

LÚCIA DE CASTRO BASTOS

**MODELO PARA ESTUDO DA NOCICEPÇÃO CAUSADA POR
EXTRATO DE ESPÍCULA DE *Lonomia obliqua* EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

FLORIANÓPOLIS – SC

2003

BASTOS, Lúcia de Castro. **Modelo para estudo da nocicepção causada por extrato de espícula de *Lonomia obliqua* em ratos.** Florianópolis, 2003, 85p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Defesa: 27/02/2003

O presente trabalho teve por objetivo estudar as características dos padrões de nocicepção e do processo inflamatório decorrentes do contato com espículas da forma larval de *L. obliqua* em ratos, e também a padronização de um modelo animal para avaliação da resposta nocifensiva e possíveis mediadores inflamatórios envolvidos neste processo. Foram utilizados ratos Wistar machos que receberam injeção intraplantar de 100, 50, 35 e 17,5 µg/pata de extrato de espícula (EE) de *L. obliqua*. A avaliação nociceptiva foi obtida pelo número de lambidas e sacudidas (NLS) da pata. O edema de pata foi verificado pela variação de volume da pata. O extrato de espícula promove de forma consistente resposta nocifensiva e edema de pata dose-dependente. O pré-tratamento com indometacina, guanetidina e loratadina, sugeriu a participação de prostaglandinas na resposta nocifensiva e edema de pata, e de histamina no edema de pata. Animais que receberam extrato de espícula intraplantar apresentaram resposta nocifensiva tardia (5 min) e de curta duração (10 min) após estimulação da pata em água fria (15°C/10 s), ou quente (50°C/7 s). Esta resposta pode ser evocada até 6 horas após injeção do extrato de espícula. O estudo comparativo com mentol, capsaicina, formalina, e PGE₂ evidenciou resposta nocifensiva tardia ao frio somente por extrato de espícula, e ao calor pôr EE, PGE₂ e formalina. O modelo animal para estudo da resposta nocifensiva tardia espontânea aqui apresentado sugere uma possível sequela sensorial após contato humano com *L. obliqua*. Além disso, este modelo parece ser útil para estudos do fenômeno de nocicepção tardia que constitui outra forma de sensibilização nociceptiva, assim como hiperalgesia e alodinia.

Palavras-chave: Extrato de espícula, *Lonomia obliqua*, resposta nocifensiva, edema de pata, nocicepção tardia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, pelos ensinamentos, amizade e compreensão.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos seus ensinamentos e exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC pelo incentivo à pesquisa com *Lonomia obliqua*.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Guimarães e Ana Beatriz G. Veiga da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo fornecimento de extrato de espícula, que possibilitou este trabalho.

Aos colegas e amigos do departamento de Farmacologia.

Ao Rodrigo por seu grande incentivo, à Luisa por sua paciência e independência e ao Ivan por não ter nascido antes da conclusão deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. BIOLOGIA E MORFOLOGIA DA <i>Lonomia obliqua</i>	02
1.2. EPIDEMIOLOGIA	04
1.3. SÍNDROME HEMORRÁGICA	06
1.4. ACIDENTES E DOR	07
1.5. NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA	09
1.6. MECANISMO DE ATIVAÇÃO DOS NOCICEPTORES	11
1.6.1. Eicosanóides	14
1.6.2. Histamina	15
1.6.3. Aminas Simpatomiméticas	15
1.6.4. Bradicinina	16
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. ANIMAIS	20
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.2.1. Avaliação Nociceptiva	20
3.2.2. Avaliação de Edema de Pata	21

3.2.3. Avaliação da Resposta Tardia ao Frio e ao Calor	21
3.3. COMPOSTOS	22
3.4. EXTRATO DE ESPÍCULAS	23
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS	25
4.1. AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA E DE EDEMA DE PATA PROVOCADOS POR DIFERENTES DOSES DE EXTRATO DE ESPÍCULA DE <i>Lonomia obliqua</i>	26
4.2. EFEITO DA INDOMETACINA, GUANETIDINA E LORATADINA SOBRE A NOCICEPÇÃO E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR EXTRATO DE ESPÍCULA DE <i>Lonomia obliqua</i>	31
4.3. RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA APÓS EXPOSIÇÃO AO FRIO OU AO CALOR	35
4.4. PAREAMENTO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR EXTRATO DE ESPÍCULA, CAPSAÍCINA, FORMALINA, PGE ₂ . COMPARAÇÃO DO EDEMA DE PATA	37
4.5. COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS NOCIFENSIVAS TARDIA AO FRIO INDUZIDAS POR EXTRATO DE ESPÍCULA, FORMALINA, CAPSAICINA, PGE ₂ E MENTOL	41
4.6. EFEITO DA INDOMETACINA, GUANETIDINA E LORATADINA SOBRE A RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA AO FRIO INDUZIDA POR EXTRATO DE ESPÍCULA DE <i>Lonomia obliqua</i>	43
4.7. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA INDUZIDA POR PGE ₂ COM SENSIBILIZAÇÃO EM ÁGUA QUENTE	46

4.8. RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA AO CALOR INDUZIDA POR EXTRATO DE ESPÍCULA, FORMALINA, CAPSAICINA E PGE ₂	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forma larval de <i>Lonomia obliqua</i>	03
Figura 2 - Forma adulta de <i>Lonomia obliqua</i>	03
Figura 3 - Distribuição geográfica de <i>Lonomia obliqua</i> no estado de Santa Catarina entre 2000 e 2001.....	05
Figura 4 - Avaliação nociceptiva de diferentes doses de extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i>	28
Figura 5 - Avaliação de edema de pata com diferentes doses de extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i>	29
Figura 6 - Relação entre hematúria e nocicepção	30
Figura 7 - Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre a nocicepção induzida por extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i>	33
Figura 8 - Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre edema de pata induzido por extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i>	34
Figura 9 - Padronização de tempo de exposição ao frio	36
Figura 10 - Nocicepção induzida por extrato de espícula, capsaicina, formalina, PGE ₂ e mentol	39
Figura 11 - Edema induzido por extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i> , capsaicina, formalina e mentol	40
Figura 12 - Comparação das respostas nocifensivas tardia ao frio induzidas por extrato de espícula, formalina, capsaicina, PGE ₂ e mentol.....	42
Figura 13 - Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre a resposta nocifensiva tardia ao frio induzida por extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i>	45

Figura 14 - Avaliação de resposta nocifensiva tardia induzida por PGE ₂ com sensibilização em água quente	48
Figura 15 - Resposta nocifensiva tardia ao calor induzida por extrato de espícula de <i>Lonomia obliqua</i> , formalina, capsaicina e PGE ₂	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de compostos e diluentes	22
Tabela 2 - Variação de intensidade de hematúria em relação ao tempo de diluição do extrato de espícula.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

ng - nanograma

µl - microlitros

µM - micromolar

5HT2 - receptor de serotonina tipo 2

5HT3 - receptor de serotonina tipo 3

AMPc- monofosfato cíclico de adenosina

CIVD - coagulação intravascular disseminada

cm - centímetros

CRM1 - receptor frio-mentol tipo 1 (do inglês: cold-menthol receptor type 1)

DGR - gânglio da raiz dorsal

EPM - erro padrão da média

IP - intraperitonal

Kda - quilodalton

LOPAP – protease ativadora de protrombina derivada de *L. obliqua*

m/s - metro/segundo

mg - miligrama

min - minuto

ml - mililitro

NGF - fator de crescimento do nervo

NKA - neurocinina A

NLS - número de lambidas e sacudidas

NMDA - N-metil-D-aspartato

PGE₂ - prostaglandina E2

PKA - proteína quinase

PM - peso molecular

rpm - rotações por minuto

TRP - receptor de potencial transitório (do inglês: transient receptor potential)

TTX - tetrodotoxina

VO - via oral

VR1 - receptor vanilóide sub tipo 1

VRL-1 - receptor vanilóide tipo 1

RESUMO

O contato da pele humana com espículas da forma larval da mariposa *Lonomia obliqua* tem se tornado cada vez mais freqüente no sul do Brasil. Estes acidentes provocam dor local, náuseas, hematomas, e síndrome hemorrágica severa. As características dos padrões de dor e do processo inflamatório decorrentes do contato com espículas de *L. obliqua* tem sido pouco estudados até o momento. Este trabalho teve o objetivo de padronizar um modelo animal para avaliar a resposta nocifensiva e possíveis mediadores inflamatórios envolvidos neste processo. Foram utilizados ratos Wistar machos que receberam injeção intraplantar de 100, 50, 35 e 17,5 µg/pata de extrato de espícula (EE) de *L.obliqua*. A avaliação nociceptiva foi obtida pelo número de lambidas e sacudidas (NLS) da pata observados a cada 10 minutos, num tempo total de 60 minutos. O edema de pata foi verificado pela variação de volume da pata. O extrato de espícula promove de forma consistente resposta nocifensiva e edema de pata dose-dependente. A nocicepção é de aproximadamente 30 minutos, e o edema de pata tem duração de até 6h. O pré-tratamento com indometacina IP 2,5 mg/Kg, guanetidina SC 30 mg/Kg/dia durante 3 dias e loratadina VO 5 mg/Kg, sugeriu a participação de prostaglandinas na resposta nocifensiva e edema de pata, e de histamina no edema de pata. Animais que receberam extrato de espícula intraplantar apresentaram resposta nocifensiva tardia (5 min) e de curta duração (10 min) após estimulação da pata em água fria (15°C/10 s), ou quente (50°C/7 s). Esta resposta pode ser evocada até 6 horas após injeção do extrato de espícula. Estímulos nociceptivos equipotentes ou mentol (500 µM), (capsaicina (1,6 µg/pata), formalina (0,5 %), e PGE₂ (250 ng/pata)) não induziram resposta nocifensiva tardia ao frio, porém, PGE₂ e formalina também induziram resposta tardia ao calor. O modelo animal para estudo da resposta nocifensiva tardia espontânea aqui apresentado sugere uma possível sequela sensorial após contato humano com *L. obliqua*. Além disso, este modelo parece ser útil para estudos do fenômeno de nocicepção tardia que constitui outra forma de sensibilização nociceptiva, assim como hiperalgesia e alodinia.

ABSTRACT

The contact of the human skin with the *Lonomia obliqua*'s moth urticant bristles is getting an epidemic dimension in south Brazil. The patients present pain, nausea, hematomas, hematuria and a severe hemorrhagic syndrome. Little is known about the features of nociception and inflammatory condition elicited by the urticant bristles. This work aimed to explore the nocifensive and inflammatory responses elicited by the crude venom of *L. obliqua* in an animal model. Male Wistar rats were injected into the hind paw with 100, 50, 35, 17,5 µg/paw of *L. obliqua* bristle's extract. The evaluation of nocifensive response was obtained by the number of paw's flinches and licks (NFL) observed in periods of 5 minutes, in a total of 60 minutes. The edema was measured by the paw's volume variation. Bristle's extract caused a dose-dependent nocifensive and oedema response. The nociception lasts for 30 minutes and the edema lasts 6 hours. The pre-treatment with indometacin 2,5 mg/Kg, guanetidine 30 mg/Kg/day during 3 days and loratadine 5 mg/Kg, suggested that prostaglandins is involved in the nocifensive and edema responses, while histamine is involved only in edema formation. The bristle's extract also caused a delayed (5 min), short-lived (10 min) nocifensive response on animals each time the injected paw was stimulated with cold water (15°C/10 s) or hot water (50°C/ 7 s). This response could be evoked for up to 6 hours after injection of the bristle's extract. Equipotent noxious stimuli, (capsaicin (1,6 µg/paw), formalin (0,5 %), and PGE₂ (250 ng/paw)) or menthol (500 µM) cause after-sensation response to cold and hot stimuli, but PGE₂ and formalin also caused after-sensation response to hot stimulus. The animal model presented here suggested that sensorial sequela may also occur after human contact with *Lonomia obliqua*. Furthermore, the present model seemed to be useful to study the after-sensation phenomenon, which constitutes another dimension of the nociceptive sensitization in addition to hyperalgesia and allodynia.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOLOGIA E MORFOLOGIA DE *Lonomia obliqua*

Lagartas, rugas, mandorovás, bicho cabeludo e taturanas são designações populares de insetos no estágio larval das borboletas e mariposas, que pertencem à Ordem Lepidoptera. As borboletas possuem hábitos diurnos enquanto as mariposas hábitos noturnos, sendo que estas últimas podem apresentar estruturas de defesa como cerdas ou pelos que podem ser urticantes.

As lagartas do gênero *Lonomia* sp pertencem à Família Saturniidae, chegam a medir de 6 a 7 cm e possuem coloração marrom com cerdas esverdeadas pontiagudas e ramificadas que lembram pequenos pinheiros (figura 1). Estas cerdas encontram-se simetricamente dispostas ao longo do dorso. Acredita-se que o veneno de *Lonomia obliqua* seja produzido no epitélio e armazenado em regiões da cutícula e das cerdas (Veiga *et al.*, 2001).

O ciclo de vida da *L. obliqua* é composto de quatro fases: ovo, larva (6 instares), pupa e fase adulta (figura 2), que no total soma-se um período de ciclo de vida de aproximadamente 6 meses (Lorini, 1999). As lagartas possuem hábito gregário e se alimentam de folhas de diversas espécies de árvores, como ameixeira, goiabeira, abacateiro, pessegueiro, pereira, eucalipto, plátano e azaléa entre outras.

Os acidentes ocorrem principalmente nas estações quentes do ano e devem-se ao contato direto da lagarta contra a pele, causando uma reação imediata caracterizada por dor em queimação, hiperemia, prurido, cefaléia, mal-estar, náuseas, vômitos, hematomas, gengivorragia, hematúria, sangramento de feridas recentes e em

quadros graves hemorragia intracraniana, choque hipovolêmico e insuficiência renal aguda.



Figura 1: Larva de *Lonomia obliqua*. Foto de Roberto Pinto Moraes.



Figura 2: Adultos de *Lonomia obliqua*.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

O primeiro caso brasileiro de hemorragia atribuído ao contato com lagartas ocorreu em 1912 em Minas Gerais (Alvarenga, 1912). A síndrome hemorrágica causada pelo contato com lagartas do gênero *Lonomia* foi inicialmente descrita no Amapá e Ilha de Marajó em 1983 (Fraiha *et al.*, 1986), e a partir de 1989 começa a tomar proporções epidêmicas no sudoeste de Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul, nas regiões próximas a Chapecó e Passo Fundo (Duarte *et al.*, 1997).

As lagartas que causaram acidentes no Norte são da espécie *Lonomia achelous*, a mesma responsável por acidentes descritos na Venezuela por Arocha-Piñango (1992), enquanto as lagartas responsáveis por acidentes no sul do Brasil foram classificadas como *Lonomia obliqua* Walker (Lemaire, 1972)

O gênero *Lonomia* ocorre exclusivamente no continente americano (Lemaire, 1972) e atualmente *L. obliqua* está dispersa em quase todos os municípios das regiões oeste, meio oeste e norte do Estado de Santa Catarina (figura 3) (Suárez *et al.*, 1998), e também nas regiões norte, centro, sul, oeste e sudoeste do Paraná, assim como em Curitiba (Rubio, 2001). Recentemente foram registradas lagartas do gênero *Lonomia* no litoral de Santa Catarina (Suárez, 2000).

Em Santa Catarina foram registrados 1851 acidentes provocados pelo contato com *Lonomia obliqua* no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2001, com a ocorrência de 6 óbitos (Zannin, 2002). No Rio Grande do Sul foram notificados 994 acidentes, com oito óbitos no período de 1991 a 2000 (Zannin, 2002) e no Paraná foram totalizados 199 acidentes com cinco óbitos até meados de 2001 (Rubio, 2001).

As complicações decorrentes do quadro hemorrágico e responsáveis pelos óbitos são insuficiência renal aguda e hemorragia intracraniana.

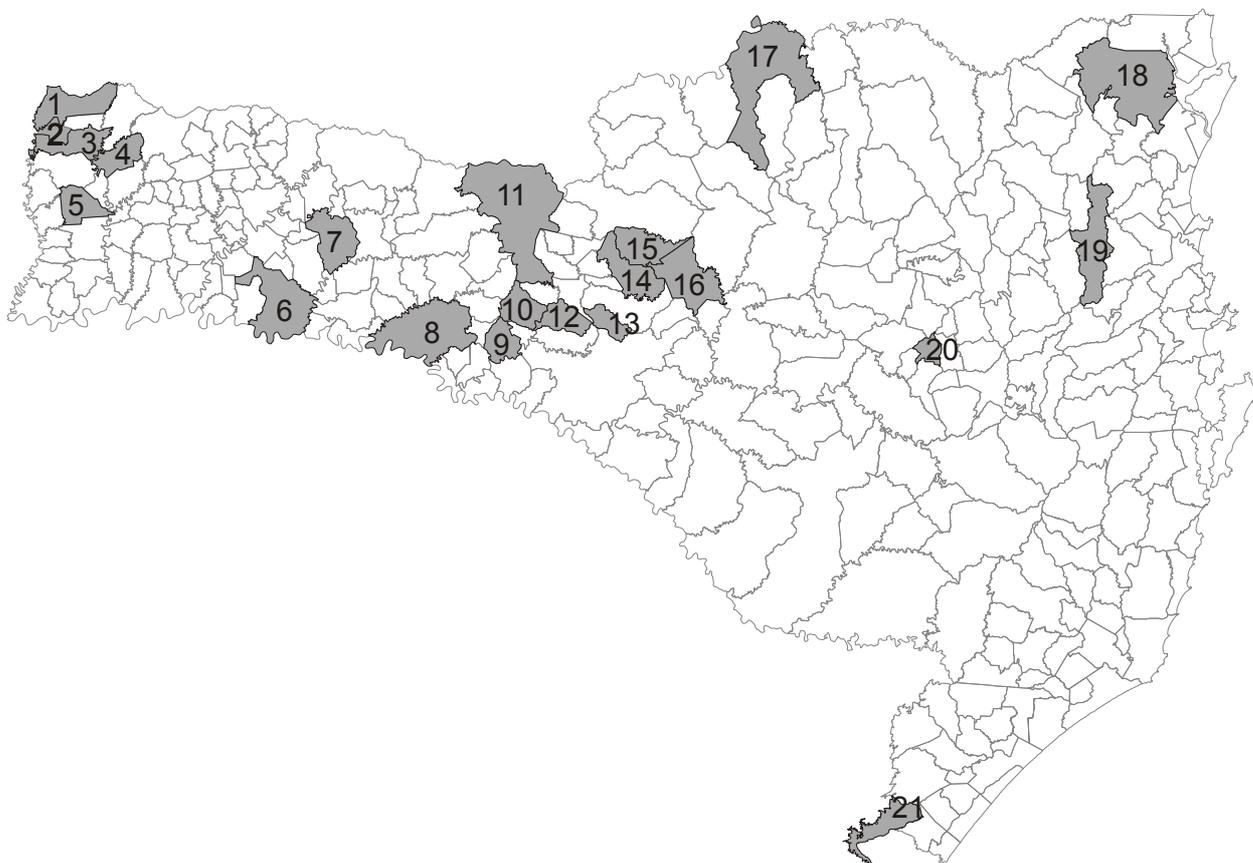


Figura 3: Distribuição geográfica de *Lonomia obliqua* no Estado de Santa Catarina entre 2000 e 2001. 1 – Dionísio Cerqueira, 2 – Princesa, 3 – São José do Cedro, 4 – Anchieta, 5 – São Miguel d'Oeste, 6 – Chapecó, 7 – Xanxerê, 8 – Concórdia, 9 – Ouro, 10 – Joaçaba, 11 – Água Doce, 12 – Herval d'Oeste, 13 – Ibiama, 14 – Videira, 15 – Rio das Antas, 16 – Fraiburgo, 17 – Canoinhas, 18 – Joinville, 19 – Blumenau, 20 – Trombudo Central, 21 – Praia Grande.

Fonte Suárez, 2000 e Hmeljevski *et al.*, 2001

1.3. SÍNDROME HEMORRÁGICA

O mecanismo fisiopatológico causador da síndrome hemorrágica não está totalmente esclarecido, sabe-se que pacientes vítimas de *Lonomia* apresentam baixos níveis de fibrinogênio, Fator V, Fator XIII, plasminogênio, α_2 -Antiplasmina e níveis aumentados de Fator de von Willebrand, FVIII, e produtos de degradação de fibrinogênio-fibrina (PDF e D-dímero), além de poder ocorrer queda nos níveis de protrombina e formação de trombina (Arocha-Piñango *et al.*, 2000). Além disso, várias substâncias foram isoladas do extrato de cerdas e do corpo de *Lonomia achelous*: Lonomin II, semelhante à plasmina; Lonomin III, ativador da protrombina; Lonomin IV, com atividade semelhante a do Fator X ativado; Lonomin V com atividade proteolítica sobre o Fator XIII e ação ativadora de plasminogênio semelhante à da uroquinase; Lonomin VI:a, ativador de Fator V; Lonomin VI:i, inibidor de Fator V e Lonomin VII de atividade semelhante à calicreína (Arocha-Piñango *et al.*, 2000). Arocha-Piñango sugere um mecanismo duplo na patogênese do envenenamento por *Lonomia* sp: uma síndrome fibrinolítica devido a ativação do sistema fibrinolítico e proteólise do Fator XIII e uma coagulação intravascular disseminada (CIVD) moderada devido aos agentes pró-coagulantes.

Nas pesquisas realizadas com *L. obliqua* utilizou-se o extrato bruto das cerdas, onde observou-se uma potente ação procoagulante sobre o plasma humano e o de ratos *in vitro* (Kelen *et al.*, 1995), e a identificação da presença de um ativador de Fator X e de protrombina (Donato *et al.*, 1998), além do isolamento de um ativador de protrombina dependente de cálcio, que é uma serino-protease de PM=69 Kda e foi

denominada *L. obliqua* prothrombin activator protease (LOPAP) (Reis *et al.*, 1999, 2001a,b).

LOPAP, mostrou-se capaz de gerar trombina ativa independentemente de componentes do complexo protrombinase, mas com atividade ativadora aumentada na presença de íons cálcio (Reis *et al.*, 2001a). Testes *in vivo* em ratos utilizando LOPAP causaram incoagulabilidade sangüínea com depleção total de fibrinogênio e queda de 40% na contagem de plaquetas, além de trombose em arteríolas e vênulas e áreas hemorrágicas (Reis *et al.*, 2001b). Estes resultados sugerem que a síndrome hemorrágica por contato com *L. obliqua* tenha como principal fator a ativação de protrombina em trombina.

Para o tratamento de pessoas que entram em contato com *Lonomia*, tem-se utilizado um soro antiveneno específico produzido através da imunização de cavalos com extrato de cerdas de *L. obliqua* (Silva *et al.*, 1996), ocorrendo assim, uma neutralização das toxinas circulantes.

1.4. ACIDENTES E DOR

Entre as pessoas que acidentalmente tem contato com *L. obliqua*, a dor local, sob a forma de ardor e queimação é o sintoma mais relatado, tendo ocorrido em 95% dos pacientes atendidos em Santa Catarina no período de dezembro de 1998 a junho de 2000 (Zannin, 2002). Apesar da alta incidência essa dor é fugaz e passa a ser um problema menor em comparação com o quadro geral do paciente. Entretanto, sabe-se que mesmo a nocicepção de curta duração, mas de grande intensidade, pode promover uma sensibilização tardia, com manifestação de uma resposta hiperalgésica prolongada por substâncias estimuladoras de nociceptores ou processos inflamatórios

(Perl, 1992), bem como por alterações no estado funcional da medula espinhal (Yashpal *et al.*, 1995). Infelizmente, porém, não existem registros de acompanhamento do estado sensorial cutâneo de indivíduos expostos ao veneno de *L. obliqua*, em qualquer período após receberem alta dos possíveis distúrbios hemorrágicos. Mesmo porquê, na maioria dos casos, os acidentados são provenientes de regiões rurais distantes de centros médicos de referência. Estes fatores tornam relevante o desenvolvimento de modelos experimentais com os quais se possam estudar a nocicepção produzida pelo veneno de *L. obliqua*, bem como suas possíveis seqüelas sensoriais, deste modo ajudando a prever possíveis necessidades de uma terapêutica mais específica para o quadro doloroso dos pacientes.

Nada se sabe sobre os possíveis mecanismos subjacentes à dor provocada pelo contato da pele humana com as espículas da lagarta. Varias toxinas de invertebrados causam dor intensa, de início rápido e duração relativamente curta (30 a 120 min), o que sugere mecanismo de ação direto sobre fibras sensitivas. Mas há dados indicando que em alguns casos o processo doloroso pode ser prolongado pela liberação de mediadores secundários. Pesquisas realizadas utilizando veneno de abelhas em modelos animais mostraram uma resposta nocifensiva persistente e monofásica (Chen *et al.*, 1999), que também é associada a hiperalgesia primária para estímulos mecânicos e térmicos e hiperalgesia secundária para estímulos térmicos (Chen e Chen, 2000). Em experimentos realizados com veneno de abelha e antagonistas de receptores de glutamato NMDA e não-NMDA, sugeriu-se que receptores periféricos NMDA podem ser fundamentais na nocicepção persistente e hiperexcitabilidade induzidas pelo veneno de abelha (You *et al.*, 2002). Em estudos realizados com o veneno do escorpião amarelo *Tityus serrulatus*, demonstrou-se que

ele causa hiperalgesia dose dependente em patas de ratos, pela possível participação de bradicinina, citocinas inflamatórias, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (Nowacki, 2000). Os efeitos sistêmicos causados pelo veneno deste escorpião são decorrentes de abertura de canais de sódio em terminações nervosas autonômicas e conseqüente liberação de mediadores como acetilcolina e catecolaminas, além de ter sido demonstrado um aumento de citocinas plasmáticas, principalmente IL-6 em pacientes envenenados por *T. serrulatus* (Magalhães *et al.*, 1999). Em outras espécies de escorpiões da Família *Scorpionidae* foram encontradas toxinas que modificam a atividade de canais de potássio (Lebrun *et al.*, 1997).

1.5. NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA

A definição e interpretação de dor é bastante difícil, pois além da transdução do estímulo aplicado, também ocorre um processamento cognitivo e emocional realizados pelo cérebro. A dor constitui um importante sistema de alarme do organismo para sinalizar a ocorrência de um dano tecidual, sendo inclusive um dos cinco sinais característicos da resposta inflamatória (dor, calor, tumor, rubor e perda da função). Além disso a dor pode ocorrer de maneira espontânea e sem lesão tecidual no caso de dor neuropática. Os conhecimentos sobre nocicepção ainda são limitados e o que se conhece deve-se principalmente a estudos de tecidos periféricos.

A percepção de estímulos sensoriais nocivos ou não nocivos é determinada por fibras nervosas sensoriais, sendo as três principais as fibras A β , fibras A δ e fibras C.

As fibras sensoriais A β são bastante mielinizadas com velocidade de condução bastante elevada e não evocam sensação dolorosa. As fibras A δ possuem uma camada fina de mielina, conduzem a resposta a uma velocidade de 2,5 a 20m/s, e

respondem principalmente a estímulos mecânicos ou térmicos. As fibras C não são mielinizadas, tem velocidade de condução menor que 2,5m/s e respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Admite-se que devido suas velocidades de condução, as fibras A δ mediarão a dor “primária”, que seria a dor aguda e cortante, e as fibras C mediarão a dor “secundária”, ou seja, a dor tardia e difusa (Julius & Basbaum, 2001).

As terminações nervosas livres que precisam de estímulos de alta intensidade para evocar resposta são chamadas de nociceptores, podendo ser fibras mielinizadas ou não. Os nociceptores respondem ao estímulo nocivo promovendo despolarização da célula, e conseqüentemente desencadeando potenciais de ação que irão levar a informação da periferia para sinapses no sistema nervoso central através da liberação de neurotransmissores nas terminações pré-sinápticas centrais. Os neurotransmissores contidos nos nociceptores são os neuropeptídeos: substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), somatostatina, neurocinina A (NKA), e principalmente o aminoácido excitatório glutamato.

Em condições normais é preciso que os nociceptores recebam um estímulo de alta intensidade para promoverem uma resposta. Quando um estímulo de alta intensidade provoca uma resposta dolorosa exacerbada estará ocorrendo hiperalgesia. A hiperalgesia é definida como desvio à esquerda da curva estímulo-resposta que demonstra a magnitude da dor em resposta à intensidade do estímulo (Raja *et al.*,1999). Hiperalgesia é dita primária quando se localiza no ponto da lesão, ou secundária quando ocorre em tecidos íntegros adjacentes a lesão. A hiperalgesia pode ocorrer por uma sensibilização central, onde ocorre aumento de resposta dos neurônios espinais, ou por sensibilização periférica, quando os nociceptores ficam

expostos a produtos de lesão tecidual ou agentes inflamatórios, como prótons, ácido araquidônico, serotonina, bradicinina, nucleotídeos e fator de crescimento do nervo (NGF) (Julius e Basbaum, 2001). Na presença de agentes inflamatórios ocorre o recrutamento e sensibilização de nociceptores que se encontravam “dormentes” ou “silenciosos” (McMahon e Koltzenburg, 1990), e passam a ser peças fundamentais no processo de hiperalgesia.

1.6. MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DOS NOCICEPTORES

Em uma lesão tecidual ocorre a liberação de vários mediadores que participam do processo inflamatório. Alguns desses agentes podem agir diretamente em nociceptores enquanto outros podem atuar de forma indireta através de células inflamatórias que irão liberar substâncias que causem dor. Além disto, esses agentes podem levar a uma sensibilização dos nociceptores promovendo uma hiperalgesia primária ou ainda agir sinergicamente potencializando a resposta nociceptiva (Raja *et al.*, 1999).

A excitação e sensibilização de nociceptores pode ocorrer pela ativação de canais iônicos ativados pelo ligante como receptores para glutamato tipo NMDA e serotonina (5HT₃), receptores acoplados a proteína G, como receptores para prostaglandinas e serotonina (5HT₂) ou receptores tipo tirosina-quinase como o receptor para NGF, além de poder ocorrer sensibilização indiretamente pela atuação de agentes inflamatórios em canais iônicos dependentes de voltagem. A sensibilização de nociceptores está geralmente associada com ativação de sistemas de segundo mensageiros e modificações na fosforilação protéica (ver Bevan, 1999).

Os canais iônicos responsáveis por correntes de entrada em nociceptores são principalmente os canais de cálcio dependentes de voltagem e os canais de sódio dependentes de voltagem, enquanto os canais de potássio são responsáveis por correntes de saída. Os canais de sódio são os principais responsáveis pela geração e condução de potenciais de ação em neurônios, e entre estes canais se encontra o canal de sódio resistente a tetrodotoxina (TTX), que ocorre freqüentemente em nociceptores. As correntes de sódio e potenciais de ação em fibras C são bastante resistentes ao bloqueio por TTX por estas fibras possuírem uma grande população de canais iônicos resistentes a TTX. Estes canais são ativados mais lentamente do que os canais iônicos sensíveis a TTX, que predominam nas fibras A (Bevan, 1999). Além disso os canais resistentes a TTX tem suas correntes ativadas por potenciais de membrana mais despolarizados e recuperação da inativação mais rápida que canais sensíveis a TTX. Essas diferenças implicam em maior limiar de despolarização para geração de potencial de ação e menor possibilidade de refratariedade durante despolarização sustentada de fibras C em relação às fibras A (Elliott e Elliot, 1993; Elliot, 1997). Os mediadores inflamatórios PGE₂, adenosina e serotonina aumentam correntes de sódio em canais resistente a TTX em culturas de DGR em parte pela via AMPc/PKA (England *et al.*, 1996). Sugere-se que leve aumento nas correntes de sódio possa aumentar a excitabilidade drasticamente (Matzner e Devor, 1994).

Existem pelo menos cinco tipos de canais de cálcio ativados por voltagem expressos em neurônios sensoriais, que são L, N, P/Q, T e R. Eles se diferenciam pelas suas propriedades farmacológicas, grau de despolarização de membrana necessário para ativar correntes e características de inativação. A entrada de cálcio na célula através desses canais pode afetar vários processos, como a ativação de outros

canais de membrana, liberação de transmissores e regulação enzimática (ver Bevan, 1999).

Os canais de potássio são também muito importantes no processo de excitabilidade celular, pois eles se abrem em resposta à despolarização e são responsáveis pela rápida repolarização da membrana finalizando o potencial de ação. Em neurônios sensoriais são encontrados vários tipos de canais de potássio dependentes de voltagem (Gold *et al.*, 1996; Safronov *et al.*, 1996). Em neurônios sensoriais prostaglandinas promovem uma inibição de correntes nestes canais (England *et al.*, 1996; Nicol *et al.*, 1997), o que pode contribuir para a diminuição do limiar de ativação de fibras nociceptivas.

Vários mediadores inflamatórios, como bradicinina, serotonina e prostaglandinas atuam através de receptores acoplados a proteína G. A proteína G pode tanto estimular a adenilato ciclase elevando a concentração de AMPc, como inibir a atividade desta enzima e conseqüentemente reduzir a concentração de AMPc nos neurônios. Os neurônios nociceptivos utilizam vários mediadores intracelulares como AMPc, GMPc, trifosfato de inositol, íons cálcio, óxido nítrico, e produtos de metabolização do ácido araquidônico. Vários desses mediadores regulam a fosforilação e desfosforilação de canais, receptores e enzimas, o que é muito importante para a sinalização celular. O aumento de AMPc intracelular causa hiperalgesia por ação direta sobre neurônios periféricos (Taiwo *et al.*, 1989; Taiwo e Levine, 1991) provavelmente pela fosforilação de canais e receptores.

Recentemente o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares das sensações térmicas ganhou grande reforço com a clonagem de receptores sensíveis a temperaturas. O receptor vanilóide VR₁ é um canal iônico excitatório que é ativado por

temperaturas de aproximadamente 43°C, capsaicina e outros compostos vanilóides (Caterina *et al.*, 1997). O outro canal iônico seria o VRL-1, um receptor tipo vaniloide tipo 1 que não responde à capsaicina mas é ativado por temperaturas superiores a 50°C (Caterina *et al.*, 1999). Em conjunto estes dois receptores comandariam a sensibilidade térmica ao calor de média e alta intensidade em neurônios sensoriais primários (Julius e Basbaum, 2001).

Um receptor ao frio também foi identificado, o CRM₁. Trata-se de um canal iônico excitatório que é ativado por mentol e temperaturas entre 8°C e 28°C. Este receptor, assim como o VR₁ e o VRL-1 pertence à família de canais iônicos de receptores de potencial transitório TRP, sugerindo que estes canais sejam os transdutores moleculares primários, para estímulos térmicos (McKemy *et al.*, 2002).

1.6.1. EICOSANÓIDES

As prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, são metabólitos do ácido araquidônico, e conhecidos como eicosanóides. De maneira geral eles não ativam nociceptores diretamente, mas sim sensibilizam nociceptores viscerais e da pele para outros estímulos e agentes (Rueff e Dray, 1993). Prostaciclina e PGE₂ sensibilizam fibras aferentes de articulações (Schepelmann *et al.*, 1992) e as outras prostaglandinas parecem ter maior importância na dor inflamatória e na hiperalgesia. Aos leucotrienos sugeriu-se atuação na hiperalgesia mecânica e térmica pela sensibilização de fibras C (Bisgaard e Kristensen, 1985; Martin *et al.*, 1988).

1.6.2. HISTAMINA

A liberação de histamina por mastócitos pode levar a vários efeitos, incluindo vasodilatação e edema. O seu papel em relação à nocicepção não é muito claro, uma vez que a aplicação exógena de histamina na pele cause coceira e não dor (Simone *et al.*, 1991). A histamina excita nociceptores polimodais viscerais e potencializa a resposta de nociceptores ao calor (Mizumura *et al.*, 1994; Koda *et al.*, 1996). Nociceptores cutâneos mecanossensíveis em ratos e humanos respondem fracamente à histamina (Koppert *et al.*, 1993), entretanto, uma subpopulação de Fibras C são excitáveis pela histamina (Schmelz *et al.*, 1997).

1.6.3. AMINAS SIMPATOMIMÉTICAS

Mastócitos degranulados liberam fator de agregação plaquetária (PAF) que promovem ativação de plaquetas e conseqüentemente, estas liberam serotonina. A serotonina causa dor e hiperalgisia em músculo masseter de humanos (Ernberg *et al.*, 2000a) e ainda o propranolol (beta bloqueador) e granisetron (antagonista de receptor serotoninérgico) são capazes de reduzir a dor local sendo que o último abole a hiperalgisia (Ernberg *et al.*, 2000b). A serotonina também tem a capacidade de potencializar a dor causada por bradicinina (Fock e Manse, 1976).

O sistema simpático parece ter um importante componente na hiperalgisia, uma vez que drogas simpatolíticas como guanetidina inibem contorções abdominais em camundongos (Duarte *et al.*, 1988) e epinefrina intra-dérmica causa hiperalgisia mecânica em ratos (Khasar *et al.*, 1999).

1.6.4. BRADICININA

A bradicinina é um peptídeo formado pela ativação de precursores plasmáticos que são ativados em locais de lesão tecidual, sendo encontrada em altas concentrações em processos inflamatórios. Ela causa dor quando aplicada por via intradérmica, intra-arterial, intravenosa e intraperitonal (Whalley *et al.*, 1989) além de sensibilizar nociceptores a produzirem hiperalgesia (Neugebauer *et al.*, 1989, Rueff e Dray, 1993).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Acidentes com *Lonomia obliqua* se tornaram um problema de saúde pública devido à sua gravidade e grande incidência no sul do Brasil. Como a grande maioria das pesquisas é realizada com pessoas acidentadas, e não ocorre um acompanhamento posterior para verificação de seqüelas sensoriais, decidimos padronizar um modelo animal para estudarmos melhor fenômenos que ocorrem com humanos, tentando assim compreender os mecanismos de dor causados pelo veneno de *Lonomia obliqua* e tentar prevenir possíveis seqüelas sensoriais que possam ocorrer tardiamente.

Objetivos específicos:

- Padronização de um modelo experimental para a avaliação da resposta nocifensiva e edematogênica induzidas por extrato de espícula de *L. obliqua*.
- Avaliação farmacológica da nocicepção inicial e tardia induzidas por extrato de espícula de *L. obliqua*.
- Sugestão de um novo protocolo experimental para avaliação de resposta nocifensiva espontânea tardia ao frio e calor.

_____ 3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 250 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais eram mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 h controlado automaticamente e água e ração *ad libitum* até o momento do experimento.

Vinte e quatro horas antes de cada experimento os animais eram levados ao laboratório para aclimatação. Os experimentos foram realizados a uma temperatura ambiente de $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais /UFSC (095/CEUA – 23080.001937/2001-44).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA

Para avaliação nociceptiva os animais receberam injeção na região plantar da pata direita de 50 μl da substância a ser avaliada e observou-se o número de lambidas e sacudidas da pata (NLS) em intervalos de 5 minutos em um período total de 10 minutos ou de 60 minutos, de acordo com o protocolo experimental. A observação foi

realizada em uma caixa de vidro de 29x29x35 cm onde os animais eram colocados individualmente e já havia ocorrido uma habituação prévia.

3.2.2. AVALIAÇÃO DE EDEMA DE PATA

Nesta avaliação foram utilizados os mesmos animais utilizados na avaliação nociceptiva, portanto o volume injetado foi de 50 μ l.

Para avaliação de edema de pata utilizou-se uma cubeta com água colocada sobre uma balança eletrônica de precisão. Colocava-se a pata direita do animal dentro da cubeta até a articulação tíbio-társica e a variação de volume da pata era calculada pelo aumento da coluna líquida, considerando-se que 1ml de água corresponde a 1g. As medidas foram realizadas sempre na mesma pata, sendo a primeira medida feita antes da injeção intraplantar e as medidas subsequentes em tempos variados conforme o protocolo experimental. Para análise estatística foi considerada a diferença de resultados entre o tempo final e o inicial.

3.2.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TARDIA AO FRIO E AO CALOR

Neste procedimento experimental a avaliação da resposta nocifensiva tardia foi iniciada duas horas após injeção intraplantar e foi avaliada pelo número de lambidas e sacudidas de pata totalizados em 10 minutos após cada exposição à água fria ou quente com intervalos de observação de uma hora, durante 6 horas. A observação era feita em uma caixa de observação, onde se registrava o número de lambidas e sacudidas de pata (NLS).

Para a avaliação térmica ao frio, colocava-se a pata direita do animal, que havia recebido injeção intraplantar de veneno ou outra substância nociceptiva, em um

Becker de 500 ml contendo água a temperatura de 15° C, durante 10 segundos. Imediatamente após, o animal era colocado na caixa de observação e iniciava-se o registro do comportamento nocifensivo.

Na avaliação térmica a quente, colocava-se a pata direita do animal, que havia recebido injeção intraplantar, em um Banho-Maria a temperatura de 50° C durante 7 segundos. Imediatamente após, o animal era colocado na caixa de observação e iniciava-se o registro do comportamento nocifensivo.

3.3. COMPOSTOS

A lista de compostos utilizados e seus respectivos diluentes se encontra na tabela 1.

Tabela 1: Lista de compostos e seus respectivos diluentes.

COMPOSTOS	DILUENTES
Formalina (Merck AG)	Salina 0,9%
Capsaicina (Sigma)	Salina 0,9%
PGE ₂ (Sigma)*	Salina 0,9%
Mentol	Salina 0,9%
Indometacina (Merck AG)	Solução de bicarbonato de sódio 1,29%
Guanetidina (Sigma)	Salina 0,9%
Loratadina (Medley)	Salina 0,9%

*Solução mãe de PGE₂ de 500 µg/ml em etanol absoluto.

Após diluição a PGE₂ era colocada em tubos de microcentrífuga (ependorf) siliconizados.

A indometacina foi administrada pela via intraperitoneal uma hora antes da injeção intraplantar de extrato de espícula no pré-tratamento e uma hora após injeção intraplantar de extrato de espícula no pós tratamento.

A guanetidina foi administrada pela via sub-cutânea uma vez ao dia durante 3 dias e o experimento foi realizado no terceiro dia de tratamento.

A loratadina foi administrada por via oral uma hora antes da injeção intraplantar de extrato de espícula.

3.4. EXTRATO DE ESPÍCULAS

Foram utilizadas amostras de extrato de espículas fornecidas pelo Prof. Dr. Jorge A. Guimarães da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O veneno foi enviado na forma liofilizada e mantido em freezer (-20°C).

Essas amostras foram obtidas da seguinte maneira: maceração, homogeneização de espículas em água milli-Q. A secreção coletada foi centrifugada a 14k rpm por 20 min e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios, descartando-se o *pellet*. A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA, obtendo-se a concentração proteica de 2 mg/ml que foi liofilizada e embalada em microtubos com o equivalente a 2 mg por microtubo.

Para ressuspensão do extrato foi utilizada solução salina 0,9% de maneira a se obter 2 mg/ml. Essa solução era mantida em freezer, sendo retirada a alíquota necessária para cada experimento no dia do experimento.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de um número (n) de 6 animais por grupo. Para análise estatística foi usada análise de variância (ANOVA) de uma via simples ou para medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas, ou teste *t* de Student.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA E DE EDEMA DE PATA PROVOCADOS POR DIFERENTES DOSES DE EXTRATO DE ESPÍCULA DE *Lonomia obliqua*

Extrato de espícula diluídos em salina, nas doses de 100, 50, 35 e 17,5 µg/50 µl, foi aplicado por via intraplantar. A avaliação nociceptiva foi realizada pela contagem de reações nocifensivas (lambidas e sacudidas de pata) acumuladas em 5 minutos durante um período total de 30 minutos. A avaliação de edema de pata foi observada nos mesmos animais, sendo que a primeira medida foi realizada antes da injeção intraplantar e depois verificada aos 30 minutos, aos 60 minutos e a partir de então a cada hora durante 6 horas e depois de 24 horas. Animais controle receberam apenas solução salina (50 µl) por via intraplantar.

Verificamos que o extrato de espícula de *L. obliqua* promove de forma consistente resposta nocifensiva dose dependente de aproximadamente 30 minutos de duração (figura 4) e também edema, de latência curta, com pico inicial entre 30 minutos e uma hora, e duração de até 6 horas (figura 5).

Durante esses experimentos observou-se que os animais apresentavam hematúria, e em alguns casos hematomas no local da injeção. Nas concentrações maiores esses sinais foram intensos e os animais ficaram debilitados após 24 horas, sendo que os animais que receberam 100 µg apresentaram hematomas enegrecidos na pata. Mortes de animais foram raras. Notou-se também que quanto mais dias se

passavam desde a primeira diluição do extrato, menor se tornava a intensidade da hematúria (tabela 2 e figura 6).

A partir destes resultados passou-se a trabalhar com a dose de 35 μ g, por induzir resposta nocifensiva inicial sempre praticamente constante e hematúria intensa apenas nos experimentos realizados nos primeiros dias da diluição da amostra liofilizada de extrato.

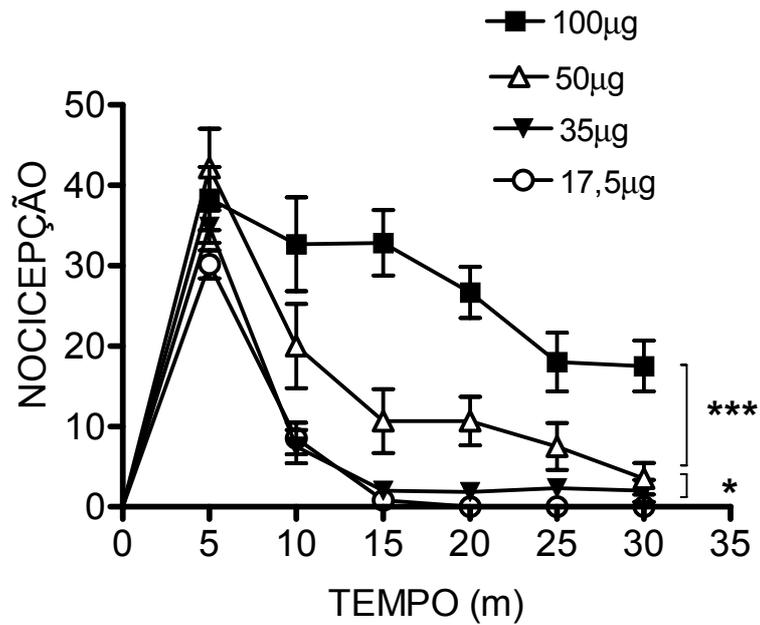


Figura 4: Avaliação nociceptiva de diferentes doses de extrato de espícula de *Lonomia obliqua*. O extrato de espícula foi injetado nas doses de 17,5, 35, 50 e 100 µg/pata e, imediatamente após, observou-se o número de reações nocifensivas evocadas. *** e * indicam respectivamente diferença estatística significante, ao nível de $p < 0,001$ e $p < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls).

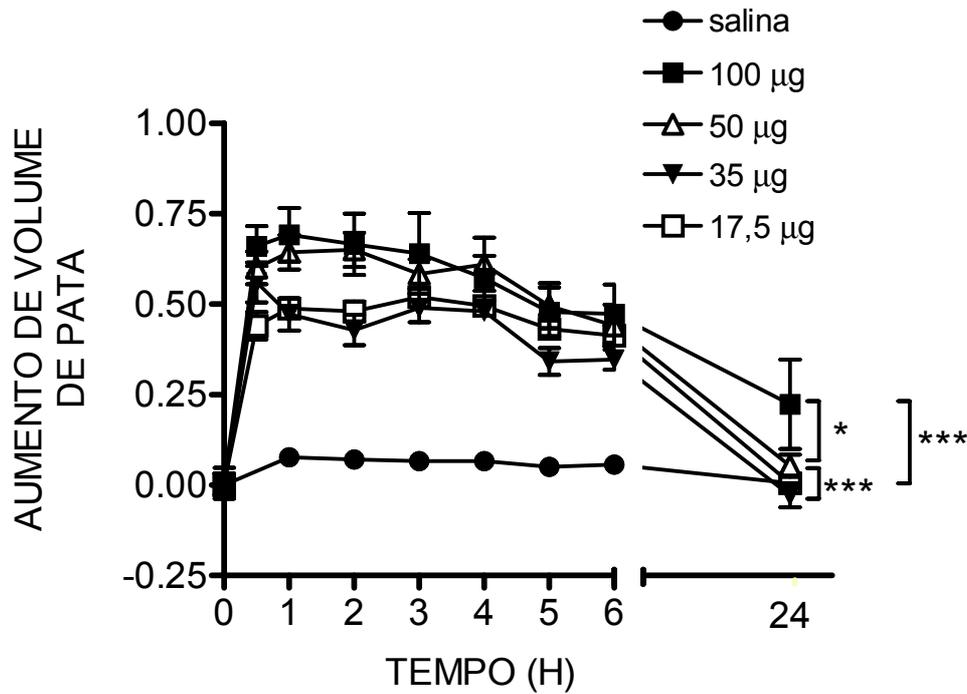


Figura 5: Avaliação de edema de pata com diferentes doses de extrato de espícula de *Lonomia obliqua*. O extrato de espícula foi injetado nas doses de 17,5, 35, 50 e 100 µg/pata e a avaliação de edema foi feita aos 30 minutos, 60 minutos e a partir de então de uma em uma hora até 6 horas e depois de 24h. Os pontos representam a média \pm o EPM de 6 animais. * e *** indica diferença estatística significativa, ao nível de $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls).

Tabela 2: Variação de intensidade de hematúria em relação ao tempo de diluição do extrato de espícula.

Dias de Preparo	Concentração (ug)	HEMATÚRIA			
		Nº Total	% Intensa	%Leve	% Ausente
0	35	12	100,0	0,0	0,0
2	35	12	58,3	25,0	16,7
7	35	12	0,0	16,7	83,3
11	35	12	0,0	0,0	100,0

Estes dados mostram que na concentração de 35µg/pata a intensidade da hematúria decresce após alguns dias da diluição do extrato de espícula.

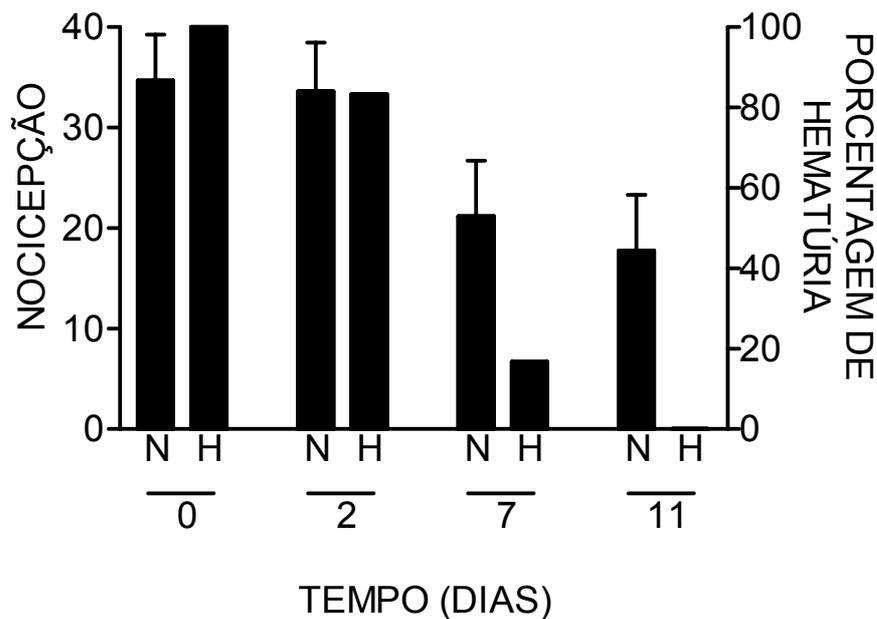


Figura 6: Relação entre hematúria e nocicepção. A injeção intraplantar de 35µg/pata de extrato de espícula promoveu resposta nocifensiva (número de lambidas e sacudidas de pata), representada nas barras N. (H) indica a porcentagem de animais que apresentaram hematúria ao longo do experimento. Os números na abscissa representam o número de dias desde a ressuspensão do extrato de espícula liofilizado. A intensidade da alteração da resposta nocifensiva não foi estatisticamente significativa (ANOVA de uma via).

4.2. EFEITO DA INDOMETACINA, GUANETIDINA E LORATADINA SOBRE A NOCICEPÇÃO E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR EXTRATO DE ESPÍCULA DE *Lonomia obliqua*

Neste protocolo foi pesquisado o possível envolvimento de mediadores inflamatórios, como eicosanóides, aminas simpatomiméticas e histamina na nocicepção e edema de pata induzidos por extrato de espícula na dose de 35 µg/pata. Para tanto utilizou-se indometacina, um antiinflamatório não esteroide que inibe a síntese de prostaglandinas pela inibição da ciclooxigenase, guanetidina que depleta periféricamente os estoques de aminas simpatomiméticas dos terminais adrenérgicos e loratadina, um anti-histamínico com ação antagonista periférica de receptores H₁.

Observou-se a resposta nocifensiva durante 10 minutos após injeção intraplantar de extrato de espícula (figura 7) e para avaliação de edema foi feita a primeira medida antes da injeção intraplantar de extrato de espícula e as medidas subsequentes após 1 hora e 6 horas, nos mesmos animais utilizados para avaliação nociceptiva (figura 8).

A indometacina foi aplicada na dose de 2,5 mg/Kg, IP, uma hora antes da injeção intraplantar de extrato. O grupo controle recebeu apenas solução de bicarbonato de sódio 1,29% em lugar da indometacina. Os resultados mostram que a indometacina inibiu de forma consistente a resposta nocifensiva induzida pelo extrato (figura 7 painel A), porém o edema (figura 8 painel A) não sofreu inibição significativa. Indometacina aplicada após o extrato, também não foi capaz de inibir a formação de edema (figura 8 painel B).

O pré-tratamento realizado com guanetidina foi de 3 dias, aplicada por via subcutânea, na dose de 30 mg/Kg/dia, sendo o experimento realizado no terceiro dia de tratamento. Os animais controle receberam salina 0,9%. Nesses resultados foi observado que a guanetidina não interferiu na resposta nocifensiva ou na formação de edema pela injeção intraplantar de extrato de espícula (figura 7 painel B e figura 8 painel C).

A loratadina foi administrada na dose de 5 mg/Kg VO, uma hora antes do experimento. Nos animais controle foi utilizado salina 0,9 %. Neste experimento a loratadina não interferiu estatisticamente na resposta nocifensiva provocada por extrato de espícula (figura 7, painel C), entretanto, promoveu redução significativa da formação de edema de pata (figura 8, painel D).

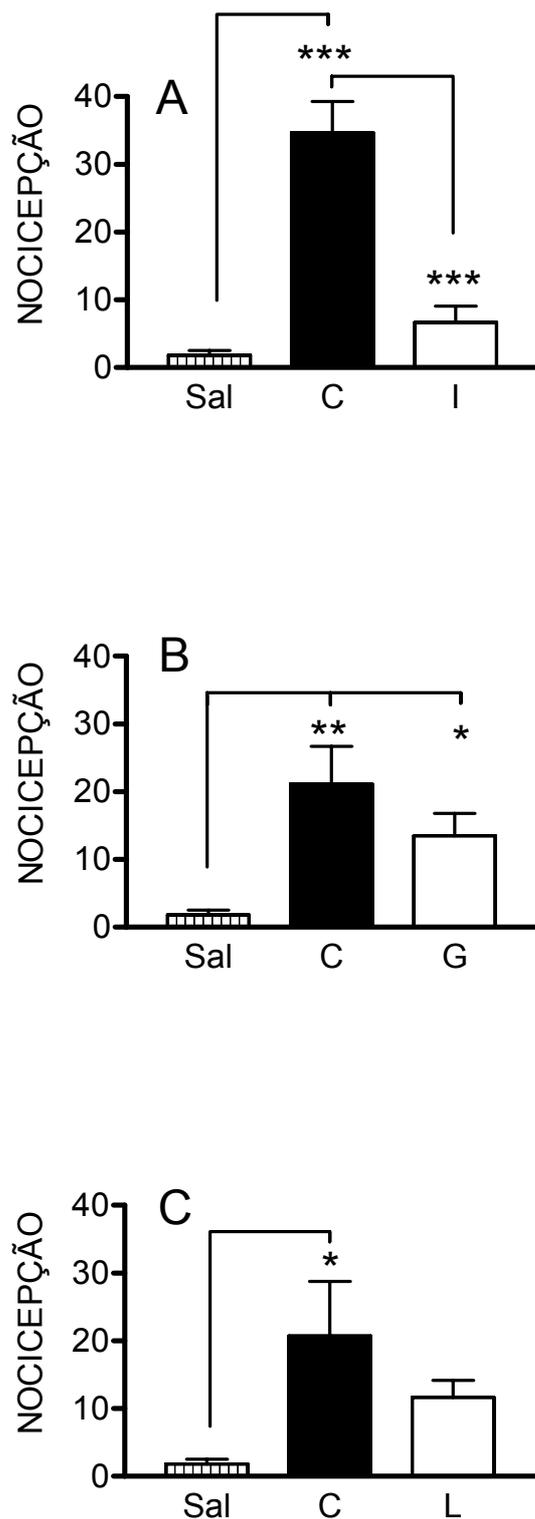


Figura 7: Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre a nocicepção induzida por extrato de espícula de *Lonomia obliqua*. Todos os animais receberam injeção intraplantar de extrato de espícula na dose de 35 µg/pata ou salina 0,9 % e observou-se o número de reações nocifensivas durante 10 min. Os animais tratados receberam indometacina 2,5 mg/Kg IP, (Painel A), guanetidina 30 mg /Kg/dia SC durante 3 dias (Painel B) e loratadina 5 mg/Kg VO (Painel C). As barras pretas representam os animais controle (controle de indometacina recebeu solução de bicarbonato 1,29 %, e grupos controle de guanetidina e loratadina receberam salina 0,9 %) , as barras brancas os animais tratados, e as barras hachuradas os animais que receberam salina intraplantar. Os dados referem-se à média de NLS ± EPM de 6 animais. *** , ** e * indicam diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente (ANOVA de uma via seguida de teste Newman-Keuls).

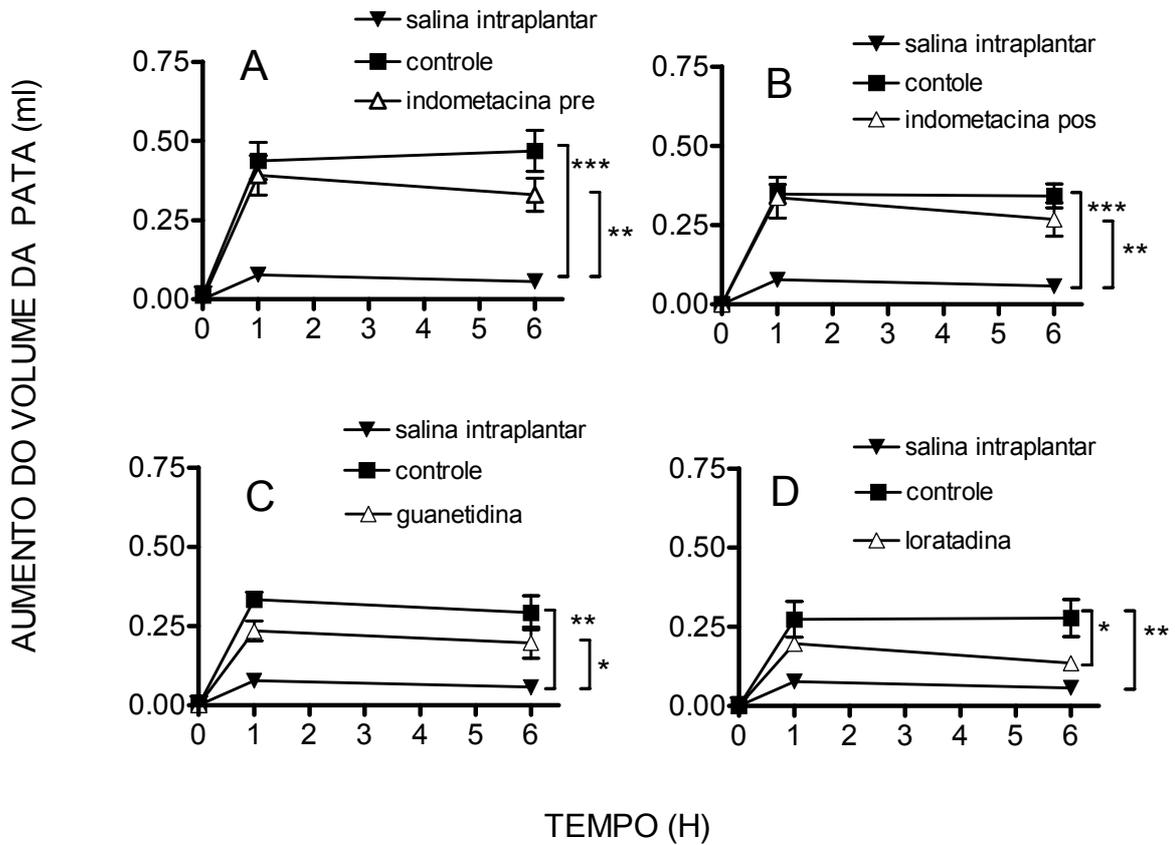


Figura 8: Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre edema de pata induzido por extrato de espícula de *Lonomia obliqua*. Todos os animais receberam injeção intraplantar de extrato de espícula na dose de 35 $\mu\text{g/pata}$ ou salina 0,9 % e tiveram a avaliação de volume de pata feita antes da injeção intraplantar, 1 e 6 horas após. Os animais tratados receberam indometacina 2,5 mg/Kg IP uma hora antes da injeção intraplantar (Painel A), indometacina 2,5 mg/Kg IP uma hora após a injeção intraplantar (Painel B), guanetidina 30 mg/Kg/dia SC durante 3 dias (Painel C) e loratadina 5 mg/Kg VO (Painel D). Os animais controle de indometacina receberam solução de bicarbonato 1,29%, e grupos controle de guanetidina e loratadina receberam salina 0,9 %. Os pontos representam a média \pm o EPM de 6 animais. *, ** e *** indicam respectivamente diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, na sexta hora no teste t de Student para amostras não pareadas.

4.3. RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA APÓS EXPOSIÇÃO AO FRIO OU AO CALOR

Nos experimentos realizados para avaliação nociceptiva e de edema de pata provocados por extrato de espícula, foi observado que aproximadamente 2 minutos após molharmos a pata (para verificação de edema) os animais voltavam a apresentar reações nocifensivas (sacudir e lambe as patas). Essa reação espontânea retardada pareceu ser em consequência do resfriamento da pata quando colocada na cuba com água. Para avaliação dessa hipótese, foi estabelecido um protocolo em que os animais recebiam injeção intraplantar e após 2 horas tinham a pata submersa até a articulação tíbio-társica, em água com temperatura e tempo padronizados. Imediatamente após a imersão em água os animais eram observados durante 10 minutos para contagem de reações nocifensivas. As exposições à água fria foram realizadas de uma em uma hora durante 6 horas.

A escolha da temperatura em 15° C se deu por ser uma temperatura bem abaixo da temperatura ambiente, ser considerada fria e incômoda mas não dolorosa. Passamos então a trabalhar com dois tempos de exposição, 10 e 20 segundos. Como a exposição ao frio durante 10 segundos mostrou resposta uniforme e que se repetia de maneira consistente, além de ser de maior intensidade que a ocorrida com 20s (figura 9), padronizou-se esse tempo de exposição para os procedimentos posteriores.

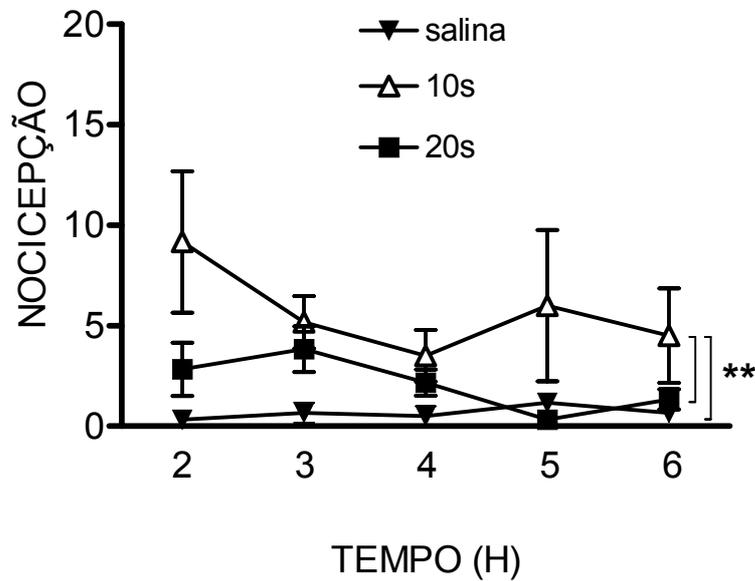


Figura 9: Padronização de tempo de exposição ao frio. Os animais receberam injeção intraplantar de extrato de espícula na dose 35 µg/pata, ou salina (triângulos fechados) e tiveram suas patas submersas em água a 15° C. Um grupo (triângulos abertos) foi exposto durante 10 segundos e o outro grupo (quadrados) foi exposto durante 20 segundos. As exposições ao frio foram realizadas a cada hora, a partir da segunda hora após injeção intraplantar, durante 6 horas e depois de cada exposição era contabilizada as reações nocifensivas durante 10 minutos. Os pontos representam a média de NLS ± EPM de 6 animais. ** indica diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls).

4.4. PAREAMENTO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR EXTRATO DE ESPÍCULA, CAPSAÍCINA, FORMALINA, PGE₂. COMPARAÇÃO DO EDEMA DE PATA

Com o objetivo de avaliarmos o grau de especificidade do extrato de espícula em induzir resposta nocifensiva tardia após estimulação com água gelada, procuramos adequar doses de outras substâncias utilizadas classicamente como estímulos nociceptivos para produzirem resposta nocifensiva imediata de intensidade semelhante à provocada pelo extrato de espícula.

Para tanto, as substâncias utilizadas e suas respectivas concentrações foram: extrato de espícula 35 µg/pata, capsaicina 1,6 µg/pata, formalina 0,5 %, PGE₂ 250 ng/pata. Todos animais receberam um volume de 50 µl/pata. Essas mesmas concentrações foram utilizadas para estudos comparativos de edema de pata. Como controles, um grupo recebeu injeção intraplantar de solução salina fisiológica, outro recebeu solução de etanol à 1 % (controle do grupo que recebeu PGE₂) e um terceiro grupo recebeu mentol 500 µM.

A observação da resposta nocifensiva foi feita durante 10 minutos após injeção intraplantar (figura 10). Para avaliação de edema foi feita a primeira medida antes da injeção intraplantar e as medidas subsequentes após 1 hora e 6 horas nos mesmos animais utilizados para avaliação nociceptiva (figura 11).

Os resultados mostram que nessas concentrações, prostaglandina E₂, capsaicina e formalina produziram, resposta nocifensiva de intensidade semelhante ao estímulo padronizado de extrato de espículas, ou seja, sem diferença estatística entre eles. Ainda, verificou-se que este estímulo de extrato de espícula causou edema

significativamente maior que os outros estímulos, entre a primeira e sexta hora após injeção intraplantar ($P < 0,01$). A injeção de mentol não teve efeito nociceptivo detectável, porém induziu pequeno efeito edematogênico semelhante à capsaicina e PGE_2 .

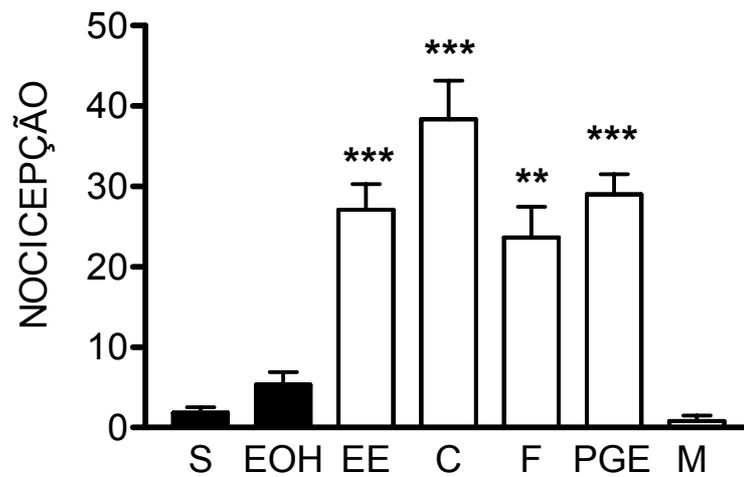


Figura 10: Nocicepção induzida por extrato de espícula, capsaicina, formalina, PGE₂ e mentol. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 50 µl de uma das substâncias a seguir: extrato de espícula 35 µg/pata (EE), capsaicina 1,6 µg/pata (C), formalina 0,5 % (F), PGE₂ 250 ng/pata, mentol 500 µM (M), salina 0,9 % (S) e etanol 1 % (EOH) e observou-se o número de reações nocifensivas durante 10 min, onde cada barra representa a média ± EPM. *** e ** indicam diferença estatística significativa em relação ao controle, ao nível de $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente (ANOVA de uma via seguida de teste Newman-Keuls).

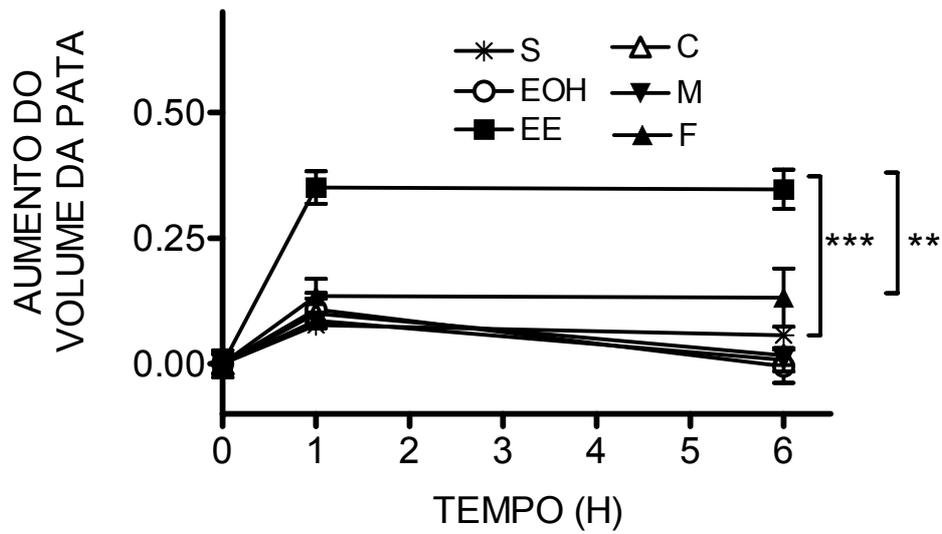


Figura 11: Edema induzido por extrato de espícula de *Lonomia obliqua*, capsaicina, formalina e mentol. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 50 μ l de uma das substâncias a seguir: extrato de espícula 35 μ g/pata (EE), capsaicina 1,6 μ g/pata (C), formalina 0,5 % (F), mentol 500 μ M (M), etanol 2 % (EOH) e salina 0,9% (S) e tiveram a avaliação de volume de pata feita antes da injeção intraplantar, 1 e 6 horas após. Os pontos representam a média \pm o EPM de 6 animais. ** e *** indica respectivamente diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,01$ e $p < 0,001$ entre a primeira e sexta hora. (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls).

4.5. COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS NOCIFENSIVAS TARDIAS AO FRIO INDUZIDAS POR EXTRATO DE ESPÍCULA, FORMALINA, CAPSAICINA, PGE₂ E MENTOL

Neste experimento o objetivo foi avaliar se a resposta nocifensiva tardia ao frio induzida por extrato de espícula de *Lonomia obliqua* também ocorreria com outras substâncias de atividade nociceptiva semelhante. As substâncias utilizadas foram a capsaicina 1,6 µg/pata, formalina 0,5 %, PGE₂ 250 ng/pata. Como controles um grupo recebeu salina fisiológica, outro recebeu mentol 500 µM e outro etanol 0,25 % (veículo do mentol). Todos animais receberam o mesmo volume de 50 µl/pata.

Neste procedimento experimental a avaliação da resposta nocifensiva tardia foi iniciada duas horas após injeção intraplantar e foi avaliada pelo número de lambidas e sacudidas de pata totalizados em 10 minutos após cada exposição à água fria com intervalos de observação de uma hora, durante 6 horas. A temperatura da água foi de 15° C, e o tempo de exposição de 10 segundos, como padronizados anteriormente.

Os resultados mostraram que o extrato de espícula de *Lonomia obliqua* produz resposta nocifensiva tardia ao frio significativamente maior que os estímulos clássicos (P<0,001), e estes últimos não diferem entre si e o controle de salina, nas concentrações avaliadas (figura 12). Também, o grupo que recebeu mentol não apresentou resposta tardia ao frio.



Figura 12: Comparação das respostas nocifensivas tardia ao frio induzidas por extrato de espícula, formalina, capsaicina, PGE₂ e mentol. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 50 µl de uma das substâncias a seguir: extrato de espícula 35 µg/pata (E), capsaicina 1,6 µg/pata (C), formalina 0,5 % (F), PGE₂ 250 ng/pata (P), mentol 500 µM (M), salina 0,9% (S) e etanol 0,25 % (Et). Depois de 2 horas os animais tiveram sua primeira exposição ao frio (15°C durante 10 segundos) e avaliação da resposta nocifensiva durante 10 minutos após cada exposição. Os dados representam média ± EPM de cada grupo. Grupo E mostrou em relação aos outros grupos diferença estatística significativa ao nível de p<0,001 (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.6. EFEITO DA INDOMETACINA, GUANETIDINA E LORATADINA SOBRE A RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA AO FRIO INDUZIDA POR EXTRATO DE ESPÍCULA DE *Lonomia obliqua*

Foi investigada a participação dos mediadores inflamatórios eicosanóides, aminas simpatomiméticas e a histamina na manifestação da resposta nocifensiva tardia ao frio induzida por extrato de espícula, e para este fim foram utilizadas indometacina, guanetidina e loratadina.

Um grupo de animais recebeu injeção intraplantar de 50 µl de salina 0,9 % e os outros animais receberam injeção intraplantar de extrato de espícula de *Lonomia obliqua* na dose de 35 µg/pata. Após 2 horas teve início a avaliação da resposta nocifensiva tardia pela contagem do número de lambidas e sacudidas da pata durante 10 minutos após exposição à água fria (15° C durante 10 segundos).

A indometacina foi aplicada na dose de 2,5 mg/Kg IP uma hora antes da injeção intraplantar assim como seu controle (solução de bicarbonato de sódio 1,29 %), em um grupo de animais, e um outro grupo recebeu indometacina uma hora após a injeção intraplantar de extrato de espícula. Como pode ser verificado na figura 13, painel A, a indometacina reduziu significativamente a resposta nocifensiva tardia induzida por extrato de espícula, quando aplicada antes do extrato de espícula.

O pré-tratamento realizado com guanetidina foi de 3 dias consecutivos, sendo que esta foi aplicada pela via sub-cutânea, na dose de 30 mg/Kg/dia e o experimento foi realizado no terceiro dia de tratamento. Os animais controle receberam salina 0,9 % sub-cutânea. Pudemos observar que o pré-tratamento com guanetidina não alterou a resposta nocifensiva tardia induzida por extrato de espícula (figura 13, painel C).

A loratadina foi administrada na dose de 5 mg/Kg VO uma hora antes do experimento. Os animais controle receberam salina 0,9 % VO. Os resultados demonstram que o pre-tratamento com o anti-histamínico loratadina não interfere na resposta nocifensiva tardia induzida por extrato de espícula (figura 13, painel D).

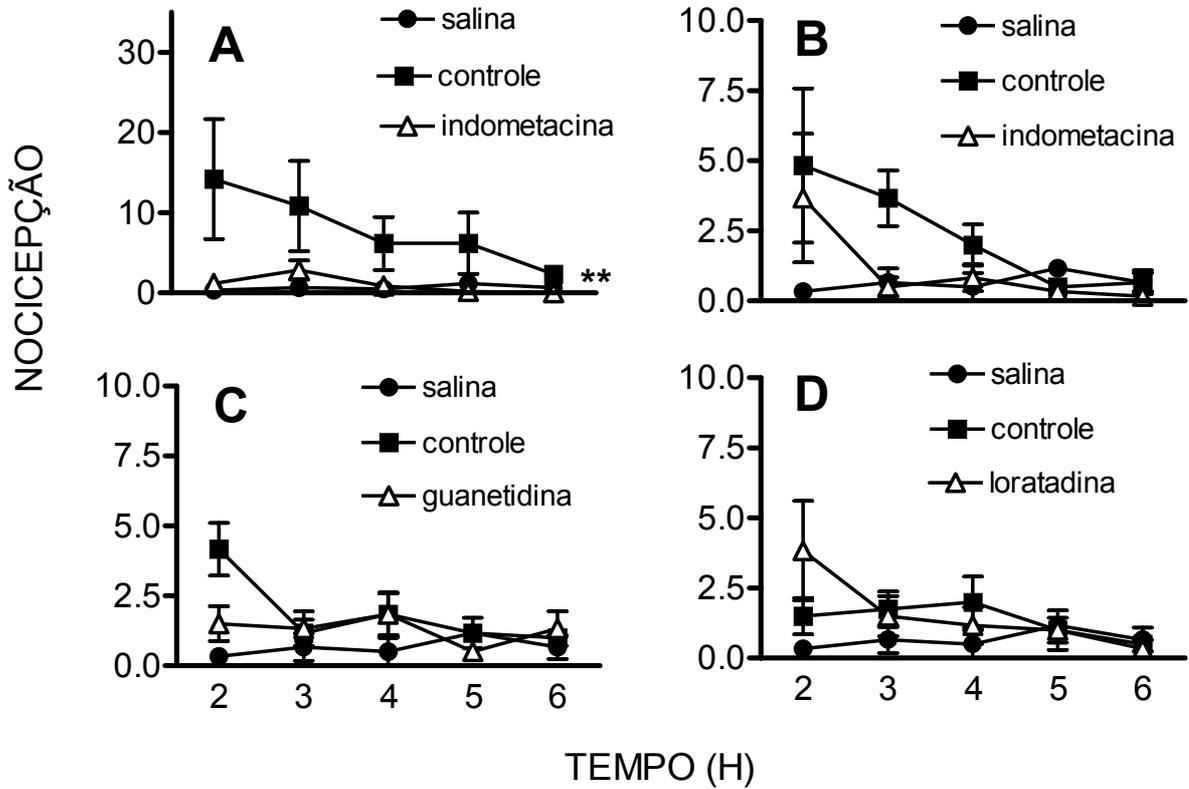


Figura 13: Efeito da indometacina, guanetidina e loratadina sobre a resposta nocifensiva tardia ao frio induzida por extrato de espícula de *Lonomia obliqua*. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 35 μ g/pata de extrato de espícula, ou salina 0,9 % (círculo fechado). A resposta nocifensiva tardia foi verificada pelo NLS de pata totalizados durante 10 minutos após exposição à água fria (15° C durante 10 segundos). A avaliação foi realizada a partir da segunda hora após injeção intraplantar, até a sexta hora. Os animais tratados receberam indometacina 2,5 mg/Kg IP uma hora antes da injeção intraplantar (Painel A), indometacina 2,5 mg/Kg IP uma hora após a injeção intraplantar (Painel B), guanetidina 30 mg/Kg/dia SC durante 3 dias (Painel C) e loratadina 5 mg/Kg VO (Painel D). O grupo controle de indometacina recebeu solução de bicarbonato 1,29 %, e os grupos controle de guanetidina e loratadina receberam salina 0,9 %. Os pontos representam média de 6 animais \pm EPM. ** indica diferença estatística significante ao nível de $p < 0,01$. Anova para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls.

4.7. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA INDUZIDA POR PGE₂ COM SENSIBILIZAÇÃO EM ÁGUA QUENTE

Uma vez que a sensibilidade nociceptiva térmica possui mecanismos diferentes para o frio ou calor, estendemos nosso estudo também sob a estimulação com água quente. Para a padronização de temperatura da água e tempo de exposição da pata, trabalhamos com PGE₂, pois esta substância produz reconhecida hiperalgesia ao calor. Neste protocolo experimental os animais receberam injeção intraplantar de 50 µl de PGE₂ ou solução controle para avaliação da resposta nocifensiva tardia. Depois de 2 horas da injeção intraplantar era feita a primeira exposição à água quente, e a partir de então de uma em uma hora até 6 horas. Após exposição à água quente a resposta nocifensiva era avaliada pelo número de lambidas e sacudidas da pata totalizados durante 10 minutos.

A dose de PGE₂ utilizada foi 250 ng/50µl, e como controle, uma solução de etanol a 1 % que foi a mesma concentração de etanol na solução aplicada de PGE₂.

As temperaturas utilizadas foram de 45° C, 47° C e 50° C e com os tempos de exposição de 10 segundos, 7 segundos e 5 segundos (figura 14). Nas temperaturas de 45 e 47° C/10s mesmo os grupos tratados com PGE₂ não apresentaram resposta tardia. Já os grupos estimulados com 50° C/10s tanto o grupo tratado com PGE₂ como o grupo controle apresentaram resposta tardia, embora o grupo estimulado com PGE₂ apresentou resposta significativamente maior (P<0,05). Os grupos estimulados com água a 50° C/5s não apresentaram resposta tardia, porém com a estimulação a 50° C/7s, apenas o grupo injetado com PGE₂ apresentou resposta tardia (P<0,01). Assim, escolhemos a temperatura de 50° C com 7 segundos de exposição, pois com estes

padrões foi obtida uma resposta nocifensiva tardia uniforme e que se repetia de maneira consistente, sem que houvesse sensibilização do grupo controle (figura 14, painel E).

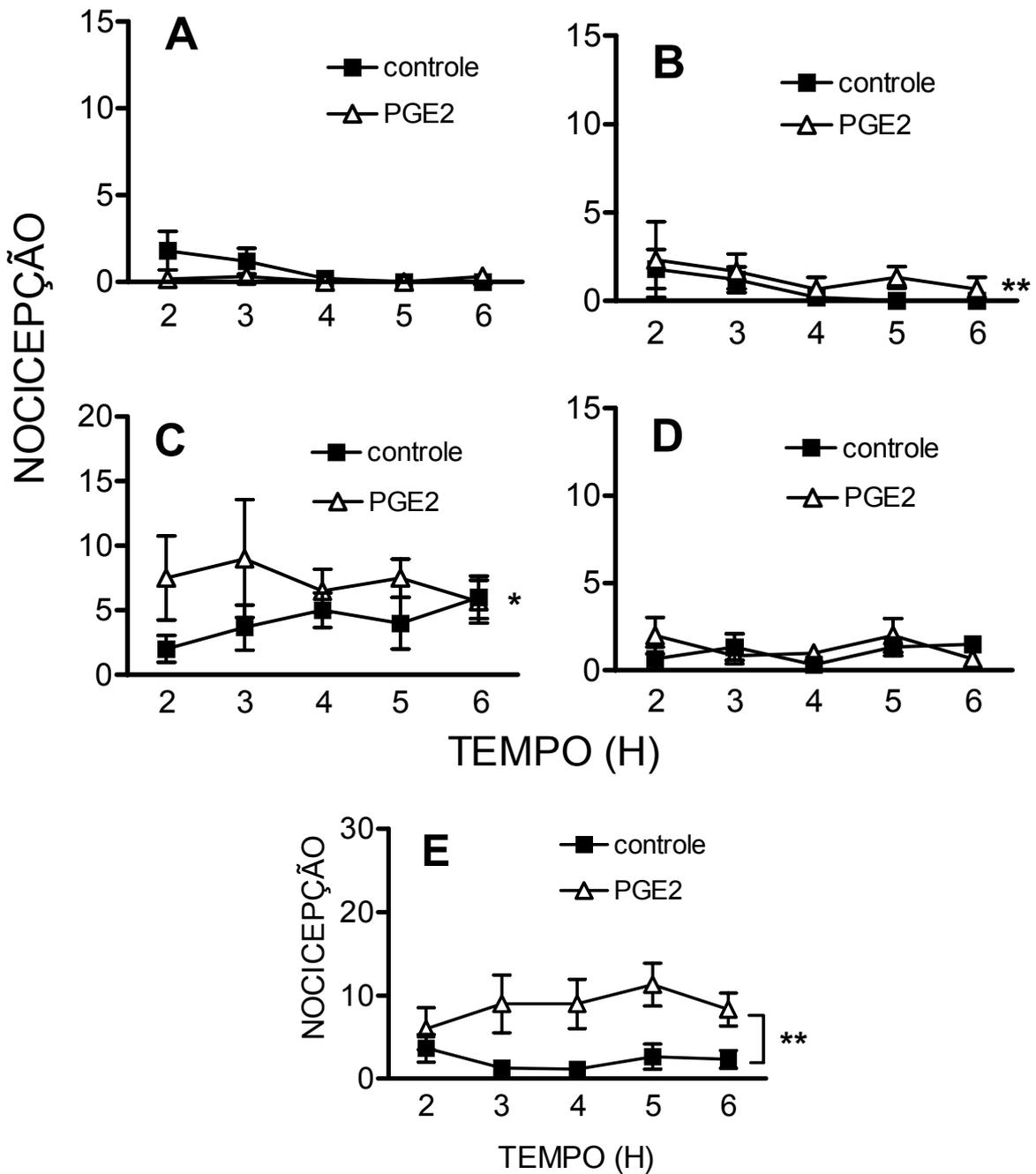


Figura 14: Avaliação de resposta nocifensiva tardia induzida por PGE₂ com sensibilização em água quente. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 250 ng/pata de PGE₂ ou solução controle (etanol 1 %). Após 2 horas foi iniciada a avaliação da resposta nocifensiva tardia à exposição de água quente, que foi verificada pelo NLS de pata durante 10 minutos. Os tempos e temperaturas de exposição foram: 10 segundos a 45° C (Painel A); 10 segundos a 47° C (Painel B); 10 segundos a 50° C (Painel C); 05 segundos a 50° C (Painel D); e 7 segundos a 50° C (Painel E). Os pontos indicam a média de 6 animais \pm EPM. ** e * indicam respectivamente diferença estatística significativa, ao nível de $p < 0,05$ e $p < 0,01$ no teste *t* de Student para amostras pareadas.

4.8. RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA AO CALOR INDUZIDA POR EXTRATO DE ESPÍCULA, FORMALINA, CAPSAICINA E PGE₂

Com a padronização do protocolo para avaliação da resposta nocifensiva tardia ao calor, passamos a avaliar se o extrato de espícula de *L. obliqua* e também outras substâncias clássicas com atividade nociceptiva, poderiam induzir resposta nocifensiva tardia ao calor. Neste experimento utilizou-se 35 µg/pata de extrato de espícula de *L. obliqua*, capsaicina 1,6 µg/pata, formalina 0,5 %, PGE₂ 250 ng/pata, etanol 1 % (controle de PGE₂) e salina 0,9 %. Todos animais receberam um volume de 50 µl/pata.

Neste procedimento experimental a avaliação da resposta nocifensiva tardia foi iniciada duas horas após injeção intraplantar e foi avaliada pelo número de lambidas e sacudidas de pata totalizados em 10 minutos após cada exposição à água quente (50°C durante 7 segundos). Este procedimento foi repetido com intervalos de uma hora, durante 6 horas.

Verificou-se que nas concentrações utilizadas a PGE₂ foi capaz de promover a maior resposta nocifensiva tardia ao calor, entretanto, o extrato de espícula de *L. obliqua*, e a formalina também produziram resposta significativa, já a capsaicina não provocou resposta (figura 15). A coluna representativa do etanol não está sendo demonstrada, para maior clareza do gráfico, pois não ocorreu resposta estatisticamente significativa.

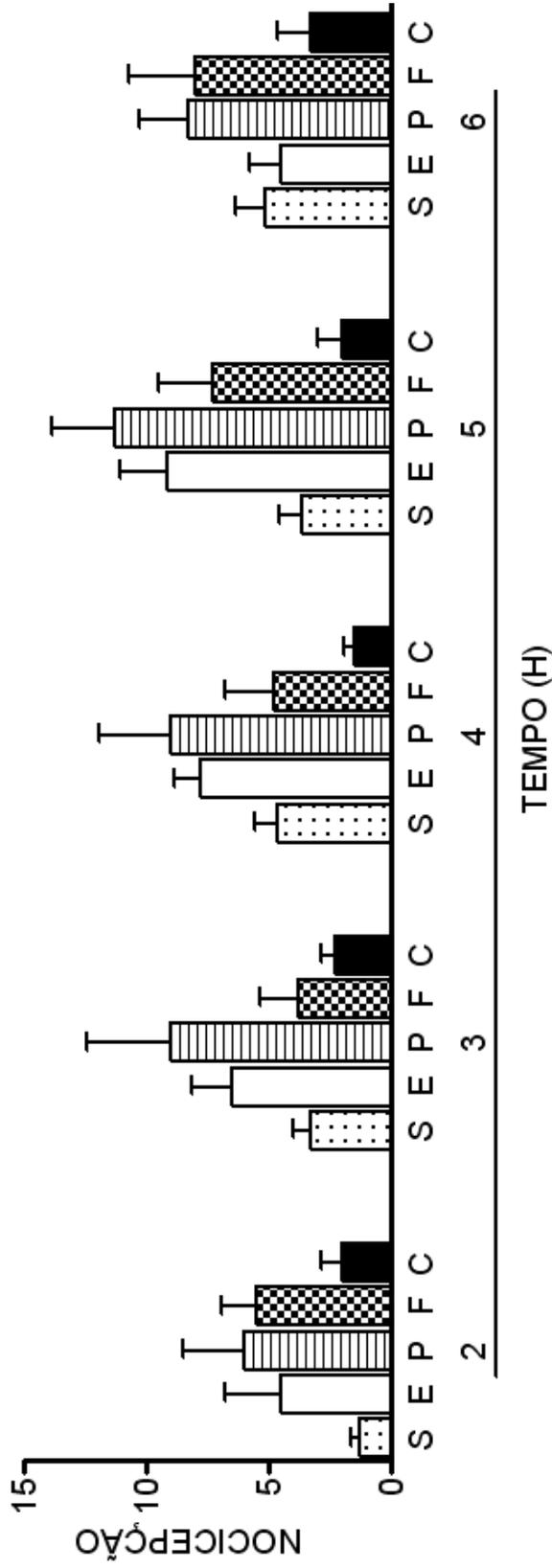


Figura 15: Resposta nocifensiva tardia ao calor induzida por extrato de espícula de *Lonomia obliqua*, formalina, capsaicina e PGE₂. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 50 µl de uma das substâncias: extrato de espícula 35 µg/pata (E), capsaicina 1,6 µg/pata (C), formalina 0,5% (F), PGE₂ 250 ng/pata (P), salina 0,9% (S). Depois de 2 horas os animais tiveram sua primeira exposição à água quente (50° C durante 7 segundos) e avaliação da resposta nocifensiva durante 10 minutos após cada exposição. Os dados representam média ± EPM de cada grupo. (E) mostrou em relação à (S) e (P) diferença estatística significativa ao nível de p < 0,05, e em relação à (C) diferença estatística significativa ao nível de p < 0,01; (P) mostrou em relação à (S) diferença estatística significativa ao nível de p < 0,001; (F) mostrou em relação à (S) diferença estatística significativa ao nível de p < 0,05. ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O veneno da forma larval de *L. obliqua* tem sido bastante estudado nos últimos anos, principalmente ao que se refere às suas propriedades bioquímicas, visando o isolamento de compostos que interfiram na coagulação sanguínea e produção de novos medicamentos (Arocha-Piñango *et al.*, 2000; Kelen *et al.*, 1995; Donato *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 1999,2001 a,b). Nada se sabe sobre a persistência de seqüelas sensoriais em humanos após o quadro nociceptivo inicial, visto que não existem dados de acompanhamento do paciente após alta médica do quadro hemorrágico. Deste modo, a padronização de um modelo para avaliação de nocicepção em ratos auxiliaria na previsão de possíveis seqüelas decorrentes do contato da pele com *L. obliqua*.

Neste trabalho caracterizamos o quadro nociceptivo produzido em ratos pelo extrato de espícula de *L. obliqua*, assim como a farmacologia desses eventos. Para isso utilizou-se um modelo experimental de injeções intraplantares, simulando a inoculação subcutânea de veneno pois a espícula de *L. obliqua* é bastante rígida, tendo a característica de penetrar na pele.

A preocupação inicial foi a padronização de uma concentração protéica de extrato de espículas, uma vez que não haviam dados disponíveis sobre doses para injeção intraplantar. Os resultados obtidos na avaliação nociceptiva (figura 4) e de edema de pata (figura 5) com doses decrescentes de extrato de espícula nos levaram a adotar a dose de 35 µg, pois o pico inicial de nocicepção foi de magnitude semelhante às doses maiores e a hematúria observada foi bem menos intensa.

Como não foram feitas provas para análise da coagulação sanguínea, pois não era o objetivo do estudo, apenas verificamos a possível alteração de coagulação

sanguínea pela observação visual de hematúria (Tabela 2). Nesta observação constatou-se que a capacidade do extrato de espícula em promover hematúria diminuía gradativamente após ressuspensão do extrato liofilizado. Entretanto, a resposta nocifensiva induzida pelo extrato não sofria alterações de intensidade significativas, sugerindo que existam componentes distintos agindo na coagulação sanguínea e na nocicepção (figura 6).

Inicialmente foi verificado que o extrato de espícula provoca de maneira consistente uma resposta nocifensiva dose dependente, monofásica de aproximadamente 30 minutos de duração (figura 4).

A resposta nocifensiva induzida por extrato de espícula de *L. obliqua* parece ser por uma ação direta sobre nociceptores em conjunto com uma ação indireta, através da liberação de agentes inflamatórios, principalmente prostaglandinas, uma vez que a resposta nocifensiva é significativamente, mas não completamente, reduzida pelo pre-tratamento com indometacina (figura 7). As aminas simpatomiméticas e a histamina parecem não ter relevância no processo de nocicepção induzido pelo extrato, pois o pre-tratamento com guanetidina, que depleta periféricamente os estoques neurais de aminas simpatomiméticas, e com loratadina, um antagonista periférico de receptores H₁, não reduziu significativamente a resposta nocifensiva (figura 7, painéis B e C). Entretanto, a variabilidade observada no grupo controle poderia mascarar possível efeito da guanetidina e da loratadina e, por limitação na obtenção de veneno não foi possível repetir o experimento.

O edema produzido pela injeção intraplantar de extrato de espícula é de latência curta, com pico entre 30 minutos e uma hora após injeção intraplantar, e tem duração mais longa que a nocicepção. Todas as doses testadas induziram edema de

mais de 6 horas, chegando a mais de 24 horas no caso da dose mais alta (figura 5). Respostas semelhantes foram observadas em estudos utilizando outras toxinas algogênicas de invertebrados como veneno de abelha (*Apis mellifera*) (Lariviere e Melzack, 1996; Chen *et al.*, 1999) ou veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (Costa *et al.*, 2001). E é semelhante também para algógenos químicos como a formalina e a capsaicina (Arvier *et al.*, 1977). A curta latência para a formação de edema, geralmente associado à nocicepção inicial, sugere a importância do componente inflamatório neurogênico. De fato, nos casos do veneno da aranha *P. nigriventer*, formalina e capsaicina, o edema foi demonstrado ser significativamente mediado por neurocininas, fibras sensoriais (Arvier *et al.*, 1977; Costa *et al.*, 2001). A latência curta para formação de edema pela injeção intraplantar do veneno de *L. obliqua* parece indicar também um fator neurogênico (liberação de neurocininas vasodilatadoras devido à despolarização dos nociceptores), mas também ocorre a liberação de mediadores inflamatórios não neurogênicos como prostaglandinas e histamina, uma vez que o pré-tratamento com indometacina e loratadina reduziram o edema após 6 horas, embora de forma significativa apenas com a utilização de loratadina (figura 8, painél D). Esta última informação pode sugerir que o quadro inflamatório induzido pelo veneno de *L. obliqua* em humanos pode não ser adequadamente controlado pelo uso simples de antiinflamatórios não-esteróides. O menor efeito da indometacina quando utilizada como pós-tratamento pode ser explicado pelo papel vasodilatador também desempenhado pela histamina neste modelo, como revelado pelo efeito inibitório produzido pela loratadina. Neste caso, pode ser que um tratamento combinado de um inibidor de síntese de prostaglandinas e um antagonista de receptores H₁ da histamina venha a ser mais adequado em humanos.

A despeito dos efeitos agudos da injeção do veneno de *L. obliqua* em ratos relatados até aqui, a observação fortuita de uma resposta nocifensiva espontânea minutos após a imersão da pata dos ratos em água fria quando era realizado o registro de edema, acabou se tornando um achado marcante deste estudo. Ele nos remete a um fenômeno muito pouco estudado experimentalmente, que é a nocicepção tardia (nossa tradução para o termo “after-sensation” utilizado na literatura internacional). Em humanos, este fenômeno é comumente associado a casos de neuropatias, quando um estímulo térmico ou mecânico evoca, mesmo após seu término, sensações dolorosas prolongadas (Devor *et al.*, 2002; Kristensen *et al.*, 1992). Em modelos animais de neuropatia o fenômeno de nocicepção tardia pode estar presente também, mas pode passar incógnito do pesquisador por estar, por exemplo, embutido em um comportamento de proteção prolongado do membro afetado após um estímulo (Attal *et al.*, 1990; Bennett e Xie, 1988). Por isso, em animais, o estudo experimental da dor geralmente se restringe aos fenômenos de hiperalgesia e/ou alodinia sempre pareados com o estímulo nociceptivo, sendo que em animais não neuropáticos as tentativas de estudar o fenômeno de nocicepção tardia são ainda mais restritas. Alguns autores procuraram acessar este fenômeno em modelos de vocalização induzida por choque elétrico (Viveros *et al.*, 1993; Lisney e Devor, 1987; Levine *et al.*, 1984; Paalzow e Paalzow, 1975), porém em todos estes estudos a nocicepção “tardia” induzida limita-se a poucos segundos após a aplicação do choque elétrico. Nossa observação reuniu características que são pouco usuais, para não dizer inéditas, em modelos experimentais animais. Primeiro, é um fenômeno de nocicepção com início vários minutos após um estímulo não doloroso. Segundo, o fenômeno não aparece em animais normais, mas especificamente em animais que receberam extrato de espícula.

Terceiro, é um fenômeno desencadeado especificamente por exposição ao frio não doloroso, quando a grande maioria dos estudos relacionados utilizam estímulo mecânico ou térmico-quente. Estas características nos incentivou a desenvolver um protocolo experimental para avaliação dessa resposta pouco conhecida, pois além de poder estar predizendo uma situação clínica que indivíduos acidentados com veneno de *L. obliqua* possam vir a apresentar, este protocolo deve fornecer um modelo para o estudo de uma nova dimensão da dor, não baseado nos fenômenos de hiperalgesia e/ou alodinia comumente estudados.

Embora a observação da resposta nocifensiva tenha se dado após a estimulação das patas dos animais em água à temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$), padronizamos a temperatura da água em 15°C , para afastar casualidades e garantir que todos os animais testados iriam experimentar a sensação fria, mas não um frio doloroso. Nestas condições, comparamos a capacidade do extrato de espícula (figura 12) em predispor os animais para a nocicepção tardia em resposta ao frio, com substâncias que classicamente são utilizadas em estudos de nocicepção, como PGE_2 , capsaicina e formalina. Para utilização dessas substâncias procurou-se trabalhar com concentrações que promovessem uma resposta nocifensiva direta total de magnitude semelhante à provocada pelo extrato de espícula. Pois, considera-se que a resposta de nocicepção tardia pode ser atribuída a um aumento da excitabilidade de motoneurônios, interneurônios e neurônios do corno dorsal em consequência a estímulos nociceptivos repetidos ou por causa de uma lesão (ver Guilbaud *et al.*, 1992). Desta forma, pareando os estímulos, procuramos garantir que os neurônios do corno dorsal da medula estariam recebendo entradas nociceptivas similares em cada caso. Os resultados obtidos mostraram que a resposta nocifensiva tardia ao frio promovida

pelo extrato de espícula foi significativamente maior que a resposta obtida com as outras substâncias (figura 12), e estas não produziram resposta diferente do controle. Esses dados sugerem que a intensidade da resposta tardia que estudamos aqui independe da intensidade da resposta nociceptiva inicial, além de sugerir que o veneno de *L. obliqua* contenha algum fator com atividade mais específica sobre a nocicepção, que induza esta sensibilidade ao frio.

A idéia de uma sensibilização específica ao frio fez com que o mentol fosse acrescentado a essa bateria de experimentos, pois este, quando em contato direto com a pele provoca sensação de frio. Os mecanismos moleculares da sensibilidade dos nociceptores ao frio estão sendo melhor compreendidos desde a descoberta de canais iônicos sensíveis ao frio doloroso (<15°C), e que também se abrem na presença de mentol (McKemy *et al.*, 2002). Para utilização do mentol nos baseamos em concentrações utilizadas em estudos eletrofisiológicos de canais iônicos ativados por frio (Reid e Flonta, 2002; McKemy *et al.*, 2002). Em todos os experimentos realizados, no entanto, o mentol não promoveu resposta nocifensiva inicial (figura 10), tampouco após estimulação em água fria (figura 12). Isso pode ser devido ao fato de que os canais iônicos ativados por mentol não estejam realmente implicados nesta resposta de nocicepção tardia promovida pelo extrato de espículas, ou porque em modelos *in vivo* seria preciso uma concentração maior de mentol. Sem dúvida, será necessário um estudo mais aprofundado com esta substância.

Os estudos farmacológicos para avaliação da resposta nocifensiva tardia ao frio induzida por extrato de espícula, demonstraram que essa resposta é sensível ao tratamento com indometacina, tanto aplicada previamente, como após a injeção intraplantar de extrato de espícula (figura 13, painéis A e B), sugerindo importante

participação de prostaglandinas no processo. Em linha com nossas observações, foi demonstrado que inibidores de ciclooxigenase, também inibem o fenômeno de pós-descarga registrado em neurônios do corno dorsal da medula espinhal de ratos, em resposta a estimulação nociceptiva (Pitcher e Henry, 1999; 2001). Entretanto, as prostaglandinas não devem ser os únicos mediadores envolvidos, pois a PGE₂ isoladamente não foi capaz de promover esta resposta nocifensiva tardia ao frio (figura 12), ou outros prostanóides que não a PGE₂ medeiam o processo. As aminas simpatomiméticas poderiam ser outros mediadores envolvidos nesta resposta tardia, pois o frio provoca uma vasoconstrição de origem simpática que leva à liberação de aminas simpatomiméticas e estas podem sensibilizar nociceptores (Nakamura e Ferreira, 1987; Duarte *et al.*, 1988). A liberação de histamina também tem sido associada a estímulos frios, principalmente em certas manifestações de urticária (Delorme *et al.*, 2002; Capulong *et al.*, 1997), e como podem excitar subpopulações de Fibras C (Schmelz *et al.*, 1997), também foi pesquisada sua participação na resposta nocifensiva tardia ao frio. Nossas observações quanto a participação de mediadores de fibras simpáticas ou da histamina, entretanto, não foram conclusivas. Pois, tanto animais tratados quanto não-tratados, com guanetidina ou loratadina, não apresentaram resposta de diferença estatisticamente significativa entre si e do controle (figura 13, painel C e D). Infelizmente, não pudemos repetir estes experimentos até o momento de terminar esta dissertação.

Continuando, estendemos a avaliação de nocicepção tardia também para estimulação térmica quente, primeiro para verificarmos se o veneno induz nocicepção tardia ao frio de forma exclusiva, ou afeta também a percepção para o calor. Segundo, para verificarmos se a especificidade ao frio, que o extrato de espícula apresentou em

relação aos outros estímulos nociceptivos, se manteria para estímulos quentes. Sendo a PGE₂ sabidamente um agente que promove hiperalgesia a estímulos quentes (Kumazawa *et al.*, 1994), ela foi utilizada para padronização de tempo e temperatura de exposição ao calor. Após algumas tentativas, chegou-se a um padrão de resposta ideal em que ocorria resposta nocifensiva tardia dos animais que recebiam PGE₂, sem que ocorresse o mesmo padrão de resposta para o grupo controle. A temperatura escolhida foi 50°C e o tempo de exposição de 7 segundos. A alteração sutil de tempo de exposição se mostrou suficiente para promover padrões de resposta distintos, sendo que a exposição ao calor durante 10 segundos causou sensibilização do grupo controle, que passou a exibir nocicepção tardia de intensidade semelhante ao grupo que recebeu PGE₂. A avaliação da resposta nocifensiva tardia ao calor induzida por diferentes substâncias nociceptivas demonstrou diferenças significativas em relação ao estímulo frio (figura 15). A começar pela PGE₂, que quando aplicada na pata, não produziu resposta significativa quando estimulada por água fria, e foi capaz de produzir a maior resposta entre as várias substâncias estimuladas por água quente. Estes resultados estendem o conhecimento da capacidade da PGE₂ em produzir sensibilidade ao calor, pois além de seu conhecido efeito hiperalgésico, foi possível padronizar um modelo no qual se pode estudar apenas o fenômeno de nocicepção tardia ao calor induzido por esta substância. Por outro lado, a resposta nocifensiva tardia induzida por extrato de espícula perante estímulo quente produziu resposta de magnitude semelhante ao ocorrido com estímulo frio, sendo entre as substâncias estudadas, a única que produziu resposta perante estímulo frio e quente. Na verdade, depois que ficou demonstrado que a PGE₂ promove o fenômeno de nocicepção tardia ao estímulo de água quente, não surpreendeu o fato do extrato de espícula fazer o

mesmo, pois como vimos no estudo de nocicepção imediata este último também induz liberação de prostaglandinas. A diferença de intensidade entre a resposta ao calor promovida pela PGE₂ e a aquela promovida pelo extrato de espículas, pode residir unicamente na quantidade e/ou tipo liberado de prostaglandina induzida pelo extrato, mas diferentemente da resposta ao frio, parece que a resposta ao calor induzida pelo extrato de espícula seja mediado principalmente por prostaglandinas, pois foi acentuadamente reduzido pelo tratamento com indometacina. O mesmo raciocínio pode ser aplicado também à formalina 0,5%, pois esta também induz grande liberação de prostaglandinas. Porém, não podemos neste caso afirmar se o fenômeno de nocicepção tardia ao estímulo quente é devido à ação sensibilizante da prostaglandina sobre nociceptores (Ferreira *et al.*, 1974; Mizumura *et al.*, 1987, 1991; Rueff e Dray, 1993; Kumazawa *et al.*, 1996), ou é devido à sensibilização das vias nociceptivas em consequência da atividade nociceptiva inicial (Guilbaud, 1992), pois mesmo a prostaglandina produziu nocicepção espontânea. No entanto, a incapacidade da capsaicina em promover este efeito, uma vez que este agente causou intensidade nociceptiva imediata semelhante aos outros estímulos, e reconhecidamente causa sensibilização central (LaMotte *et al.*, 1991), poderia sustentar a idéia de que o fenômeno de nocicepção tardia ao calor, assim como ao frio, independe do estímulo nociceptivo inicial. Porém, sabe-se que a capsaicina também produz dessensibilização dos nociceptores a estímulos subseqüentes (Carstens, 1997), e isto poderia estar inibindo o fenômeno de nocicepção tardia, pois não haveria a ativação suficiente destes nociceptores pelo calor para desencadear a respectiva resposta tardia. Assim, no caso da estimulação a quente, não está claro se a atividade nociceptiva inicial das substâncias utilizadas seria suficiente para promover o fenômeno de nocicepção tardia.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o extrato de espícula de *Lonomia obliqua* provoca resposta nocifensiva de curta duração e edema de pata dose-dependente em ratos. A resposta nocifensiva pode estar relacionada com ação direta sobre nociceptores e também ação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas. As aminas simpatomiméticas e histamina parecem não participar desse processo.

As prostaglandinas e histamina parecem participar da formação de edema de pata provocado por extrato de espícula. Estudos farmacológicos mais detalhados poderiam demonstrar a participação de outros mediadores inflamatórios que não foram investigados, mas os efeitos inibitórios observados até aqui com o uso de um antiinflamatório do tipo da aspirina e um anti-histamínico H₁, sugere que fármacos destes tipos seriam adequados para o tratamento sintomático dos distúrbios cutâneos causados pelo veneno de *L. obliqua*.

A observação de ocorrência de resposta nocifensiva tardia espontânea à água fria (15°C) e água quente (50°C) provocada pela injeção intraplantar de extrato de espícula em ratos abriu a possibilidade do estudo do fenômeno de nocicepção tardia, um fenômeno pouco estudado, e que é muito relacionado com neuropatias em humanos. Este fenômeno pode indicar também a ocorrência de seqüelas sensoriais nos acidentes de humanos com *L. obliqua*. A padronização do modelo animal para a observação dessa resposta tardia mostrou-se viável para estudos com a finalidade de se evitar a ocorrência de seqüelas sensoriais após acidente com *L. obliqua*.

__ 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, Z. **A Taturana**. VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA CIRÚRGICA. **Anais**. Belo Horizonte, Vol 2: 132-135, 1912
- AROCHA-PIÑANGO, C.L.; DE BOSCH, N.B.; TORRES, A.; GOLDSTEIN, C.; NOUËL, A.; ARGUELLO, A.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A.; ET.AL. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. **Thromb Haemost.**,67(4):402-407, 1992.
- AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. **Biochemie** 82:937-42, 2000.
- ARVIER, P.T.; CHAHL, L.A.; LADD, R.J. Modification by capsaicin and compound 48/80 of dye leakage induced by irritants in the rat. **Br J Pharmacol**, 59(1): 61-68, 1977.
- ATTAL, N.; JAZAT, F.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, 41(2): 235-251, 1990.
- BENNETT G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, 33(1): 87-107, 1988.
- BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain** Churchill Livingstone, Edinburgh: 85-103, 1999.
- BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, 30(5):791-7, 1985.
- CAPULONG, M.C.; TOMIKAWA, M.; TAHARA, K.; AKASAWA, A.; IIKURA, Y. Cold stimulation test and histamine release in primary acquired cold urticaria. **Int. Arch Allergy Immunol.**, 114(4): 400-403, 1997.
- CARSTENS, E. Response of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. **J. Neurophysiol.** 77: 2499-2514, 1997.

- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in pain pathway. **Nature**, 389:816-824, 1997.
- CATERINA, M.J.; ROSEN T.A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A.J.; JULIUS, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, 398:436-441, 1999.
- CHEN, H.S.; CHEN, J. Secondary heat, but not mechanical, hyperalgesia induced by subcutaneous injection of bee venom in the conscious rat: effect of systemic MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. **European Journal of Pain**, 4(4):389-401, 2000.
- CHEN, J.; LUO, C.; CHEN, H. Primary hyperalgesia to mechanical and heat stimuli following subcutaneous bee venom injection into the plantar surface of hind paw in the conscious rat: a comparative study with the formalin test. **Pain**, 83(1):67-76, 1999.
- COSTA, S.A.; ESQUISATTO, L.C.; CAMARGO, E.; GAMBERO, A.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. **Life Sci**, 69(13): 1573-85, 2001.
- DELORME, N.; DROUET, M.; THIBAudeau, A.; VERRET, J.L. Cold induced urticaria. **Allerg. Immunol.** (Paris), 34(7): 255-258, 2002.
- DEVOR, M.; GOVRIN-LIPPMANN R.; RAPPAPORT, Z.H. Mechanism of trigeminal neuralgia: an ultrastructural analysis of trigeminal root specimens obtained during microvascular decompression surgery. **J Neurosurg**. 96(3): 532-43, 2002.
- DONATO, J.L.; MORENO, R.A.; HYSLOP, S.;DUARTE, A.; ANTUNES, E.; LE BONNIEC, B.F.; RENDU, F.; DE NUCCI, G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of Factor X and prothrombin. **Thromb. Haemost.**79(3):539-542, 1998.
- DUARTE, A.C.;WALTER, G.; BARROS, E. *Lonomia obliqua*. Acidentes com Animais Peçonhentos: consulta rápida. Serviço de eventos do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 207: 163-168, 1997.
- DUARTE, I.D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol.Res.**, 21(2):341-3, 1988.

- ELLIOT, A.A.; ELLIOT, J.R. characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. **Journal of Physiology**, 463:39-56, 1993.
- ELLIOT, J.R. Slow Na⁺ channel inactivation and bursting discharge in a simple model axon: implications for neuropathic pain. **Brain Research**, 754:221-226, 1997.
- ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **Journal of Physiology**, 495(Pt2):429-40, 1996.
- ERNBERG, M.; LUNDEBERG, T.; KOPP, S. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals. **Pain**, 85(1-2):31-39, 2000a.
- 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**, 84:339-46, 2000b.
- FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Proceedings: potentiation by prostaglandins of the nociceptive activity of bradykinin in the dog knee joint. **British Journal of Pharmacology**. 50: 461, 1974.
- FOCK, S.; MENSE, S. Excitatory effects of 5-hydroxytryptamine, histamine and potassium ions on muscular group IV afferent units: a comparison with bradykinin. **Brain Research**, 105(3):459-69, 1976.
- FRAIHA, H.; BALLARINIE, A.J.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA JR., D; DIAS, L.B. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepdoptera: Saturniidae). In Instituto Evandro Chagas – 50 anos de Contribuição às ciências Biológicas e à Medicina Tropical, Vol. 2,p. 811-820, 1986.
- GOLD, M.S.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Characterization of six voltage-gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, 75(6):2629-46, 1996.
- GUILBAUD, G.; KAYSER, V.; ATTAL, N.; BENOIST, J.M.. Evidence for a central contribution to secondary hyperalgesia. WILLIS, W.D. **Hyperalgesia and Allodynia** Raven Press Ltd., New York, 187-201, 1992.

- HMELJEVSKI, K.V.; GRISARD, E.C.; CARVALHO-PINTO, C.J. Estudo da biologia de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepoptera: Saturniidae) em condições de laboratório —parte 2.In: XI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSC —. **Anais**. Florianópolis. p 442, 2001.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413:203-210, 2001.
- KELEN, E.M.A.; PICARELLI, Z.P.; DUARTE, A.C. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturnidae, Hemileucinae). **J. Toxicol-Toxin Rev** 14(3):283-308, 1995.
- KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J. Neurophysiology**, 81(3):1104-12, 1999.
- KODA, H.; MINAGAWA, M; SI-HONG, L.; MIZUMURA, K; KUMAZAWA, T. H1-receptor-mediated excitation and facilitation of the heat response by histamine in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. **J Neurophysiology**, 76(3): 1396-404, 1996.
- KOPPERT, W.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. Conditioning of histamine by bradykinin alters responses of rat nociceptor and human itch sensation. **Neuroscience Lett**, 152(1-2):117-20, 1993.
- KRISTENSEN, J.D.; SVENSSOON, B.; GORDH, T.JR. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. **Pain**. 51(2): 249-53, 1992.
- KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; KODA, H. Possible involvement of the EP2 receptor subtype in PGE2-induced enhancement of the heat response of nociceptors. **Neurosci Lett**, 175(1-2):71-73, 1994.
- KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; KODA, H.; FUKUSAKO, H. EP receptors subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. **Journal of Neurophysiology**. 75: 2361-68, 1996.
- LA MOTTE, R.H.; SHAIN, C.N.; SIMONE, D.A.; TSAI, E.E.P. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. **Journal of Neurophysiology**. 66: 190-211, 1991.

- LARIVIERE, W.R.; MELZACK, R. The bee venom test: a new tonic-pain test. **Pain**, 66(2-3):271-77, 1996.
- LEBRUN, B.; ROMI-LEBRUN R.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; YASUDA, A.; ISHIGURO, M.; OYAMA, Y.; PONGS, O.; NAKAJIMA, T. A four-disulphide-bridge toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpinidae) venom. **Biochem J.** 328(Pt1): 321-327, 1997.
- LEMAIRE, C. Revision du genre *Lonomia* Walker, (Lepidoptera., Attacidae). Annales de la Societé Entomologique de France, 8(4):767-861, 1972.
- LEVINE, J.D.; FELDMESSER, M.; TECOTT, L.; GORDON, N.C.; IZDEBSKI, K. Pain-induced vocalization in the rat and its modification by pharmacological agents. **Brain Res.** 296(1): 121-127, 1984.
- LISNEY, S.J.; DEVOR, M. Afterdischarge and interactions among fibers in damaged peripheral nerve in the rat. **Brain Res.** 415(1):122-36, 1987.
- LORINI, L.M. **A Taturana**: Aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua*. EDIUPF, Universidade de Passo Fundo, 1999.
- MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.S.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R.T.; CUNHA-MELO, J.R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon.** 37: 1155-64, 1999.
- MARTIN, H.A.; BASBAUM, A.I.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Leukotriene B₄ decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. **J. Neurophysiology**, 60(2):438-45, 1988.
- MATZNER, O.; DEVOR, M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. **Journal of Neurophysiology**, 72(1):349-59, 1994.
- MCKEMY, D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416: 52-58, 2002.
- MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends in Neurosciences**, 13:199-201, 1990.

- MIZUMURA, K.; SATO, J.; KUMAZAWA, T. Effects of prostaglandins and other putative chemical intermediaries on the activity of canine testicular polymodal receptors studied in vitro. **Pflugers Archiv**. 408: 565-572, 1987.
- MIZUMURA, K.; SATO, J.; KUMAZAWA, T. Comparasion of the effects of prostaglandins E2 and I2 on testicular nociceptor activities studied in vitro. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**. 344: 368-376, 1991.
- MIZUMURA, K.; MINAGAWA, M.; KODA, H.; KUMAZAWA, T. Histamine-induced sensitization of the heat response of canine viscera polymodal receptors. **Neuroscience Lett.**, 168(1-2):63-6, 1994.
- NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, 135: 145-153, 1987.
- NEUGEBAUER, V.; SCHIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. **Pflugers Arch.**, 415(3):330-5, 1989.
- NICOL, G.D.; VASKO, M.R.; EVANS, A.R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, 77(1):167-76, 1997.
- NOWACKI, L.C. **Os possíveis mediadores envolvidos na gênese da hiperalgesia induzida pela administração do veneno bruto de *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) em patas de ratos.** Dissertação (Mestrado em farmacologia) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000.
- PAALZOW, G.; PAALZOW, L. Enhancement of apomorphine-induced inhibition of vocalization afterdischarge response by theophylline. **Life Sci.** 17(7): 1145-51, 1975.
- PEARL, E.R. Alterations in the responsiveness of cutaneous nociceptors: sensitization by noxious stimuli and the induction of adrenergic responsiveness by nerve injury., Ed. WILLIS, W.D. **Hyperalgesia and Allodynia**, Raven Press, New York: 59-79, 1992.
- PITCHER, G.M.; HENRY, J.L. NSAID-induced cyclooxygenase inhibition differentially depresses long-lasting versus brief synaptically-elicited responses of rat spinal dorsal horn neurons in vivo. **Pain.** 82(2): 173-86, 1999.

- PITCHER, G.M.; HENRY, J.L. Meloxicam selectively depresses the afterdischarge of rat spinal dorsal horn neurones in response to noxious stimulation. **Neurosci Lett.** 305(1): 45-48, 2001.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. Ed. WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain** Churchill Livingstone, Edinburgh: 11-57, 1999.
- REID, G.; FLONTA, M.L. Ion channels activated by cold and menthol in cultures rat dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience letters**, 324:164-168, 2002.
- REIS, C.V.; KELEN, E.M.A.; FARSKY, S.H.P.; PORTARO, F.C.V.; SAMPAIO, C.A.M.; FERNANDES, B.L.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A Ca⁺⁺ activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the hemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. **Lancet**, 353:1942, 1999.
- REIS, C.V.; PORTARO, F.C.V.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C.A.M.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (LOPAP) biochemical characterization. **Thrombosis Research**, 102:427-436, 2001a.
- REIS, C.V.; FARSKY, S.H.P.; FERNANDES, B.L.; SANTORO, M.L.; OLIVA, M.L.V.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. In vivo characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. **Thrombosis Research**, 102:437-443, 2001b.
- RUBIO, G.B.G. Vigilância epidemiológica da distribuição da lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855, no Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 17(4):1036, 2001.
- RUEFF, A.; DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent fibers in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. **Neuroscience**, 54(2):527-35, 1993.
- SAFRONOV, B.V.; BISCHOFF, U; VOGEL, W. Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurons of rat. **Journal of Physiology**, 493(Pt2):393-408, 1996.
- SCHEPELMANN, K.; MESSLINGER, K.; SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I₂. **Neuroscience**, 50(1):237-47, 1992.

- SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; BICKEL, A.; HANDWERKER, H.O.; TOREBJÖRK, H.E. Specific C-receptors for itch in human skin. **The Journal of Neuroscience**, 17(20):8003-08, 1997.
- SILVA, W.D.; CAMPOS, A.C.M.R.; GONÇALVES, L.R.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; HIGASHI, H.G.; YAMAGUSHI, I.K.; KELEN, E.M.A. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, 34(9):1045-1049, 1996.
- SIMONE, D.A.; ALREJA, M.; LAMOTTE, R.H. Psychophysical studies of the itchy sensation and itchy skin ("alloknesis") produced by intracutaneous injection of histamine. **Somatosens. Mot. Res.**, 8(3):271-9, 1991.
- SUÁREZ, G.G.; PINTO, C.; ZANNIN, M.; GRANDO, M. Distribuição geográfica do Gênero *Lonomia* no Estado de Santa Catarina. XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA. **Resumos Recife PE.**, p 186, 1998.
- SUÁREZ, G.G. **Biologia de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em condições de laboratório.** Trabalho de conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas, UFSC, 2000.
- TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, 32(3):577-80, 1989.
- TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, 44(1):131-5, 1991.
- VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepdoptera, Saturniidae). **Toxicon**, 39:1343-1351, 2001.
- VIVEROS, M.P.; PUJOL, A.; DE CABO, C.; MARTIN, M.I. A study on the development of nociceptive responses in pre-and postweanling rats: the tail electric stimulation test as a suitable methodology. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, 15(1):31-33, 1993.
- WHALLEY, E.T.; CLEGG, S.; STEWART, J.M.; VAVREK, R.J. Antagonism of the algescic action of bradykinin on the human blister base. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 247A:261-68, 1989.

YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T.J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**, 15(5):3263-72, 1995.

YOU, H.J.; CHEN, J.; MORCH,C.D.; ARENDT-NIELSEN, L. Differential effect of peripheral glutamate (NMDA, non-NMDA) receptor antagonist on bee venom-induced spontaneous nociception and sensitization. **Brain Res Bull.**, 58(6): 561-67, 2002.

ZANNIN, M. **Avaliação dos parâmetros de coagulação e fibrinólise no plasma de pacientes acidentados por contato com lagartas *Lonomia obliqua***. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo . Inst. De Farmacologia. Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular. São Paulo, 2002.