966**.
- Gomez, M.V. e Santos A.S.U. Effects of scorpion venom tityustoxin on regional brain acetylcholine levels in the rat. *J. Neurochem.* v. 29, p. 397-398, **1977**.
- Gomez, M.V., Dai, M.E.M. e Diniz, C.R. Effect of scorpion venom, Tityustoxin, on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. *J. Neurochem.* v. 20, p. 1051-1061, **1973**.
- Gomez, M.V., Diniz, C.R. e Barbosa, T.S. *J. Neurochem.* v. 24, p. 331-336, **1975**.
- Gomez-Vera. Picadura por alacrán en niños. Estudio de 100 casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 40(12):707-710, **1993**.
- Goodman, Louis S. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9ª edição. Editora McGraw-Hill Companies, Inc., **1996**.
- Graves, M.W., McDonald-Gibson, W. Itch: role of prostaglandins. *Br. Med. J.* 3, p. 608-609, **1973**.
- Griswold, D.E., Marshall, P., Martin, L. Webb, E.F., Zabko-Potapovich, B. Analgetic activity of SK&F 105809, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. *Agents Actions Suppl.* 32, p. 113-117, **1991**.
- Gueron, M. e Ovsyscher, I. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? *Toxicon*. v. 25, p. 121-124, **1987**.

- Gwee, MCE., Cheah, LS., Gopalakrishnakone, P. Involvement of the L-arginine-nitric Oxide synthase pathway in the relaxant responses of the rat isolated anoccygeus muscle to a scorpion (*Leirus quinquestriatus quinquestriatus*) venom. *Toxicon*, 9, p. 1141-1150, **1995**.
- Hardy, JD., Wolff, HG. And Goodell, H. In: *Pain sensations and reactions*. Williams and Wilkins. Eds. New York. **1967**.
- Hassan, F. Production of scorpion antivenom. In: *Handbook of Natural Toxins. Volume 2. Insects Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*, New York, p. 577-605, **1984**.
- Headley, S.L., Spencer, S.P.J. Analgesic activity after intracerebral injection in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 35, p. 361-363, **1969**.
- Heapy, C.G., Farmer, S.C. e Shaw, J.S. The inhibitory effect of HOE 140 in mouse abdominal constriction assays. *Br. J. Pharmacol.* 104, p. 455, **1991**.
- Hemler, M., Lands, W.E.M., Smith, W.L. Purification of the cyclo-oxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of the two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 251, p. 5575-5579, **1976**.
- Henriques, MC and Gomez, MV. Effect os scorpion, tiyustoxin, on the uptake of calcium by isolated nerve ending particles from braim. *Brain Research.* 93, p. 182-187, **1975**.
- Hess, M.E. e Haugaard, N. The effect of epinephrine and aminophyline on the phosphorylase activity of perfused contracting heart muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 122, p. 169-175, **1958**.
- Higgs, E.A., Moncada, S. e Vane, J.R. Polymorphonuclear leukocytes produce thromboxane A₂-like activity during phagocytosis. *Prostaglandins.* 16(2), p. 153-162, **1978**.
- Hock, F.J., Wirth, K., Albus, U., Linz, W., Gerhards, H.J., Wiemer, G., Henke, St., Breipohl, G., König, W., Knolle, J. e Schölkens, B.A. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. *BR. J. Pharmacol.* 102, p. 769-773, **1991**.
- Holgate, ST. The pathophysiology of bronchial asthma and targets for its drugs treatment. *Agents Actions.* 18, p. 281-287, **1986**.

- Howard, M., O'Garra, A. Biological properties of IL-10. *Immunology Today*. 13, p. 198-200, **1992**.
- Ialenti, A., Inaro, A., S., Moncada, S. e Di Rosa, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 211, p. 177, **1992**.
- Ibrahim, S.A. Phospholipase A in scorpion venoms. *Toxicon*. v. 5, p. 59-60, **1967**.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Wood, K.S. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similiary to nitric oxide radical. In: New York: Raven Press, p. 427-435, **1988**.
- Ishii, K., Motoyoshi, S., Kawata, J. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitions in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 65, p. 297-303, **1994**.
- Joris, I., Majno, G., Corey, E.J., Lewis, R.A. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E₄. Endothelial contraction. *Am. J. Pathol.* 126, p. 19-24, **1987**.
- Juan, H. and Lembeck. Inhibition of action prostaglandins on paravascular pain receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac.* 285, p. 36, **1974**.
- Katayama, Y., Watkins, L.R., Becker, D.P., Hayes, R.L. Non-opiate analgesia induced by carbachol microinjection into the pontine parabrachial region of the cat. *Brain Res.* 296, p. 263-283, **1984**.
- Keele, C.A. e Armstrong, D. Substances producing pain and itch. London:Edward Arnold **1964**.
- Khasar SG; McCarter G; Levine JD Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors *J Neurophysiol*; 81(3):1104-12, 1999 Mar.
- Kirsch, G.E., Shattebol, A., Possani, L.D., Brown, A.M. *J. Gen. Physiol.* 93, p. 67-83, **1989**.
- Kress M; Rodl J; Reeh PW Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro *Neuroscience*; 74(2):609-17, 1996 Sep.
- Kulmacz, R.J. Topography of prostaglandin H synthase. Antiinflammatory agents and the protease-sensitive arginine 253 region. *J. Biol. Chem.* 264, p. 14136-14144, **1989**.

- Kumazawa, T. e Mizura, K. Mechanical and thermal responses of polymodal receptors recorded from the superior spermatic nerve of dogs. *J. Physiol.* 299, p. 233-245, **1980**.
- Laneuville, O., Breuer, D.K., DeWitt, D.L., Hla, T., Funk, C.D., Smith, W.L. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, p. 927-934, **1994**.
- Langer, S.Z, Adler-Graschinski, E., Pinto de Almeida, A. e Diniz, C.R. Prejunctional effects of purified toxin from the scorpion *Tityus serrulatus* release of ³H-Noradrenaline and enhancement of transmitter overflow elicited by nerve stimulation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch, exp. Path. Pharmacol.*, n. 287, p. 243-259, **1975**.
- Levine, J.D., Yetunde, O. T., Heller, P.H. Hyperalgesic pain: inflammatory and neuropathic. Hyperalgesia and Allodynia. Raven Press, Ltd., New York, chapter 8, p. 117-121, **1992**.
- Lewis, T. The blood vessels of the human skin and their responses. London: Shaw and Sons, **1927**.
- Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm. Res.* 45, p. 308-311, **1996**.
- Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. Mode of analgesia action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 114, p. 375, **1985**.
- Loret, EP., Martim, MF., Monsuelle, P. Sampieri, F., Granier, C. Rochat, M. *Biochemistry.* 30, p. 633-640, **1991**.
- Macedo, TM., Gomez, MV. Effects of tityustoxin (TsTx) from scorpion venom on the release and synthesis of acetylcholine in brain slices. *Toxicon.* 20, p. 601-606, **1982**.
- Magalhães, O. Escorpionismo, III Memoria. *Annaes Fac. Med.* Belo Horizonte, vol. 1, **1935**.
- Marangoni, S., Toyama, M.H., Arantes, E.C., Giglio, J.R., Silva, C.A., Carneiro, E.M., Gonçalves, A.A. e Oliveira, B. Amino acid sequence of TsTX-V, na α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of β -cells from

- isolated rat islets of Langerhans. *Biochimica et Biophysica Acta*. n. 1243, p. 309-314, **1995**.
- March, C.J. et al, *Nature*. 315, p. 641-646, **1985**.
- Marney, SR Jr. Mast cell disease. *Allergy Proc.* 13, p. 303-310, **1992**.
- Marquez, J.O. e Ferreira, S.H. Regional dypirone nociceptor blockade: a pilot study. *Brazilian J Med Biol. Res.* 20, p. 441-444, **1987**.
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Seibert, K., Needleman, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J. Clin. Invest.* 86, p. 1375-1379, **1990**.
- Matsuda, Tityus serrulatus, Hata, F. Yoshida, H. *Biochim. Biophys. Acta.* 150, p. 739, **1968**.
- McLeod AL; Ritchie J; Cuello AC; Julien JP; Henry JL; Ribeiro-da-Silva A
Upregulation of an opioid-mediated antinociceptive mechanism in transgenic mice over-expressing substance P in the spinal cord *Neuroscience*; 96(4):785-9, 2000.
- McLeod AL; Ritchie J; Cuello AC; Julien JP; Ribeiro-Da-Silva A; Henry JL
Transgenic mice over-expressing substance P exhibit allodynia and hyperalgesia which are reversed by substance P and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists *Neuroscience*; 89(3):891-9, 1999 Mar.
- McMahon, S.B. Koltzenburg, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends in Neurosciences.* 13, p. 199-201, **1990**.
- Meade, E.A., Smith, W.L., De Wint, D.L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide-synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 268, p. 6610-6614, **1993**.
- Metys, J., Wagner, N., Metysova, J. Hertz, A. Studies on the central antinociceptive actions of cholinomimetic agents. *Int. J. Neuropharmacol.* 8, p. 413-425, **1969**.
- Mion, F, Cuber, JC, Minaire, Y, Chayvialle, JÁ. Short term effects of indomethacin on rats small intestinal permeability. Role of eicosanoids and platelet activating factor. *Gut.* 35, p. 490-495, **1994**.
- Mitchell, J.A., Akaaarasereenont, P., Thierermann, C., Flower, R.J. e Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, p. 11693-11697, **1993**.

- Moncada, S., et al. Nitric oxide. *Pharmacol. Ver.* 43, p. 109, **1991**.
- Moncada, S., Ferreira, S.H. e Vane, J.R. Inhibition of prostaglandins biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. *Eur. J. Pharmacol.* 31, p. 250-2560, **1975**.
- Moncada, S., Ferreira, S.H. e Vane, J.R. Pain and inflammatory mediators. In: *Inflammation Handbook of Experimental Inflammation*. Ed. Vane, J.R. & Ferreira, S.H., p. 588-616. Berlim: Springer, **1978**.
- Morales Aguilera, A. e Vaughan Williams, E.M. Los efectos de los bloqueadores beta adrenérgicos sobre el músculo auricular, en relación com su actividad como anestésicos locales. *Acta Physiol. Latinoamer.* 16, p. 80, **1966**.
- Moss, J., Thoa, N.B., Kopin, I.J. On the mechanism of scorpion toxin-induced release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* n. 190, p. 39-48, **1974**.
- Moss, J., Thoa, N.B., Kopin, I.J. Scorpion venom-induced discharge of catecholamines accompanied by hypertension. *Brain Res.* 54, p. 381-385, **1973**.
- Mousli, M., Branner, C., Landry, Y., Bockaert, J. Rouot, B. Direct activayion of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) bu substance P and compoud 48/80. *FEBS Lett.* 259, p. 260-262, **1990a**.
- Mousli, M., Branner, C., Landry, Y., Bockaert, J. Rouot, B. Interaction of substance P, copound 48/80 and mastoparan with the alpha-subunit C-terminus of G protein. *Immunol. Lett.* 25, p. 355-357, **1990**.
- Mukherjee, S. e Sudha, S. A controlled evaluation of orally administered aspirin, dyprone and placebo in patients with post-operative pain. *Cur. Med. Res. Opin.* 6,p. 619, **1980**.
- Munglani R; Bond A; Smith GD; Harrison SM; Elliot PJ; Birch PJ; Hunt SP Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia *Pain*; 63(1):21-31, 1995 Oct.
- Murphy, R.C., Hammarström, S., Samuelsson, B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 76, p. 4275-4279, **1979**.

- Nahin RL; Ren K; De Leon M; Ruda M Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain *Pain*; 58(1):95-108, 1994 Jul.
- Nakamura, M. e Ferreira, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 135, p. 145-153, **1987**.
- Narahashi, T. *Physiol. Rev* 54, p. 813, **1974**.
- Narahashi, T., Shapiro, B.I., Deguchi, T., Scuka, M., Wang, Ch.M. Effects of scorpion venom on squid axon membranes. *Amer. J. Physiol.* n. 222, p. 850-857, **1972**.
- Novaes, G., Chetto-De-Queiroz, A. Carvalho-Cardoso, C. Burlacchini de Carvalho, M.H., Ribeiro-Filho, L.A. e Oliveira-Gonçalves, A. Nesidioblastosis associated with chronic experimental pancreatitis produced by a scorpion toxin, tityustoxin, in rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v. 23, p. 1149 - 1151, **1990**.
- O'Banion, M.K., Winn, V.D., Young, D.A. c-DNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, p. 4888-4892, **1992**.
- Oliveira, MJ., Fontana, MD., Giglio, JR., Sampaio, SV., Corrado, AP., Prado, WA.. Effects of the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and two of its fractions on the isolated diaphragm of the rat. *Gen. Pharmacol.* 20, p. 205-210, **1989**.
- Ossipov MH; Lopez Y; Nichols ML; Bian D; Porreca F Inhibition by spinal morphine of the tail-flick response is attenuated in rats with nerve ligation injury *Neurosci Lett*, 199(2):83-6, 1995 Oct 20.
- Ossipov, M.H., Gebhart, G.F. Opioid, cholinergic and α -adrenergic influences on the modulation of nociception from the lateral reticular nucleus of the rat. *Brain Res.* 384, p. 282-293, **1986**.
- Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A., James, S.L. Interleukin-10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon gamma induced activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, p. 8676-8680, **1992**.
- Paalzow GH Noradrenaline but not dopamine involved in NMDA receptor-mediated hyperalgesia induced by theophylline in awake rats *Eur J Pharmacol*; 252(1):87-97, 1994 Jan 24.

- Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.C., Walker, M.J.A., Hoffman, B.B. Farmacologia Integrada. 1ª edição. Ed. Manole, São Paulo, **1999**.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, p. 664-666, **1988a**.
- Palmer, R.M.J., Rees, D.D., Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys Res Commun*. 153, p. 1251-1256, **1988b**.
- Parthasarathy, P.R. e Venkaiah, B. Histopathological study on the effect of venom from scorpion *Heterometrus fulvipes*. *Ind. J. Path. Microbiol.* n. 29, p. 155-158, **1986**.
- Pearl, ER. Sensitization of nociceptors and its relation to sensation. In: Advances in Pain Research and Therapy, eds. Bonica, JJ e Albe-Fessard, D. New York, P. 17-34. **1976**.
- Pedigo, N.W., Dewey, W.L., Harris, L.S. Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193, p. 845-852, **1975**.
- Petrova, L., Nikolova, R., Nikolov, R. Stefanova, L. Dypirone and Acetylsalic Acid comparative Pharmacological Research. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic action. In: Proceedings of Dypirone Symposium Moscow, eds. R. Ovtcharov and W. Pola (F.K. Schattawer Verlag, Stuttgart), p. 99, **1980**.
- Pinto de Almeida, A. liberação de noradrenalina do músculo cardíaco de cobaio pela Tityustoxina. *Tesis*. (Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto), **1978**.
- Poole, S., Cunha, F.Q. e Ferreira, S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. *Cytokines and pain*. p. 59-87. Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland, **1999a**.
- Poole, S., Lorenzetti, BB., Cunha, JM., Cunha, F.Q. e Ferreira, S.H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor α and inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 126, p. 649-656, **1999b**.
- Poole, S., Cunha, F.Q., Selkirk, S., Lorenzetti, B.B. e Ferreira, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *British J. Pharmacol.* 115, p. 684-688, **1995**.

- Possani, L.D., Fletcher JR, M., Rode, G.S., Mochica-Morales, J., Lucas, S., Coronas, F.V., Alagoni, A.C. e Martin, B.M. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Mem. Inst. Butantan*. v. 54, n. 2, p.35-52, **1992**.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D. e Fletcher JR, P.L. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 266, n. 5, p. 3178-3185, **1991**.
- Possani, L.D., Alagoni, A.C., Fletcher, P.L., Jr., e Frickson, B.W. *Arch Biochem Biophys*. n. 180, p. 394-403, **1977**.
- Rainsford, K.D., Ying, C., Smith, F. Selective effects of some 5-lipoxygenase inhibitors on synovial interleukin-1 (IL-1) production compared with IL-1 synthesis inhibitors. *Agents Actions*. 39, p. 86-88, **1993**.
- Ramos, A.O. E Corrado, A.P. Efeito hiperpiético do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. *Anais Fac. Med. Univ. S.Paulo*, 28, p. 81, **1954**.
- Randall, L.O. e Selitto, J.J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch Int. Pharmacodyn*, 111, p. 409-411, **1957**.
- Rang e Dale. *Farmacologia*. 3ª edição. Editora Guanabara Koogan, **1997**.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J., Hodson, H.F., Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol*. 96, p. 418-424, **1984**.
- Revelo, M.P., Bambirra, E. A., Ferreira, A.P., Diniz, C.R. e Chávez-Olórtegui, C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1119-1125, **1996**.
- Rezende, N.A., Dias, M.B., Campolina, D., Chaves-Olórtegui, C., Amaral, C.F.S. Standardization of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting circulating toxin venom antigens in patients stung by the scorpion *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*, 37, p. 71-74, **1995**.
- Ricciopo Neto, F. effects of the venom of the Brazilian scorpion (*Tityus serrulatus*) on the action potential of the rabbit vagus nerve fibres. *Br. J. Pharmacol*. n. 23, p. 353-358, **1983**.

- Robbins, Cotran e Kumar. Patologia estrutural e funcional. 5ª edição. Editora Guanabara Koogan, **1994**.
- Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V. e Brammer, M.J. Modulation of Ca⁺⁺-stimulated glutamate release from synaptosomes by Na⁺ entry through tetrodotoxin-sensitive channels. *Biochem. J.* , n. 304, p. 353-357, **1994a**.
- Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Gomez, M.V., Moraes-Santos, T. e Brammer, M.J. *Neurosci.* , n. 169, p. 90-92, **1994b**.
- Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, AM., Gomez, M.V., Cordeiro, MN., e Brammer, M.J. *Biochem. J.* , n. 296, p. 313-319, **1993**.
- Rosenthale, ME., Dervinis, A., Kassarich, J., Singer, S. Prostaglandins and anti-inflammatory drugs in the dog knee joint. *Eur. J. Pharmacol.* 24, p. 149-152, **1972**.
- Rouzer, CA, Ford-Hutchinson, AW., Morton, HE., Gillard, JW. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-Lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J. Biol. Chem.* 265, p. 1436-1442, **1990**.
- Safieh-Garabedian B; Dardenne M; Kanaan SA; Atweh SF; Jabbur SJ; Saade NE
The role of cytokines and prostaglandin-E(2) in thymulin induced hyperalgesia
Neuropharmacology; 39(9):1653-61, 2000 Jul 10.
- Sampaio, S.V., Coutinho-Neto, J., Arantes, E., Marangoni, S. , Oliveira, B. e Giglio, J.R. Isolation of Toxin TsTx-VI from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. *Biochem. Molec. Biol. Int.* n. 39, p. 729-740, **1996**.
- Sampaio, SV, Laure, CJ., Giglio, JR. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon.* 21, p. 265-277, **1983**.
- Santana, G.C., Freire, A.C.T., Ferreira, A.P.L., Cháves-Olórtegui, C., Diniz, C.R, e Freire-Maia, L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorio venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon.* v. 34, n. 9, p. 1063-1066, **1996**.

- Sautebin, L. Carnuccio, R., Ialenti, A., Di Rosa, M. Lipocortin and vasocortin: two species of anti-inflammatory proteins mimicking the effects of glucocorticoids. *Pharmacol Res.* 25, p. 1-12, **1992**.
- Savino, E.A. e Catanzaro, O.L. Effects of tityustoxin on the rat isolated tail artery. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, v. 35, p. 119-127, **1985**.
- Saxena, P.N., Beg, N.M.A., Singhal, K.C., Ahmad, M. Prostaglandin-like activity in the cerebrospinal fluid of febrile patients. *Indian J. Med. Res.* 79, p. 495-498, **1979**.
- Schandene, L., Vandebussche, P., Crusiaux, A., Alegre, ML., Dupont, E. Goldman, M. Differential effects of pentoxifylline on the production of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by monocytes and T cells. *Immunology.* 76, p. 30-34, **1992**.
- Schuligoi R Effect of colchicine on nerve growth factor-induced leukocyte accumulation and thermal hyperalgesia in the rat *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 358(2):264-9, 1998 Aug.
- Schuligoi R; Amann R Differential effects of treatment with nerve growth factor on thermal nociception and on calcitonin gene-related peptide content of primary afferent neurons in the rat *Neurosci Lett.* 252(2):147-9, 1998 Aug 14.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, p. 12013-17, **1994**.
- Sharma, S., Prasad, A., Anand, KS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of pain and inflammation: a basis for drugs selection. *Am. J. Ther.* 6, p. 3-11, **1999**.
- Sicuteri, F., Franciullacci, F.M., Franchi, G. e Del Bianco, P.L. Serotonin-bradykinin potentiation of the pain receptors in man. *Life Sci.* 4, p. 309-316, **1965**.
- Sluka KA Activation of the cAMP transduction cascade contributes to the mechanical hyperalgesia and allodynia induced by intradermal injection of capsaicin *Br J Pharmacol*; 122(6):1165-73, 1997 Nov.
- Smith JA; Amagasu SM; Eglen RM; Hunter JC; Bley KR Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones *Br J Pharmacol*; 124(3):513-23, 1998 Jun.

- Smith, J.B. e Willis, A.L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature new Biol.* 231, p. 235-237, **1975**.
- Sofer, S., Gueron, M., White, R.M., Lifshitz, M. e Apte, R.N. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, v. 34. n. 3, p. 389-392, **1996**.
- Solomon. L.M., Juhlin, L., Kirchenbaum, M.B. Prostaglandins of cutaneous vasculature. *J. Invest. Derm.* 51, p. 280-282, **1968**.
- Souza, MH, Melo-Filho, AA., Rocha, MF., Lyerly, DM., Cunha, FQ., Lima, AA., Ribeiro, RA. The involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. *Immunology*. 91, p. 281-288, **1997**.
- Steranka, L.R., Dehaas, C.J., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Enna, S.J., Snyder, S.H. Antinociceptive effects of bradykinin antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 136, p. 261-262, **1987**.
- Stricker, S. *Sitzb Kaiserl Akad Wissench.* 3, p. 173-185, **1876**.
- Striter, RM., Remick. DG., Ward, PA., Spengler, RN. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun.* 30, p. 1230-1236, **1988**.
- Sullivan, GW, Carper, HT., Novick, WJ jr, Mandell, GL. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun.* 56, p. 1722-1729, **1988**.
- Teixeira, CE., Bento, AC., Rodrigo, AB, Lopes-Martins, Teixeira, AS., Muscará, MN., Arantes, EC., Giglio, JR., Antunes, E., Nucci, G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrenergic nerve fibres. *Br. J. Pharmacol.* 123, p. 435-442, **1998**.
- Toledo, D. e Neves, A.G.A. *Comp. Biochem. Physiol.* n. 55B, p. 249-253, **1976**.
- Tonussi, C.R, e Ferreira, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur. J. Pharmacol.* . 14, p. 173-179, **1993**.
- Tracey, K.J. e Cerami, A. Tumor necrosis factor, cytokines and disease. *Ann. Ver. Cell Biol.*9, p. 317, **1993**.
- Vane, J.R. e Botting, R.M. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* 1, p. 89-96, **1987**.

- Vane, J.R. e Botting, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol.* 25 (suppl. 102), p. 9-21, **1996**.
- Vane, J.R. e Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Anti-inflammatory drugs.* 44, p. 1-10, **1995**.
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature new Biol.* 231, p. 232-235, **1971**.
- Vanegas H; Schaible H Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia *Pain*; 85(1-2):9-18, 2000 Mar.
- Varvrek, R.J. e Stewart, J.M. Development and modification of competitive antagonists of bradykinin. In: Peptides, Structure and Fuction. Proc. (th Amer. Peptide Symp. Ed. Deber, C.M., Hruby, V.L. e Kopple, K.D., p. 655-658. Rockford Il: Pierce Chem. Comp., **1985**.
- Velasco-Castreión, O., R. Lara-Aguillera, e H. Alátorre. Aspectos epidemiológicos y clínicos del la picadura de alacrán en una área hiperendémica. *Ver. Inv. Salud Pública, México*, n. 36, 93-103, **1976**.
- Vital Brazil, O, Neder, A.C. e Corrado, A.P. Effects and mechanism of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. *Pharmacol. Res. Comm.* 5, p. 137-150, **1973**.
- Vital Brazil, O. In: Farmacodinâmica. (Corbett, CE., ed), Porto Alegre, Guanabara Koogan, p. 1044-1074, **1982**.
- Wallner, B.P., Mattaliano, R.J., Hession, C., Cate, R.L., Tizard, R., Sinclair, L.K. et al. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A₂ inhibitor with potent anti-inflammatory activity. *Nature.* 320, p. 77-81, **1986**.
- Wang JF; Khasar SG; Ahlgren SC; Levine JD Sensitization of C-fibres by prostaglandin E2 in the rat is inhibited by guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), 2',5'-dideoxyadenosine and Walsh inhibitor peptide *Neuroscience*; 71(1):259-63, 1996 Mar.
- Watkins LR; Martin D; Ulrich P; Tracey KJ; Maier SF Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat *Pain*; 71(3):225-35, 1997 Jul.

- Westwick, J., Li, S.W. e Camp, R.D. Novel neutrophil-stimulating peptides. *Immunol. Today*. 10, p. 146-147, **1989**.
- Whalley, E.T., Clegg, S., Stewart, J.M. e Varvrek, R.J. The effect of kinin agonists and antagonists on the pain response of the human blister base. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 336, p. 652-655, **1987**.
- Wiesenfeld-Hallin, Z. e Hallin, R.G. The influence of the sympathetic system on mechanoreception and nociception, *Human Neurobiol.* 3, p. 41, **1984**.
- Williams, T.J., Peck, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*. 270, p. 530-532, **1977**.
- Wirth, K., Hock, F.J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H.G., Anagnostopoulos, H., Henke, St., Breipohl, G., König, W., Knolle, J. e Schölkens, B.A. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.* 102, p. 774-777, **1991**.
- Wordliczek J; Szczepanik AM; Banach M; Turchan J; Zembala M; Siedlar M; Przewlocki R; Serednicki W; Przewlocka B The effect of pentoxifiline on post-injury hyperalgesia in rats and postoperative pain in patients *Life Sci*; 66(12):1155-64, 2000 Feb 11.
- Yaksh, T.L., Dirksen, R., Harty, G.I. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetics drugs in the rats and cat. *Eur. J. Pharmacol.* 117, p. 81-88, **1985**.
- Yashpal K; Henry JL Adenosine receptor link in an adrenal opioid-induced antinociception in the rat tail-flick test *Neurosci Lett*, 138(2):253-6, 1992 Apr 27.
- Yatani, AA., Kirsch, GE., Possani, LD., Brown, AM. Effects of New World scorpiontoxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *Am. J. Physiol.* 254, p. H443-H451, **1988**.
- Zabel, P., Wolter, DT., Shade, UF. Effects of pentoxifylline in endotoxemia in human volunteers. *Prog. Clin. Biol. Res.* 367, p. 207-213, **1991**.
- Zabel, P., Wolter, DT., Shade, UF. Oxypentifylline in endotoxaemia. *Lancet*. 2, p. 1474-1477, **1989**.
- Ziegler EA; Magerl W; Meyer RA; Treede RD . Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli. Central sensitization to A-fibre nociceptor input. *Brain*; 122 (Pt 12):2245-57, 1999 Dec.

Zlotkin, E., F. Miranda, and H. Rochat. Venoms of Buthinae. C, Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 48. Springer-Verlag, Berlin. p. 371-369, **1976**.

Zlotnik, A., Moore, K.W. Interleukin-10. *Cytokine*. 3, p. 366-371, **1991**.

8 - RESUMO

8- Resumo

Várias são as espécies de escorpião encontradas no Brasil, sendo que o *Tityus serrulatus*, comumente chamado de escorpião-amarelo, é o principal responsável pelos acidentes mais graves.

No Brasil, aproximadamente 10.000 casos de picadas de *Tityus serrulatus* são notificados anualmente, sendo que 50% dos casos ocorrem no Estado de Minas Gerais. A espécie *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo) é a mais comum e com picadas fatais, especialmente em crianças, com índice de mortalidade maior que 1,1% .

O envenenamento por escorpião *Tityus serrulatus* é mais significativo sob o ponto de vista clínico que o *T. bahiensis*, por provocar sinais e sintomas mais graves. A severidade do envenenamento por *Tityus serrulatus* depende da idade e tamanho do indivíduo picado, sendo grande o índice de severidade do acidente em crianças. Na intoxicação sistêmica, ocorre uma super estimulação do sistema nervoso central, e dos sistemas simpático e parassimpático, com intensa dor local e parestesia, cardiotoxicidade e encefalopatia fatal. Os sintomas ainda incluem: agitação, taquicardia, vômitos, dor abdominal, salivação, diaforese, desidratação, rigidez e contração muscular, tremor, alteração do diâmetro pupilar, hipertermia, taquiarritmias e ocasionalmente bradiarritmias, hipertensão, falência cardíaca, entre outros. Análises laboratoriais incluem anormalidades como: hiperglicemia, leucocitose, elevação transitória das enzimas pancreáticas e cardíacas. (Amitai, 1998)

A injeção de veneno bruto ou de toxinas purificadas do *Tityus serrulatus* produz experimentalmente (em camundongos) efeitos sistêmicos com sinais e sintomas similares aos observados em acidentes de envenenamento com humanos, ou seja, salivação, lacrimejamento, hipersecreção gástrica e pancreática, aumento da motilidade gastrointestinal, arritmias cardíacas e respiratórias, hipertensão arterial seguido de hipotensão, hiperglicemia, taquicardia, midríase e piloereção, entre outros.

Devido aos relatos de dor intensa no local da picada, nestes estudos procuramos elucidar os mediadores envolvidos na gênese da dor inflamatória induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

Utilizamos para avaliar a intensidade hiperalgésica em patas de rato, o método de Randall-Selitto (1957) modificado por Ferreira e cols., 1978a.

No estudo inicial determinamos que o veneno bruto de *Tityus serrulatus* induz hiperalgesia em patas de rato, de forma dose dependente (3.12, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 e 10.0 $\mu\text{g/pata}/100\mu\text{l}$),

O veneno não induziu hiperalgesia na 1ª hora após a sua administração, com exceção da dose máxima de 10 $\mu\text{g/pata}$. Observamos que o pico hiperalgésico induzido pelo veneno ocorreu entre a 3ª e 6ª hora, para todas as doses utilizadas. Analisando a 3ª hora após a administração do veneno, verificamos que as doses de 2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g/pata}$, causaram hiperalgesia significativamente diferente das doses menores que 2,5 $\mu\text{g/pata}$. A dose de 2,5 $\mu\text{g/pata}$ não diferiu estatisticamente da dose de 5,0 $\mu\text{g/pata}$, mas diferiu estatisticamente da dose de 10 $\mu\text{g/pata}$. Baseando-se nestes dados, a dose de 2,5 μg de veneno bruto de *Tityus serrulatus*, avaliada 3 horas após a sua administração na pata, foi considerada uma dose submáxima e por nós escolhida como dose e tempo padrão para os protocolos experimentais subsequentes.

Para verificar a liberação de prostaglandinas, na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, utilizamos duas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), a indometacina e o meloxicam.

A hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*, foi inibida pelo pré-tratamento com indometacina local e sistêmico, sendo essa inibição de forma dose dependente, porém parcial. O meloxicam, da mesma forma que a indometacina, também foi efetivo em prevenir a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente e apenas parcialmente. Estes dados sugerem a participação de prostaglandinas na hiperalgesia induzida pelo veneno.

Para verificar a liberação de aminas simpatomiméticas, na hiperalgesia induzida pelo veneno, utilizamos duas drogas, o atenolol (um β -bloqueador) e guanetidina que depleta os estoques neuronais adrenérgicos de aminas

simpatomiméticas periféricamente. O atenolol inibiu a hiperalgesia de forma dose dependente. O tratamento com guanetidina inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*. A associação de guanetidina (administrada cronicamente) mais atenolol causou uma inibição de 58% da hiperalgesia induzida pelo veneno, sendo essa inibição semelhante ao efeito de cada substância (atenolol ou guanetidina) administrada isoladamente. Estes dados sugerem a participação de um componente simpático na hiperalgesia induzida pelo veneno, sendo que os simpatolíticos são eficientes, porém não totalmente, em prevenir a hiperalgesia induzida pelo veneno.

Conforme os dados obtidos, verificamos a presença de prostaglandinas e de componente simpático na hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*, entretanto mesmo utilizando altas doses de substâncias AINEs ou simpatolíticas, não foi possível prevenir totalmente a hiperalgesia ocasionada pelo veneno.

A associação dos dois grupos de substâncias meloxicam com atenolol e meloxicam com guanetidina, demonstraram que a associação de inibidores da síntese de prostaglandinas (meloxicam) e simpatolíticos (atenolol e guanetidina), preveniram a hiperalgesia induzida pelo veneno em 92,47%. Estes dados demonstram que a prevenção da hiperalgesia ocorre somente de forma completa quando associamos simpatolíticos e AINEs.

No intuito de verificarmos se o veneno liberava citocinas pró-inflamatórias, realizamos o tratamento com substâncias que inibem a liberação de citocinas, como: dexametasona, nimesulide e pentoxifilina. O pré-tratamento com dexametasona, nimesulide e pentoxifilina preveniram significativamente a hiperalgesia induzida pelo veneno, de forma dose dependente. A analgesia induzida pela prévia administração de dexametasona, nimesulide e pentoxifilina, na hiperalgesia induzida pelo veneno, sugerem que neste processo hiperalgésico ocorre a liberação de citocinas.

Para verificarmos se o veneno bruto de *Tityus serrulatus* liberava bradicinina, administramos previamente ao veneno, doses crescentes de HOE-140 que é um antagonista de receptor B2 para bradicinina. O HOE-140 foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente, e estes dados

sugerem que o veneno induz a ativação do sistema de cininas plasmáticas com consequente formação de bradicinina.

O efeito analgésico da dipirona administrada trinta minutos antes do veneno foi dependente da dose. E a prévia administração de LNMMA ou Azul de metileno revertem o efeito analgésico da dipirona administrada duas horas após o veneno. Estes dados sugerem que a dipirona é eficiente em prevenir e reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno, e este efeito analgésico da dipirona é dependente da produção e liberação de NO, visto que inibidor da NOS (LNMMA) ou da Guanilato Ciclase (Azul de metileno), abolem o efeito analgésico da dipirona.

O efeito analgésico do diclofenaco, administrado trinta minutos antes do veneno foi dependente da dose. E a prévia administração de LNMMA ou Azul de metileno, revertem o efeito analgésico do diclofenaco administrado duas horas após o veneno. Estes dados sugerem que diclofenaco é eficiente em prevenir e reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno, e este efeito analgésico do diclofenaco é dependente da produção e liberação de NO, visto que inibidor da NOS (LNMMA) ou da Guanilato Ciclase (Azul de metileno), abolem o efeito analgésico do diclofenaco.

O SNAP (S-nitroso-N-acetil-D, L-penicillamine), é uma droga doadora direta de NO, e para verificarmos se o NO possuía uma atividade analgésica frente a hiperalgesia induzida pelo veneno, realizamos a administração de SNAP em doses crescentes, que inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno de forma dose dependente. Estes dados sugerem que o doadores direto de NO, como o SNAP ou substâncias que atuam ativando a formação de NO, como a dipirona e o diclofenaco, aumentando assim as concentrações de GMPc no neurônio sensorial primário aferente causando a down regulation do nociceptor, são capazes de abolir e/ou reverter a hiperalgesia induzida pelo veneno bruto de *Tityus serrulatus*.

O paracetamol é considerado um anti-inflamatório não Esteroidal, porém dados clínicos sugerem que o mesmo apresenta um efeito analgésico e antipirético mais potente que as substâncias deste grupo, como por exemplo a indometacina ou meloxicam. No intuito de averiguar se o paracetamol, possuía efeito analgésico na hiperalgesia induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus*. O paracetamol preveniu a hiperalgesia causada pela injeção intraplantar de veneno em 86,24%. Estes dados

corroboram com dados clínicos, quanto a potente ação analgésica do paracetamol frente a diferentes quadros de dor.

Para verificar se havia a participação de leucotrienos na hiperalgesia induzida pelo veneno, foi realizado o prévio tratamento com MK886 (um inibidor da síntese de leucotrienos) que inibiu a hiperalgesia induzida pelo veneno, de forma mínima. Estes dados sugerem que os leucotrienos, não apresentam papel relevante na hiperalgesia induzida pelo veneno

Para verificarmos se havia liberação de histamina no processo hiperalgésico induzido pelo veneno, realizamos o prévio tratamento com doses meclisina, que não interferiram com a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de veneno. Para confirmar a participação ou não de histamina, durante o processo de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de veneno de *Tityus serrulatus*, realizamos um protocolo experimental com composto 48/80, que administrado cronicamente, possui a capacidade de depletar os mastócitos dos estoques de histamina. E verificamos que o prévio tratamento com o composto 48/80, não inibe a hiperalgesia induzida pelo veneno. Estes dados sugerem que o veneno não ativa a liberação de histamina oriunda de mastócitos, não ocorrendo a participação deste mediador na hiperalgesia induzida pelo veneno.

Utilizando o método de ELISA, detectamos a participação de citocinas IL-1 β e TNF- α uma e duas horas após a administração intraplantar de veneno bruto de *Tityus serrulatus*, verificando que ocorre a liberação IL-1 β e TNF- α . Estes dados confirmam que o veneno induz a liberação de citocinas durante o processo de hiperalgesia gerado pelo mesmo.

9- ABSTRACT

9- ABSTRACT

In Brazil, there are approximately 10.000 cases of bites by *Tityus serrulatus* reported annually. Fifty percent of these cases occur in the State of Minas Gerais. The species *Tityus serrulatus* (yellow-scorpion) is most common and its bite is fatal, especially among children, with a mortality of 1.1% or higher.

The poisoning by *Tityus serrulatus* scorpion is more significant under a clinical point of view than by *Tityus bahiensis*. It provokes more serious signs and symptoms. The severity of the poisoning by *Tityus serrulatus* depends on the age and size on the perforated individual - the rate is higher among children. In the systemic poisoning, a stimulation of the nervous central system and the sympathetic and parasympathetic systems occurs, with intense local pain and fatal encephalopathy. The symptoms also include: agitation, tachycardiac, vomits, abdominal pain, salivation, diaphoresis, dehydration and muscular contraction, tremors, alteration of the pupillary diameter, arrhythmias, hypertension, cardiac failure, among others. Laboratorial analyses include abnormalities such as: hyperglycemic, leucocytose, transitory rise of pancrethics and cardiac enzymes (Amitai, 1998).

The injection of *Tityus serrulatus* raw poison or purified toxins experimentally produces (in rats) systemic effects with similar signs and symptoms to the ones observed in accidents of poisoning with human beings, which are, salivation, gastric and pancreathic hypersecretion, increase of the gastric motility, cardiac and respiratory arrhythmias, followed by arterial hypertension of hypotension, hyperglycemic, tachycardiac, mydriasis and pyloereticion, among others.

Due to reports of intense pain in the place of the perfuration, we try to elucidate the mediators involved in the genesis of induced inflammatory pain by the *Tityus serrulatus* raw poison.

In order to evaluate the hyperalgesia intensity in rat paw, we use the Randall-Selitto method (1957) modified by Ferreira and cols., 1978a.

In the initial study we determined that the raw venom of *Tityus serrulatus* induces hyperalgesia in rat paw, in a dose dependent (3.12, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/paw}/100\mu\text{l}$),

The venom did not induce hyperalgesia in the first hour after its administration, with exception of the maximum dose of 10µg/paw. We observed that the induced hyperalgesia peak for the venom occurred between the 3rd and 6th hour, for all the used doses. Analyzing the 3rd hour after the venom administration, we verified that the doses of 2.5; 5.0 and 10µg/paw caused hyperalgesia significantly different from the lower doses of 2,5µg/paw. The dose of 2,5µg/paw did not differ statistically from the dose of 5,0µg/paw, but it differed statistically from the dose of 10µg/paw. Based on these data, the dose of 2,5 µg of *Tityus serrulatus* raw venom, evaluated 3 hours after its administration in the paw, was considered a submaximum dose and chosen by us as the standard dose and time for the subsequent experimental protocols.

In order to verify the release of prostaglandins, in the hyperalgesia induced by the *Tityus serrulatus* raw venom, we used two non steroidal antiinflammatory drugs (NSAID), the indomethacin and the meloxicam.

The hyperalgesia induced by the intraplantarly administration of *Tityus serrulatus* raw venom was inhibited by the previous treatment with local and systemic indomethacin, which is a dose dependent, however partial. The meloxicam, in the same way of the indomethacin, was also effective in preventing the hyperalgesia induced by the venom in a dependent dose form but only partially. These data suggest the participation of prostaglandins in the hyperalgesia induced by the venom.

To verify the release of the sympathetic component, in the hyperalgesia induced by the venom, we used two drugs, atenolol (a β-sympatholytic) and guanethidine that depletes the neuronal adrenergics supplies of amino sympathetics peripherically. Atenolol inhibited the hyperalgesia in a form of dose dependent. The treatment with guanethidine inhibited the hyperalgesia induced by the *Tityus serrulatus* raw venom. The guanethidine association (administrated chronically) plus atenolol caused an inhibition of 58% of the hyperalgesia induced by the venom, similar to the effect of each substance (atenolol or guanethidine) administrated separately. These data suggest the participation of a sympathetic component in the hyperalgesia induced by the venom, since the sympatholytic are efficient, however not totally, in preventing the hyperalgesia induced by the venom.

As the obtained data, we verified the presence of prostaglandins and of sympathetic component in the hyperalgesia induced by the *Tityus serrulatus* raw venom, however even when using high doses of NSAID substances or sympatholytic, it was not possible to prevent totally the hyperalgesia caused by the venom.

The association of the two groups of substances meloxicam with atenolol and meloxicam with guanethidine, demonstrated that the inhibitor association of the synthesis of prostaglandins (meloxicam) and sympatholytic (atenolol and guanethidine), prevented the hyperalgesia induced by the venom in 92.47%. These data demonstrate that the prevention of the hyperalgesia only occurs in full form when we associate sympatholytic and NSAID.

With the purpose to verify if the venom release inflammatory cytokines, we performed a treatment with substances which inhibit the release of cytokines, such as: dexamethasone, nimesulide and pentoxiphylline. The previous treatment with dexamethasone, nimesulide and pentoxiphylline had significantly prevented the hyperalgesia induced by the venom, in a dependent dose form. The analgesia induced by the previous administration of dexamethasone, nimesulide and pentoxiphylline, in the hyperalgesia induced by the venom, suggests that in this hyperalgesia process occurs the release of cytokines.

To verify if the *Tityus serrulatus* raw venom release bradykinin, we administrated previously to the venom increasing doses of HOE-140, which is an antagonist of receptor B2 for bradykinin. The HOE-140 was able to inhibit the hyperalgesia induced by the venom in a dose dependent, and these data suggest that the venom induces the activation of the kinins system with consequent formation of bradykinin.

The analgesic effect of dypirone administrated thirty minutes before the poison was dose dependent. And the previous administration of LNMMA or of methylene blue had after reverted the analgesic effect of dypirone administrated two hours after the venom. These data suggest that dypirone is efficient in preventing and reverting the hyperalgesia induced by the venom, and this analgesic effect of dypirone is dependent to the production and release of NO, since the inhibitor of NOS (LNMMA) or of the guanilate cyclase (methylene blue) abolish the analgesic effect of dypirone.

The analgesic effect of the diclofenac, administrated thirty minutes before the venom was dose dependent. And the previous administration of LNMMA or of methylene blue reverted the analgesic effect of the managed diclofenac two hours after the venom. These data suggest that diclofenac is efficient in preventing and reverting the hyperalgesia induced by the venom, and this analgesic effect of the diclofenac is dependent in the production and release of NO, since the inhibitor of NOS (LNMMA) or of the guanilate cyclase (methylene blue) abolish the analgesic effect of diclofenac.

The SNAP (S-nitrous-N-acetil-D, L-penicillamine), is a direct drug donor of NO, and to verify if NO has an analgesic activity forward the hyperalgesia induced by the venom, we carried through the administration of SNAP in increasing doses, which inhibited the hyperalgesia induced by the venom in a dependent form. These data suggest that the direct donors of NO, as SNAP or other substances that act activating the formation of NO, such as dypirone and the diclofenac, increase the concentrations of GMPc in the primary sensorial neuron afferent causing down regulation of the nociceptor, which are able to abolish and/or to revert the hyperalgesia induced by the *Tityus serrulatus* raw venom.

Paracetamol is considered a non steroidal antiinflammatory, however clinical data suggest that it presents an analgesic and antipyretic effect more powerful than any other substances of this group, for example the indomethacin or meloxicam. With the purpose to verify if paracetamol had an analgesic effect in the hyperalgesia induced by the *Tityus serrulatus* venom. Paracetamol prevented the hyperalgesia caused by the intraplantarly injection of venom in 86.24%. These data corroborate with clinical data, by the powerful analgesic action of paracetamol toward the different kinds of pain.

To verify if there was a participation of leukotrienes in the hyperalgesia induced by the poison, it was performed a previous treatment with MK886 (an inhibitor of the leukotriene synthesis) which inhibited the hyperalgesia induced by the venom, in a minimum form. These data suggest that the leukotriene do not present a relevant whole in the hyperalgesia induced by the venom.

To verify if there was release of histamine in the hyperalgesia induced process by the venom, we performed a previous treatment with doses of meclisine, which did not

interfere with the hyperalgesia induced by the intraplantarly injection of venom. To confirm the participation or not of histamine, during the process of hyperalgesia induced by the intraplantarly administration of venom by *Tityus serrulatus*, we made an experimental protocol with compound of 48/80, which administrated chronically, is able to deplete the mast cell of the histamine supplies. We verified that the previous treatment with the compound 48/80, does not inhibit the hyperalgesia induced by the venom. These data suggest that the venom does not active the release of histamine from mast cell, with no participation of this mediator in the hyperalgesia induced by the venom.

Using the ELISA method, we detected the participation of cytokines IL-1 β and TNF- α one and two hours after the intraplantarly administration of the *Tityus serrulatus* raw venom, we verified that the release of IL-1 β and TNF- α occur. These data confirm that the venom induces the liberation of cytokines during the process of hyperalgesia generated by it.