

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
NÚCLEO DE SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO,  
ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DOS VENENOS DE *Rhinella marina* E  
*Rhinella jimi* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

PORTO VELHO

2016

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO,  
ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DOS VENENOS DE *Rhinella marina* E  
*Rhinella jimi* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR, RO) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

**Orientador: Prof. Drº Quintino Moura Dias Júnior**

PORTO VELHO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

A282a

Aguiar, Maria de Fátima Rodrigues.  
Avaliação do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório,  
antidepressivo e ansiolítico dos venenos de *Rhinella marina* e  
*Rhinella jimi* em camundongos suíços / Maria de Fátima Rodrigues  
Aguiar, Porto Velho/RO, 2016.  
173f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação  
Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Quintino Moura Dias Júnior.

1. Veneno de Anuros 2. Antinociceptivo 3. Anti-inflamatório. I. Título.

CDU: 577.1

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11-549

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

MARIA DE FÁTIMA RODRIGUES AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO,  
ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DOS VENENOS DE *Rhinella marina* E  
*Rhinella jimi* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

Defesa Pública realizada em 18 de maio de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Quintino Moura Dias Júnior  
Presidente

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Renildo Moura da Cunha  
Membro da banca examinadora

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Rosely Valéria Rodrigues  
Membro da banca examinadora

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são destinados:

- À Deus, pelos fatos que só a fé pode explicar em determinadas situações;
  - Ao meu orientador por todo apoio e paciência que me foram dedicados nesse período de pós-graduação. Pelos ensinamentos transmitidos, pelas discussões, pela ajuda, por aceitar o desafio de acolher uma aluna que não possuía nenhum conhecimento sobre o tema, por manter a calma enquanto eu mantenho o desespero: diante de cada prazo, apresentação, relatório, dissertação, qualificação e defesa. Acima de tudo por gostar do trabalho que realiza e saber como fazer com que os alunos sejam capazes de visualizar o brilho que está por trás de cada gráfico;
  - Aos meus pais, por me transmitirem ensinamentos preciosos sobre a vida e a maneira como ela deve ser conduzida. Minhas conquistas são sempre para vocês;
  - Ao meu irmão, por todo apoio concedido;
  - Ao meu marido, pelo apoio, pela ajuda, por compartilhar os momentos de apreensão e desespero nesta fase;
  - Aos meus colegas de classe, sem dúvida foi muito bom estar com todos;
  - Às minhas amigas da FIOCRUZ e também companheiras de mestrado, por se desesperarem juntamente comigo e me apoiarem nesta fase, por sempre terem um “vamos conseguir” e um lanche disponível;
  - Aos meus amigos pelas palavras de apoio e por acreditarem em mim;
  - Ao Dr<sup>o</sup> Carlos Jared, do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantã, por nos fornecer os venenos que tornaram este trabalho possível;
  - À banca de qualificação e defesa (Dr<sup>a</sup> Carolina Bioni Garcia Teles, Dr<sup>a</sup> Gisele Martins Gonçalves, Dr<sup>a</sup> Rosely Valéria Rodrigues e Dr<sup>o</sup> Renildo Moura Cunha) pelas contribuições valiosas a este trabalho;
  - Aos demais que participaram direta ou indiretamente deste processo, deste trabalho, desta conquista;
- Meu muito obrigada a todos!

“A ciência é uma mescla de dúvida e certeza. O bom cientista é arrogantemente humilde, o que não se reduz a um mero jogo de palavras: arrogante em relação ao método e humilde quanto à fé no seu conhecimento.”

**Bachrach**

## RESUMO

### **AValiação DO EFEITO ANTINOCEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DOS VENENOS DE *Rhinella marina* E *Rhinella jimi* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

**AUTORA:** Maria de Fátima Rodrigues Aguiar

**ORIENTADOR:** Quintino Moura Dias Júnior

Venenos e secreções de anuros bufonídeos são fontes abundantes de moléculas bioativas potencialmente úteis em saúde pública. No entanto, pouco se sabe sobre as propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antidepressivas e ansiolíticas desses venenos. Assim, a proposta do presente estudo foi avaliar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório, antidepressivo e ansiolítico dos venenos de duas espécies de anuros bufonídeos: *Rhinella marina* e *Rhinella jimi*. No estudo utilizamos camundongos suíços. Estes animais foram previamente pré-tratados com 3 diferentes doses (60, 180 ou 360 µg/ 300 µL) de veneno de cada espécie e após 1 hora foram submetidos ao teste da formalina, teste da carragenina, teste do nado forçado ou teste do campo aberto que avaliam, respectivamente, a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antidepressiva e ansiolítica destes venenos. No teste da formalina, quantificou-se durante 1 hora o número de respostas nociceptivas em resposta à injeção de formalina a 1%. No teste da carragenina quantificou-se o aumento de volume (edema) de pata induzido por injeção subcutânea intraplantar de carragenina a 1% ao longo de 5 horas. No teste do campo aberto avaliou-se a atividade locomotora e nível de ansiedade durante 5 minutos. No teste do nado forçado quantificou-se o tempo total de imobilidade e de nado durante uma sessão de 6 minutos de nado. Como resultados, observamos que o pré-tratamento com veneno de *Rhinella marina* e de *Rhinella jimi* possuem significativa atividade antinociceptiva em ambas as fases do teste da formalina. Na dose de 60 µg e 180 µg/300 µL, o veneno de *Rhinella marina* não alterou significativamente a 1ª fase de respostas nociceptivas mas reduziu significativamente a intensidade e duração das respostas nociceptivas da 2ª fase do teste. Na dose de 360 µg/ 300 µL, o veneno de *Rhinella marina* reduziu significativamente a 1ª fase e aboliu significativamente as respostas nociceptivas na 2ª fase do teste. Nas 3 doses testadas o veneno de *Rhinella jimi* atenuou significativamente tanto a 1ª quanto a 2ª fase. Ambos os venenos atenuaram significativamente a intensidade do edema induzido pela injeção de carragenina a 1%. O efeito anti-inflamatório do veneno de *Rhinella marina* foi observado com as doses de 180 e 360 µg/ 300 µL, mas não com a de 60 µg/ 300 µL, enquanto que o efeito anti-inflamatório do veneno de *Rhinella jimi* foi observado em todas as doses. No teste do nado forçado, a administração de veneno *Rhinella marina*, mas não de *Rhinella jimi*, potencializou significativamente a duração da imobilidade e reduziu significativamente a duração do nado nas doses de 180 e 360 µg/ 300 µL, mas não com a de 60 µg/ 300 µL. Por fim, nenhum dos venenos alterou significativamente a atividade locomotora e nível de ansiedade quando avaliado no teste do campo aberto. Conclui-se que ambos os venenos possuem atividade antinociceptiva e discreta atividade anti-inflamatória e que estes efeitos não decorrem de prejuízo motor. Além disso, o veneno de *Rhinella marina*, mas não de *Rhinella jimi*, aumentou a duração do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Por tanto, os resultados reforçam a proposição de uso de venenos de anuros bufonídeos como fonte para bioprospecção de produtos úteis à saúde pública.

**Palavras chaves:** veneno de anuros bufonídeos; bioprospecção; antinociceptivo; anti-inflamatórios; ansiolíticos; antidepressivos.

**ABSTRACT****EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE, ANTI-INFLAMMATORY, ANTIDEPRESSANT AND ANTI-ANXIETY EFFECT OF THE *Rhinella marina* AND *Rhinella jimi* VENOMS IN SWISS MICE****AUTHOR:** Maria de Fátima Rodrigues Aguiar**ADVISOR:** Quintino Moura Dias Júnior

Venoms and secretions of Bufonidae anurans are abundant sources of potentially useful bioactive molecules in public health. However, little is known about the antinociceptive, anti-inflammatory, anti-depressant and anxiolytic propriety of venom these anurans. Thus, the purpose of this study was to evaluate the antinociceptive, anti-inflammatory, anti-depressant and anxiolytic potential of the venoms of two anurans species: *Rhinella marina* and *Rhinella jimi*. In the study we used swiss. These animals were previously pretreated with 3 different doses (60, 180 ou 360 µg/ 300 µL) of venom of each species and, after 1 hour, it was tested in formalin, carrageenan, forced swim or open field test tests which evaluate, respectively, the antinociceptive, anti-inflammatory, antidepressant and anxiolytic activity these venoms. In the formalin test, it was quantitated during 1 hour the number of nociceptive responses in response to formalin 1%. In the carrageenan test, it was quantified the increase of paw volume (swelling) induced by subcutaneous intraplantar injection of carrageenan 1% during 5 hours. In the open field test, it was evaluated the locomotor activity and anxiety levels during 5 minutes. In the forced swimming test, it was quantified the total time of immobility and swim behavior during a session of 6 minutes of swimming. As result, we found that pretreatment with *Rhinella marina* and *Rhinella jimi* venoms have significant antinociceptive activity in both phases of the of formalin test. At the dose of 60 and 180 µg / 300 µL, *Rhinella marina* venom did not significantly change the 1<sup>st</sup> phase of nociceptive responses but significantly reduced the intensity and duration of nociceptive responses in the 2<sup>nd</sup> phase of the test. At the dose of 360 µg / 300 µL, the *Rhinella marina* venom significantly reduced the 1<sup>st</sup> phase and significantly abolished the nociceptive responses in the 2<sup>nd</sup> phase of the test. In the three doses tested, the *Rhinella jimi* venom significantly attenuated both 1<sup>st</sup> as the 2<sup>nd</sup> phase of nociceptive responses induced by formalin. The results also demonstrate that both venoms significantly attenuated the intensity of edema induced by carrageenan 1% injection. The anti-inflammatory effect of *Rhinella marina* venom was observed with doses of 180 and 360 µg / 300 µL, but not 60 µg / 300 µL, while the anti-inflammatory effect of *Rhinella jimi* venom was observed in all doses. In the forced swimming test, administration of *Rhinella marina* venom, but not *Rhinella jimi*, significantly increased the duration of immobility and reduced the duration of swimming in the dose of 180 and 360 µg / 300 µL, but not 60 µg / 300 µL. Finally, none of the poisons changed significantly the locomotor activity and anxiety levels when assessed in the open field test. Conclude that both venoms have antinoceptive and discrete anti-inflammatory activity and that these effects do not result from motor impairment. Furthermore, the *Rhinella marina* venom, but not *Rhinella jimi*, increased the duration time of immobility in the forced swimming test, indicating a possible inducing effect of negative symptoms of schizophrenia. Therefore, the results support the proposition of use of Bufonidae anurans venoms as a source for bioprospecting products useful to public health.

**Key words:** Bufonidae anuran venoms; bioprospecting; antinociception; anti-inflammatory; anxiolytics; antidepressants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Anuros bufonídeos da espécie (A) <i>Rhinella marina</i> e (B) <i>Rhinella jimi</i> .....	15
Figura 2 Fluxograma representando o teste da Formalina 1% .....	34
Figura 3 Fluxograma representando o teste da Carragenina .....	35
Figura 4 Fluxograma representando o teste da Carragenina .....	36
Figura 5 Fluxograma representando o Teste do Campo Aberto .....	38
Figura 6 Curso temporal da resposta nociceptiva induzida por injeção subcutânea de formalina a 1% na pata de animais pré-tratados com salina ou paracetamol (200 mg/Kg). .....	41
Figura 7 Efeitos da administração subcutânea do veneno de <i>Rhinella marina</i> sobre reposta nociceptiva no teste da formalina 1%.. .....	42
Figura 8 Efeitos da administração subcutânea do veneno de <i>Rhinella jimi</i> em diferentes doses sobre a reposta nociceptiva no teste da formalina 1%.. .....	43
Figura 9 Curso temporal do edema de pata induzido pela injeção subcutânea intraplantar de carragenina (Car) a 1% em animais pré-tratados com indometacina (Indo; 6 mg/Kg). .....	46
Figura 10 Efeito do veneno de <i>Rhinella marina</i> sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina a 1%.. .....	47
Figura 11 Efeito do veneno de <i>Rhinella jimi</i> sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina a 1% .....	48
Figura 12 Efeitos do pré-tratamento com veneno de <i>Rhinella marina</i> sobre o tempo de imobilidade (A) e nado (B) de camundongos expostos ao teste do nado forçado.. .....	50
Figura 13 Efeitos do pré-tratamento com veneno de <i>Rhinella jimi</i> sobre o tempo de imobilidade (A) e nado (B) de camundongos expostos ao teste do nado forçado.. ..	51
Figura 14 Efeito dos venenos de <i>Rhinella marina</i> (A) e de <i>Rhinella jimi</i> (B) sobre a atividade locomotora (nº de quadrantes cruzados + elevação) de camundongos expostos ao teste do campo aberto .....	53
Figura 15 Efeito dos venenos de <i>Rhinella marina</i> (A) e de <i>Rhinella jimi</i> (B) sobre a atividade exploratória (nº de entradas quadrante central) de camundongos expostos ao teste do campo aberto.....	54

Figura 16 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre o nº de comportamentos de hesitação exibidos por camundongos expostos ao teste do campo aberto..... 55

Figura 17 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre o nº de comportamentos de autolimpeza exibidos por camundongos expostos ao teste do campo aberto..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT 5-Hidroxitriptamina  
 AA Ácido araquidônico  
 Ach - Acetilcolina  
 ATP Adenosina trifosfato  
 BZDs Benzodiazepínicos  
 Car Carragenina  
 CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais  
 COX Ciclooxygenase  
 DA Dopamina  
 Dia Diazepam  
 DSM-V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais  
 EPM Erro padrão da média  
 For Formalina  
 g Grama  
 GABA Ácido gama-aminobutírico  
 GABA<sub>A</sub> Receptor de ácido gama-aminobutírico do tipo A  
 H Hidrogênio  
 HHA Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
 i.p injeção intraperitoneal  
 IASP International Association of the Study of Pain  
 ICAM-1 Molécula de adesão intercelular 1  
 IL Interleucina  
 Indo Indometacina  
 l Litros  
 LOX Lisil oxidase  
 MAO Monoaminoxidase  
 mg / kg Miligrama por quilograma  
 mg / ml Miligrama por mililitro  
 NAP Neurônio aferente primário  
 NE Norepinefrina  
 NGF Fator de Crescimento Nervoso  
 OMS Organização Mundial de Saúde  
 Para Paracetamol  
 Pc Pata controle  
 PCP Fenilciclídina  
 PGE Prostaglandina  
 Pi Pata injetada  
 Rj *Rhinella jimi*  
 Rm *Rhinella marina*  
 s segundos  
 s.c injeção subcutânea  
 Sal Salina  
 SISBIO Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade  
 SNC Sistema Nervoso Central  
 TNF Fator de Necrose Tumoral

V Veneno

VCAM-1 Molécula de adesão celular vascular 1

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	ANFÍBIOS E ANUROS .....	14
1.2	ANUROS BUFONÍDEOS.....	15
1.3	VENENOS DE ANUROS BUFONÍDEOS.....	17
1.4	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE VENENOS DE BUFONÍDEOS ..	18
1.5	DOR .....	19
1.6	INFLAMAÇÃO .....	24
1.7	DEPRESSÃO .....	25
1.8	ANSIEDADE.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1	ANIMAIS.....	32
4.2	PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS .....	32
4.3	OBTENÇÃO DOS VENENOS .....	32
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS .....	33
4.4.1	Teste da formalina .....	33
4.4.2	Edema de pata induzido por carragenina.....	34
4.4.3	Teste do nado forçado .....	35
4.4.4	Teste do campo aberto .....	37
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	TESTE DA FORMALINA .....	39
5.2	TESTE DA CARRAGENINA.....	44
5.3	TESTE DO NADO FORÇADO.....	49
5.4	TESTE DO CAMPO ABERTO .....	52
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO .....	62
	REFERÊNCIAS .....	63
	ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	77

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ANFÍBIOS E ANUROS

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a tornarem-se adaptados a vida terrestre através de um processo iniciado no período Devoniano, há cerca de 390 milhões de anos atrás (DAS et al., 2000; RETALLACK, 2011), tornando-se uma etapa de destaque na história filogenética dos vertebrados. O nome “anfíbio”, proveniente do grego (*amphi* = duplo; *bio* = vida), deve-se ao fato de que grande parte de suas espécies apresentarem uma forma larval aquática e outra terrestre. Na forma larval aquática ou de girino, o anuro apresenta respiração branquial e, em sua maioria, alimentação herbívora. Já na forma terrestre ou adulta, o anuro apresenta respiração pulmonar/cutânea, alimentação baseada principalmente em artrópodes e pele úmida rica em glândulas. Os anfíbios constituem a extensa classe Amphibia, composta por 7044 espécies (FROST, 2013) divididas em três grupos (ordens): Anura (sapos, rãs, jias e pererecas), Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cobras-cegas ou cecílias). No Brasil, até julho de 2014, foram registradas 1026 espécies de anfíbios (pertencentes a 33 famílias): 988 espécies de Anuros, 5 espécie de Caudata e 33 espécies de Gymnophionas, colocando o país em primeiro lugar em diversidade de anfíbios, com cerca de 10% de todas as espécies de anfíbios conhecidas no mundo (SEGALLA et al., 2014).

Os sapos e rãs são representantes relativamente comuns da ordem Anura, habitando locais geralmente úmidos por necessitarem desse tipo de ambiente durante o período de reprodução. A pele dos anfíbios é essencialmente composta por derme, epiderme e glândulas que desempenham funções como: proteção física, auxílio na respiração, controle de temperatura, reprodução e defesa contra microrganismos e predadores (CLARKE, 1997; DUELLMAN; TRAUB, 1996; TOLEDO; JARED, 1993; ZUG, 1993; TOLEDO; JARED, 1995). As glândulas da pele de anuros podem ser de dois tipos: as mucosas e as granulares. As glândulas mucosas ocorrem por toda a pele e são compostas basicamente por glicosaminoglicanas e proteoglicanas, e suas secreções fornecem um revestimento úmido necessário para a respiração cutânea desses anfíbios (DAPSON, 1970). As glândulas granulares ou macroglândulas paratoides, também conhecidas como

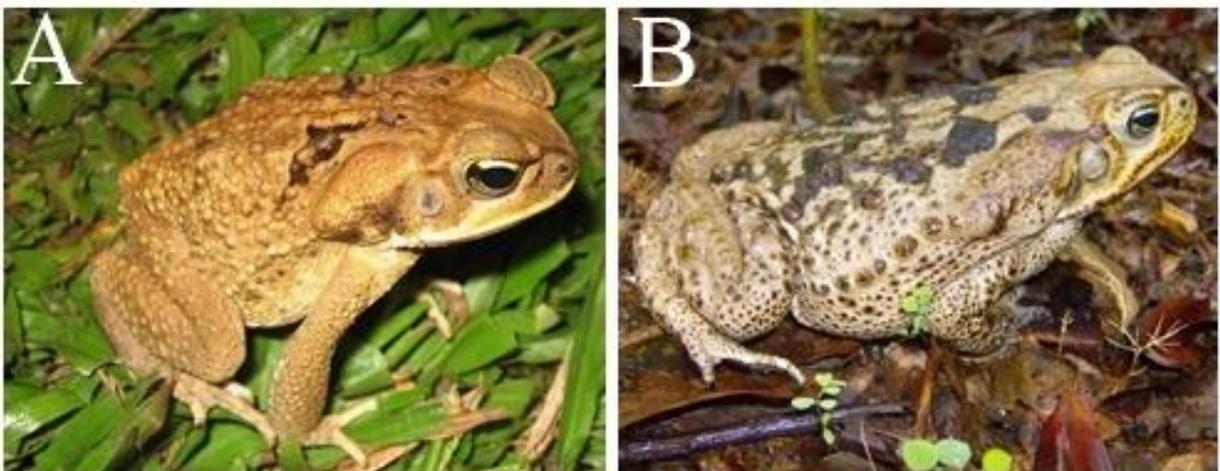
glândulas serosas ou de veneno, distribuem-se ao longo do corpo, mas frequentemente concentrada em torno da cabeça e pescoço e formam protuberâncias conspícuas e normalmente grandes, característica dos anuros da família Bufonidae (MAILHO-FONTANA et al, 2013). Estas glândulas normalmente secretam substâncias tóxicas em resposta ao estresse ou agressão física (GOMES et al., 2007).

## 1.2 ANUROS BUFONÍDEOS

Até rescentemente, todos os sapos comuns eram incluídos no gênero *Bufo*. No entanto, este gênero está agora restrito às espécies encontradas na Europa, Ásia e África. Neste sentido, as principais espécies sulamericanas, que antes pertenciam ao gênero *Bufo*, passaram a compreender principalmente a dois subgêneros: *Rhaebo* e *Rhinella*. O gênero *Rhaebo* e *Rhinella* compreendem 10 e 84 espécies, respectivamente, distribuídas ao longo da América Central e do Sul (FROST, 2013). A maioria das espécies possui pele seca, rugosa e grossa, e apresentam pernas relativamente mais curtas do que de outros anuros (LIMA et al., 2006).

Figura 1 Anuros bufonídeos da espécie (A) *Rhinella marina* e (B) *Rhinella jimi*

Fonte: (A) Paulo S. Bernarde (B) Juliana Borges



No Brasil, os anuros da família bufonidae são representados por sete gêneros, sendo a *Rhinella* (Figura 1) a mais representativa. A *Rhinella marina* (Figura 1A) possui ampla distribuição, que se estende desde o Texas, no norte dos

Estados Unidos da América, até o centro da América do Sul, na Amazônia brasileira (FROST, 2013). Já a *Rhinella jimi* (Figura 1B) possui ampla distribuição na caatinga brasileira. A *Rhinella schneideri*, que é um parente próximo da *Rhinella jimi* (provavelmente consistindo de um complexo de espécies), vive no cerrado brasileiro central. Os sapos do gênero *Rhinella* apresentam pares de glândulas parotoides localizadas dorsalmente atrás dos olhos (JARED et al., 2009). Além disso, *Rhinella schneideri* também possui, como característica diferencial da *Rhinella jimi*, a presença de macroglândulas paractêmicas no seu membro posterior (JARED et al., 2009). Como essas glândulas parotoides consistem de uma agregação de numerosas unidades secretórias, elas têm sido nomeadas de macroglândulas para se diferenciarem daquelas glândulas mucosas comuns e glândulas granulares do restante da pele (TOLEDO; JARED, 1995). As macroglândulas são compostas por alvéolos secretórios justapostos com característica estrutural tipo colmeia de abelha. A análise histológica mostra que em todos os sapos, incluindo os do gênero *Rhinella*, existe um exclusivo tampão epitelial composto de diversas lâminas de células epidérmicas que sempre bloqueiam o ducto alveolar (MAILHO-FONTANA et al., 2013). Tais tampões mantêm a pressão interna dos alvéolos e estão dessa forma envolvidos com a liberação do veneno (JARED et al., 2009; MAILHO-FONTANA et al., 2013).

Diferente de outros anuros que habitam regiões semiáridas e abertas, a *Rhinella jimi* e *Rhinella schneideri*, e talvez outras espécies do gênero como a *Rhinella marina*, permanecem completamente expostas ao ambiente por longos períodos, sem que isso represente risco de dessecação. Tais características provavelmente estão associadas à presença de lâmina dérmica calcificada (ELKAN, 1976; JARED et al., 2009; TOLEDO; JARED, 1993; PRAMUK, 2006) cobrindo todo o corpo, inclusive as glândulas parotoides. De acordo com Jared e colaboradores (2009), as espécies do gênero *Rhinella* são incapazes de ejetar voluntariamente seu veneno e sugere que, devido à similaridade do comportamento defensivo e a estrutura das glândulas parotoides entre os sapos, tal característica pode estar presente em todo o grupo. Como consequência, o envenenamento por anuros bufonídeos do gênero *Rhinella* ocorre somente quando o predador ataca e comprime diretamente suas glândulas parotoides.

### 1.3 VENENOS DE ANUROS BUFONÍDEOS

Os venenos de anuros bufonídeos são uma mistura complexa de substâncias cuja composição básica pode variar enormemente quanto a sua concentração entre as espécies de acordo com fatores como a variedade do veneno, área de produção, diferenças na época e métodos de coleta e seu processamento (YANG et al., 2015). O veneno de anuros bufonídeos são geralmente agrupados em quatro categorias de compostos: amins biogênicas, alcaloides, esteroides e proteínas (TOLEDO; JARED, 1995). Além disso, esses componentes podem ser distribuídos em componentes hidrossolúveis e lipossolúveis. Os principais componentes químicos lipossolúveis já descritos são os bufadienolídeos, tal como a bufagina, resinobufagina e bufalina que, juntos, correspondem a 10% do peso seco do veneno (FLIER et al., 1980; MA et al., 2009; YANG et al., 2015). Os componentes hidrossolúveis incluem as bufotoxinas (Bufodienolídeo), glicosídeos cardíacos, alcalóides indoles, alcoois, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos, adrenalina, amonias quaternárias, amins biogênicas tais como a serotonina e seus n-metilados, triptamina, histamina e seus compostos n-metilados, L-tirosina, candicina, leptodactilina, epinefrina, norepinefrina e dopamina (CLARKE, 1997; SCHWARTZ et al., 2007). A ampla diversidade de substâncias nos venenos de bufonídeos deve-se a ampla variedade de espécies que predam estes animais, além da grande diversidade de patógenos encontrados nos locais, muitas vezes hostis, em que vivem.

A sensibilidade de diversos vertebrados, incluindo humanos, ao envenenamento por bufonídeos é bem descrita (DOODY et al., 2006; GRIFFITHS; MCKAY, 2007; KEOMANY et al., 2007; LETNIC et al., 2008; SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). Muitos dos componentes contidos nas secreções destas glândulas têm papel defensivo e possuem diversos efeitos que incluem cardiotoxicidade, miotoxicidade, neurotoxicidade, vasoconstrição, hipotensão, disenteria, soluços, convulsões, fadiga, efeitos alucinógenos e potencializadores do sono – propriedades estas que podem claramente afetar adversamente um potencial predador (CLARKE, 1997; GARRETT e BOYER, 1993; GARG et al., 2007; HABERMEHL, 1981; JARED et al., 2009; PINEAU; ROMANOFF, 1995; SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000; SONNE et al., 2008; VITAL BRAZIL; VELLARD, 1925,

1926). Além disso, muitas substâncias das secreções granulares também apresentam propriedades imunomodulatórias e antimicrobianas que propiciam a sobrevivência do anfíbio em ambientes hostis (CLARKE, 1972).

#### 1.4 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE VENENOS DE BUFONÍDEOS

A alta diversidade bioquímica dos venenos de anuros bufonídeos tem sido prospectivamente explorada na busca de novas moléculas bioativas com atividade biotecnologicamente úteis. Evidências indicam diversas propriedades farmacológicas do veneno de bufonídeos bem como seus componentes isolados, sendo algumas já exploradas terapeuticamente. Por exemplo, na Ásia, emprega-se o veneno do gênero *Bufo* no tratamento de resfriados e inflamações (LYTTLE et al, 1996). Barros (2013) descreve atividade inibitória de componentes de venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella icterica* contra vírus da raiva. Hong-Yue e colaboradores (2007) descrevem ações anti-inflamatórias e analgésicas de uma fórmula chinesa denominada Liu-Shen-Wan, composta por veneno de *Bufo bufo gargarizans*, indicada para o tratamento de inflamações do trato respiratório. O veneno de *Bufo melanostictus*, uma espécie comum na Índia, possui ação antidiabética demonstrada experimentalmente (NEERATI, 2015). Evidências mostram a eficácia da bufalina e cinobufagina, extraídas de *Bufo bufo gargarizans*, contra linhagens de células de câncer de próstata (YEH, 2003) e osteosarcoma (WANG E BI, 2014). Ferreira e colaboradores (2013) mostraram a efetividade de 5 extratos isolados do veneno de *Rhinella marina* e 4 de isolados de *Rhaebo guttatus* sobre linhagens tumorais leucêmicas, de ovário, de colón e de glioblastoma. Também foi evidenciado ação antibacteriana de componentes isolados do veneno de *Bufo rubescens* e *Rhinella icterica* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CUNHA-FILHO et al., 2005; PINTO, et al, 2009) e atividade antiparasitária contra *Tripanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi*, utilizando-se componentes extraídos do veneno de *Rhinella jimi* também já foi relatado (TEMPONE et al., 2008).

## 1.5 DOR

A dor fisiológica constitui um dos processos de primordial importância para a sobrevivência dos indivíduos. Sua função básica é induzir respostas de proteção, produzindo, por exemplo, o reflexo de retirada (ou reação de fuga), com o objetivo de interromper e/ou minimizar os danos causados pela exposição ao estímulo nocivo, preservando desta forma a integridade do organismo. A dor fisiológica normalmente é acompanhada de reações de luta e/ou fuga, além de comportamentos generalizados de alerta, respostas endócrinas (tal como secreção de corticosterona) e ativação simpática que, juntamente com antinocicepção transitória, aumenta o desempenho dos repertórios comportamentais envolvidos no escape do encontro agressivo ou em outras situações que potencialmente levam a sérias lesões teciduais (MILLAN, 1986; TRAUB, 1996; WIERTELAK et al., 1994).

De acordo com a definição proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association of the Study of Pain – IASP*), a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou real, ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano” (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Portanto, a dor é uma experiência complexa e subjetiva, que envolve um componente sensorial-discriminativo, responsável por identificar a natureza e o local de origem do estímulo nocivo, e um componente emocional, que constituem os aspectos motivacional-afetivo e o cognitivo-avaliativos desencadeados como resultado da integração do estímulo nocivo com centros supra espinais do sistema nervoso central, onde a sensação é conscientemente apreciada (CALVINO; GRILO, 2006).

Apesar de não consensual, o uso do termo dor para designar as respostas comportamentais observadas em animais quando estes são submetidos a estimulações nocivas tem sido questionada por alguns autores. O maior questionamento decorre da nossa incapacidade de avaliar os aspectos motivacional-afetivo e cognitivo-avaliativos dos animais durante uma resposta a estímulos nocivos, uma condição fundamental para a definição da dor. Nesse sentido, muitos autores defendem que o termo dor é mais adequado para designar a sensação e percepção do estímulo nocivo apenas em seres humanos. Desta maneira, adequou-se a utilização do termo nocicepção, ao invés de dor, para designar a resposta do

animal a estímulos nocivos em modelos animais para estudo da dor (LOESER; MELZACK, 1999; NOBACK et al., 1996).

O termo nocicepção (do latim *nocere*, “nocivo”) foi primeiramente empregado por Sherrington (1906) para denominar a detecção de um estímulo nociceptivo, ou seja, aquele capaz de comprometer a integridade do organismo. O estímulo nociceptivo pode ser de origem física (mecânica e térmica) ou química (bradicinina, histamina, serotonina, potássio, acetilcolina, ATP, H<sup>+</sup>, NGF) e é identificado por terminações nervosas livres denominadas nociceptores. Os nociceptores distribuem-se por todas as partes do organismo (músculos, articulações, vísceras e primordialmente pele) e formam campos receptivos ativados especialmente por estímulos nocivos (MILLAN, 1999).

O nociceptor normalmente distingue-se de outros tipos de receptores sensoriais por apresentar alto limiar de ativação, ou seja, responder normalmente apenas a estímulos potencialmente nocivos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Quando ativado, o nociceptor gera um impulso elétrico, a informação nociceptiva, que é conduzido até a medula espinal por neurônios sensoriais de pequeno calibre denominado de neurônio aferente primário (NAP). Estes neurônios são classificados com pseudounipolares, já que seus corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal da medula espinal, e possuem um ramo projetado para a periferia e outra projetada para o sistema nervoso central (HAMMOND; YAKSH, 1981; YAKSH; HAMMOND, 1982; WALL, 1980).

Os NAPs podem ser classificados quanto ao grau de mielinização em fibras C, A- $\delta$  (delta) e A- $\beta$  (beta). Os neurônios do tipo C, também conhecidos como polimodais, são não-mielinizados, têm baixa velocidade de condução (0,5-2,0 m/s) e são ativados por estímulos químicos e térmicos (calor ou frio) nocivos e mecânicos não-nocivos. Os neurônios A- $\delta$ , são pouco mielinizados, têm velocidade intermediária de condução (12-30 m/s) e são ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos de alta intensidade. Já os neurônios A- $\beta$  possuem grosso calibre, mielinizados, possuem alta velocidade de condução do impulso nervoso (30-100 m/s) e respondem apenas a estímulos de baixo limiar, ou seja, não nociceptivo (MILLAN, 1999).

Após sua geração, a informação nociceptiva é transmitida, através de toda a extensão do NAP, para diferentes regiões (lâminas) do corno dorsal da medula

espinal onde realiza sinapses com neurônios denominados de 2ª ordem (WILLIS, 1985). A sinapse entre os NAPs e os neurônios de 2ª ordem envolve liberação de diferentes tipos de neurotransmissores, incluindo peptídios (colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, somatostatina), serotonina (5-HT) e aminoácidos (glutamato e aspartato), além de substância P e ATP (WILLIS, 1985).

Os neurônios de 2ª ordem podem ser classificados, quanto às características eletrofisiológicas, em 3 tipos: 1) neurônios nociceptivos específicos, que são ativados apenas por estímulos de alta intensidade, 2) de faixa dinâmica ampla, ativados tanto por estímulos de alta quanto de baixa intensidade e, 3) não-nociceptivos, ativados apenas por estímulos de baixa intensidade. Estes neurônios se distribuem nas diferentes divisões ou lâminas do corno dorsal da medula espinal, conforme proposto por Rexed (1952). Rexed descreveu 10 diferentes subdivisões ou lâminas do corno dorsal da medula espinal, sendo as lâminas I, II e V as principalmente envolvidas com a passagem de informação nociceptiva. Nesse sentido, a lâmina I, ou lâmina marginal de Waldeyer, e lâmina II, também denominada como substância gelatinosa, processam especificamente informações nociceptivas, recebendo fibras A $\delta$  e C, que respondem principalmente a estímulos mecânicos de alto limiar. Por fim, a lâmina V, que é mais profunda, é constituída basicamente por neurônios nociceptivos específicos e de faixa dinâmica ampla e também respondem tanto a estímulos nocivos quanto a não-nocivos (MILLAN, 1999).

Os neurônios de 2ª ordem, quando ativados pelos NAPs, conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central (SNC) espinal. A condução da informação nociceptiva para o SNC supra espinal ocorre através de tratos ou vias neurais ascendentes formadas por agrupamentos de neurônios de 2ª ordem. O trato ascendente mais bem descrito é o espinotalâmico, representando um dos principais tratos somatosensoriais ascendentes. Este trato normalmente conduz informações sensoriais decorrentes de estímulos térmicos e mecânicos nocivos (KENSHALO et al., 1979; SURMEIER et al., 1986a), mas também respondem a distensão nociva ou compressão de órgãos viscerais (AMMONS, 1989ab; HOBBS et al., 1992; MILNE et al., 1981). Portanto, este trato pode conduzir tanto informações nociceptivas quanto não-nociceptivas (temperatura, pressão e prurido) (ANDREW; CRAIG, 2001ab; CRAIG et al., 2001; LYNN, 1992; WILLIS et al., 2001).

Os neurônios de 2ª ordem que formam o trato espinotalâmico estão localizados principalmente lâminas I, II e V (MILLAN, 1999). Como o próprio nome sugere o principal destino final do trato espinotalâmico é o tálamo, mais especificamente nos núcleos ventroposterolateral, posterior, centro-lateral e submédio (ALBE-FESSARD et al., 1985; BESSON et al., 1982; KERR; LIPPMAN, 1974). O tálamo é tido como estrutura responsável de retransmitir as informações sensoriais nociceptivas e não-nociceptivas, para diferentes áreas do SNC, inclusive o córtex somatosensorial, que se faz através de um 3º tipo de neurônio, também conhecido como neurônio de 3ª ordem. É no córtex somatosensorial que a informação nociceptiva é discriminada, descrita e interpretada/percebida como dor. Além disso, o trato espinotalâmico também se conecta com regiões do sistema nervoso envolvidos com a geração dos aspectos motivacionais-afetivos da dor, tal como a amígdala, núcleo estriado, núcleo acumbens, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo e septo, bem como córtex frontal, orbital cingulado e córtex infralímbico (BURSTEIN; POTREBIC, 1993; GIESLER et al., 1979; JASMIN et al., 1997; NEWMAN et al., 1996).

Além da ativação de estruturas do SNC envolvidos com aspectos sensoriais-discriminativos e emocionais-cognitivos da dor, a informação nociceptiva que sobe ao SNC também pode ativar redes/sistemas neuronais descendentes envolvidos com o controle endógeno da nocicepção. Estas vias neuronais foram inicialmente evidenciadas através da observação de que a estimulação elétrica de discretas áreas do sistema nervoso central (MAYER et al., 1971; MAYER; PRICE, 1976; REYNOLDS, 1969) eram capazes de produzir analgesia/antinocicepção em animais experimentais. Foram descritas diferentes áreas envolvidas nesses sistemas descendentes de controle da dor tal como a substância cinzenta periaquedutal (MAYER et al, 1971; REYNOLDS, 1969), núcleo magno da rafe (PROUDFIT; ANDERSON, 1975), núcleo reticular paragigantocelular (AKAIKE et al., 1978), cerebelo (SIEGEL; WEPSIC, 1974), tálamo ventrobasal (HOSOBUCHI et al., 1973), NPtA (ROBERTS; REES, 1986) e região pontina parabraquial (DESALLES et al. 1985). O bulbo ventrolateral e bulbo ventromedial, denominados coletivamente de sistemas inibitórios descendentes bulboespinais, representam as principais fontes de projeções descendentes inibitórias para a medula espinal. Os núcleos que compõem os sistemas inibitórios descendentes bulboespinais são principalmente o núcleo reticular gigantocelular e núcleo reticular paragigantocelular, localizados no bulbo

ventrolateral, e núcleo magno da rafe e núcleo reticular gigantocelular para alfa, localizados no bulbo ventromedial (ABOLS; BASBAUM, 1981). A ativação destes núcleos parece ativar vias monoaminérgicas distintas, sendo a via rafe-espinal serotoninérgica e as via retículo-espinal adrenérgica (AZAMI et al., 1982; DAHLSTROM; FUXE, 1964; DICKENSON et al., 1979; FIELDS; BASBUM, 1977). Evidenciou-se que quando estas áreas estão ativadas ocorre inibição altamente específica da resposta nociceptiva sem, no entanto, alterar o estado de alerta, atividade comportamental e resposta a estímulos ambientais, sem, no entanto, responder a estímulos nocivos (FIELDS; BASBAUM, 1999).

A dor pode ser estudada empregando diversos modelos animais que mimetizam condições observadas em seres humanos. Um destes testes é o teste da formalina, que foi descrito por Hunskaar e Hole (1987). Este teste é amplamente utilizado para o estudo da fisiopatologia da dor e como modelo para descoberta de novos compostos com atividade antinociceptiva (analgésica). O teste consiste em induzir respostas nociceptivas através da administração subcutânea intraplantar de solução de formalina na pata do animal. As respostas comportamentais desencadeadas pela formalina seguem um padrão bifásico, constituindo uma fase inicial (1ª fase) e uma fase tardia (2ª fase), separadas por um período de baixo número de respostas comportamentais. A 1ª fase, também denominada de fase nociceptiva, se desenvolve imediatamente após a injeção de formalina e tem curta duração (5-10 minutos após a injeção de formalina). Além disso, a 1ª fase é atribuída ao estímulo direto da formalina sobre os nociceptores das fibras aferentes primárias e indução da liberação de neuropeptídeos nos terminais periféricos e centrais desses neurônios (TJOLSEN et al., 1992). Após a 1ª fase é possível identificar um curto período de silenciamento comportamental a partir da qual se desenvolve a 2ª fase do teste. Esta fase, também denominada de fase inflamatória, tem duração que varia de 15-30 minutos. A 2ª fase está associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como a prostaglandina, serotonina, histamina, bradicinina, etc., responsáveis pela sensibilização ou ativação do nociceptor (TJØLSEN et al, 1992; HUNSKAAR; HOLE, 1985).

## 1.6 INFLAMAÇÃO

A inflamação é caracterizada como uma resposta de defesa do organismo em resposta dano celular ocasionado por estímulos endógenos e exógenos como, por exemplo, microrganismos, agentes físicos, químicos, necrose tecidual ou reações imunológicas. Nesse sentido, a inflamação se desenvolve com objetivo de eliminar o agente nocivo e reestabelecer a homeostasia local, constituindo-se dessa forma como uma resposta de defesa benéfica ao organismo (KUMAR 2004, SERHAN, 2004). O processo inflamatório é um processo complexo caracterizado pelo desenvolvimento de 5 sinais cardinais: rubor, edema, calor, dor e perda de função da área lesada (LUENGO, et al 2005). Além disso, este processo pode ser subdividido em dois eventos distintos e interdependentes: o evento vascular e o evento celular (MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória se inicia pelo reconhecimento de um estímulo inflamatório por células do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos residentes), que respondem com a secreção de diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa). A IL-1 e TNF- $\alpha$  liberadas pelos macrófagos são responsáveis pelos eventos vasculares ao induzir nas células do endotélio vascular a expressão das selectinas (E-selectina, P-selectinas e L-selectina), das moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e das moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). As moléculas de adesão endoteliais, ao interagirem com as integrinas leucocitárias, promovem os processos de adesão, rolagem e migração dos leucócitos para o local da inflamação (BAUMANN; GAULDIE, 1994; COELHO, 2009; GRANGER; KUBES, 1994; KUMAR et al., 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Como a migração celular e recrutamento de novos leucócitos residentes, outros mediadores pró-inflamatórios são produzidos, especialmente os eicosanóides, que são derivados lipídicos do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um subproduto da reação enzimática de quebra de fosfolípídeos de membrana catalisada pela fosfolipases A<sub>2</sub> (presente em plaquetas e leucócitos), sendo estas previamente ativadas pela IL-1 após lesão da membrana celular. Os eicosanóides, por sua vez, são produzidos pela conversão enzimática do ácido araquidônico. Dessa forma, o ácido aracdônico pode dar origem aos leucotrienos e prostanoides

(prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) pela ação, respectivamente, da 5-lipoxigenase (5-LOX) e da ciclooxigenase (COX). Os prostanoídeos, em especial a prostaglandina, juntamente com aminas vasodilatadoras liberadas por mastócitos, tais como a histamina, estão envolvidas principalmente no desenvolvimento de eventos vasculares e extravasamento de líquidos, contribuindo para a formação de edema, além da indução de febre e hiperalgesia (GUECK, et al, 2004; HILÁRIO et al., 2006; MESQUITA JR et al, 2008; MURI et al., 2009; TILLEY et al., 2001).

Segundo Di Rosa (1972), na década de 60 passou-se a utilizar a carragenina como modelo experimental para induzir reação inflamatória, a partir do modelo proposto por Winter e colaboradores (1962). A carragenina é um mucopolissacarídeo sulfatado extraído das paredes celulares de algas vermelhas (*Chondrus crispus*, *Gigartina stellata* e *Rhododymenia palmata*) da ordem Gigartinales. Estruturalmente, a carragenina é um grupo complexo de polissacarídeos feitos de repetidos monômeros de galactose e são de 3 tipos: lambda, kappa e iota. A carragenina, por ser indutora de processo inflamatório associado com formação de exsudato rico em proteínas e neutrofilia local ao ser inoculada, passou a ser empregado como modelo de edema na pata em rato (LO et al, 1982). A resposta inflamatória induzida pela carragenina pode ser dividida em três fases bioquimicamente distintas. Na primeira hora após a inoculação de carragenina, correspondendo a primeira fase do processo, caracteriza-se pelo significativo aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina. Na segunda fase, que ocorre na segunda hora após a inoculação, é caracterizada pela presença significativa de cininas. Na terceira hora, corresponde à 3ª fase do processo, é onde se observa o pico de formação do edema, caracterizado pela ação das prostaglandinas sobre a permeabilidade vascular (DI ROSA et al, 1971a; DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971).

## 1.7 DEPRESSÃO

De acordo com a organização mundial de saúde (OMS) a depressão e a ansiedade têm se apresentado como um problema de saúde pública. Ainda, de acordo com a OMS, a depressão será, até 2020, umas das enfermidades que mais causarão incapacidade tomando perspectivas globais, perdendo apenas para

doenças cardíacas. Outro fator que torna o estudo da doença importante é a resistência ao tratamento. Cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com transtorno depressivo e da ansiedade ao longo do tratamento poderá apresentar um episódio recorrente ou crônico da doença. Além disso, pelo menos 20% dos pacientes não respondem satisfatoriamente aos medicamentos tradicionais antidepressivos ou ansiolíticos e sofrem com os efeitos adversos produzidos eles (NEMEROFF, 2007, PERITO; FORTUNATO, 2012). Portanto, tais constatações, associadas ao alto impacto econômico do tratamento da depressão, justifica a necessidade de busca por novos fármacos mais eficazes e menos custosos.

Acredita-se que a depressão é uma síndrome psiquiátrica cujo desenvolvimento decorre de múltiplas causas, podendo se destacar: causas biológicas e psicossociais. Além disso, a depressão é uma doença diplomática, acometendo a população geral em todas as faixas etárias (BAHLS, 1999, BAHLS, 2002). Sem diagnóstico e sem tratamento, prejudica a qualidade de vida e bem-estar do paciente o que pode gerar tendências suicidas (OLIVEIRA, et al 2006). Apesar dos prejuízos conhecidos aos pacientes, a depressão ainda é frequentemente subdiagnosticada e subtratada, sendo por vezes não detectada pelo médico em contato inicial. Além disso, a falta de cuidados e tratamento específico pode contribuir para avançado do quadro clínico, o que na maioria dos casos poderia ser evitado com o tratamento adequado. (DOCHERTY, 1997; ROST, et al, 1998, RONALDS, et al, 1997).

Apesar da causa da depressão ainda não está totalmente elucidada, evidencias indicam que sua origem pode estar associada a alterações neuroquímicas no sistema nervoso central, especificamente sobre a neurotransmissão monoaminérgica (LAFER; VALLADA FILHO, 1999). Os sistemas monoaminérgicos são representados por neurônios contendo norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) e dopamina (DA). Estes sistemas se originam em pequenos núcleos no tronco cerebral e juntamente com a acetilcolina (ACh) atuam exercendo efeitos envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e humor. No final da década de 50, com a observação dos efeitos dos antidepressivos inibidores da monoaminoxidase (MAO) e dos antidepressivos tricíclicos, aventou-se a hipótese de que esses fármacos aumentavam as concentrações de norepinefrina e serotonina em áreas do sistema nervoso central. A deficiência ou desbalanço das

aminas biogênicas NE, 5-HT e DA no encéfalo como mecanismo fisiopatológico da de depressões e ficou conhecida como hipótese monoaminérgica (LAFER; VALLADA FILHO, 1999).

Já na década de 60, Joseph Schildkraut e Seimiour Kety estudando antidepressivos e reserpina, propuseram a hipótese noradrenérgica, onde a depressão decorreria principalmente da diminuição da atividade noradrenérgica pós-sináptica (GRAEFF, 1989). Posteriormente, Schildkraut (1965) e Bunney e Davis (1965) propunham a hipótese catecolaminérgica, onde a depressão seria então causada pela diminuição relativa ou absoluta das catecolaminas, principalmente a NE, nos receptores adrenérgicos centrais. Em seguida surgiu a hipótese serotoninérgica proposta por Van Praag e Korf (1971) que defendiam a diminuição da atividade da via serotoninérgica. Em 1990, Willner propôs a hipótese dopaminérgica, na qual a dopamina estaria associada à depressão, principalmente na anedonia (BAHLS S-CLAIR, 1999). Na década de 70, David Wong relata a existência de drogas da classe das butirofenonas que seriam capazes de atuarem sobre o metabolismo da 5-HT, o que deu início ao tratamento com menos efeitos colaterais com o uso de medicamentos denominados inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS) (LIEBERMAN, 2003).

Com os avanços obtidos nos estudos da neurobioquímica, vários modelos animais passaram a ser utilizados para investigar as hipóteses e buscar novos fármacos com propriedades antidepressivas. Nesse sentido, para que os modelos experimentais pudessem reproduzir de forma eficiente mecanismos envolvidos na fisiopatologia da depressão, Willner (1984) propôs que os modelos deveriam obedecer a 3 critérios de validação: a) ser preditivo: ter capacidade em prever o efeito do tratamento; b) ter analogia: ter capacidade reproduzir aspectos semelhantes a da doença; c) ter homologia: existir semelhança entre os mecanismos neurobiológicos observados no modelo e na doença. Dentre os testes desenvolvidos com esse pressuposto de validação, o teste do nado forçado, proposto por Porsolt e colaboradores (1977), baseado em modelos de “desespero comportamental”, é um dos mais aceitos devido a sua alta validade preditiva, ou seja, de detectar drogas atividade antidepressiva.

## 1.8 ANSIEDADE

A ansiedade pode ser caracterizada como um estado emocional transitório envolvendo conflitos psicológicos e sentimentos desagradáveis de tensão, angústia e sofrimento (ANDRADE & GORENSTEIN, 1998). Ela difere do medo, já que este se apresenta em resposta a um perigo real e limitado ao estímulo que o desencadeou. A ansiedade é considerada normal (fisiológica) quando se caracteriza de maneira adaptativa ao organismo, preparando o organismo para outras respostas e é considerada nociva (patológica) quando se apresenta de maneira desproporcional à situação que a desencadeou ou quando não há objeto específico ao qual a direcione. Logo, a ansiedade patológica é caracterizada quando o sofrimento provocado pelo estado de ansiedade passa a trazer prejuízos aos indivíduos, fazendo com que estes apresentem comportamento de fuga em situações importantes da vida (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998).

Fisiologicamente a ansiedade é um estado de funcionamento cerebral em que ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), gerando sintomas neurovegetativos: insônia, taquicardia, palidez, aumento da perspiração, angústia, medo, tensão muscular, tremor, tontura, distúrbios intestinais, entre outros, são alterações adaptativas e variam de indivíduo para indivíduo (MACKENZIE, 1989; GIUNTINI, 2006). A ansiedade patológica refere-se a um grande grupo de transtornos de ansiedade que, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION), são classificados nas seguintes categorias diagnósticas: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos fóbicos e transtorno de estresse pós-traumático (APA, 2014).

Diversas evidências indicam que os transtornos de ansiedade estão associados ao mal funcionamento do sistema inibitório GABAérgico em áreas do sistema nervoso central, especialmente no sistema límbico. Atribui-se ao ácido gama-aminobutírico (GABA) juntamente com as aminas biogênicas (noradrenalina, dopamina e serotonina) o papel na modulação e regulação dos sistemas de defesas. O GABA é um neurotransmissor inibitório amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC), principalmente no sistema límbico. A inibição neuronal mediada pelo GABA decorre de sua ação sobre duas classes de receptores: os

ionotrópicos (GABA<sub>A</sub>) e os metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>) (BOWERY, 2010). O papel dos receptores GABAérgicos, especialmente receptores GABA<sub>A</sub>, na eficácia do tratamento dos transtornos da ansiedade tem sido evidenciado pelo mecanismo de ação dos benzodiazepínicos (SILVA, 2001). Os benzodiazepínicos são agonistas alostérico do GABA, ligando-se e provocando mudança conformacional do receptor GABA<sub>A</sub>, o que ocasiona num aumento da afinidade do receptor pelo GABA. A ativação de receptores GABA<sub>A</sub> induz aumento na condutância dos canais de cloreto, gerando uma hiperpolarização da membrana neuronal (BOWERY, 2010; HAEFELY, 1990; SIEGHART, 2006).

Nos últimos 45 anos, os benzodiazepínicos estão entre as drogas de escolha para o tratamento de diversas formas de ansiedade. No entanto, apesar de seus benefícios, os seus efeitos adversos são constantes e incluem efeitos sedativos indesejáveis, relaxamento muscular, amnésia e dependência durante o uso por longo tempo (RABBANI, et al, 2007; KAPLAN; SADOCK, 2005). Devido a estes efeitos, atualmente tem-se intensificado as recomendações ao uso de antidepressivos como primeira escolha ao tratamento de transtornos de ansiedade, principalmente os inibidores da receptação da serotonina (ISRS) ou inibidores da receptação da serotonina-noradrenalina. Assim, reservando o uso dos benzodiazepínicos como segunda escolha ou para uso em curto prazo, como tratamento complementar aos antidepressivos (LADER, 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

Frente ao conjunto de informações acima levantadas, o presente estudo parte do pressuposto de que a dor, inflamação, depressão e ansiedade são condições virtualmente presentes, em menor ou maior grau, em quase todas as doenças conhecidas. Tais condições são questões de importante impacto em Saúde Pública, visto o alto impacto econômico decorrente dos gastos com tratamento muitas vezes baseadas em fármacos importados com alto valor agregado. Associado ao fato de que muitas dessas condições são precariamente tratadas, ou pelo alto custo ou pela baixa eficácia dos fármacos atualmente disponíveis, é de extrema relevância que novas alternativas terapêuticas, preferencialmente mais baratas e mais eficientes, sejam descobertas e disponibilizadas. É nesse intuito que o estudo se propões explorar a potencialidade de venenos dos anuros bufonídeos das espécies *Rhinella marina* e *Rhinella jimi*, conhecidas pela fácil obtenção e pela abundância de matéria prima para bioprospecção de substâncias farmacologicamente úteis. Além disso, os resultados do estudo sinalizariam para a possível geração de novos fármacos analgésicos, anti-inflamatórios, antidepressivos e ansiolíticos desenvolvidos nacionalmente, tornando-os mais baratos e, portanto, mais acessíveis.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial atividade antinociceptiva (analgésica), anti-inflamatória, antidepressiva e ansiolítica do veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* em camundongos .

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração subcutânea de veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre a resposta nociceptiva no teste da formalina;
- Avaliar o efeito da administração subcutânea de veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre o desenvolvimento de edema de pata no teste da carragenina;
- Avaliar o efeito da administração subcutânea subcrônica de veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre o tempo de imobilidade e nado durante o teste do nado forçado;
- Avaliar o efeito da administração subcutânea de veneno *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre a atividade locomotora e nível de ansiedade no teste do campo aberto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

No presente estudo empregou-se camundongos swiss webster machos (25-38g), mantidos em sala com luz e temperatura controladas, água e comida *ad libitum*. O estudo empregou 260 camundongos fornecidos pelo biotério da Fiocruz-Rondônia. Foram utilizados 5 animais por grupo. Os animais foram recebidos e colocados para adaptação ambiental por um período de 3 dias. Os experimentos foram realizados entre 8h e 17h. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional (ANEXO I).

### 4.2 OBTENÇÃO DOS VENENOS

Os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* foram fornecidos pelo laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantã (SISBIO nº 36375-1), na forma de veneno bruto seco. Os venenos foram ressuspendidos em solução tampão salina fosfato, obtendo-se soluções na concentração de 6,48 mg/ ml (*Rhinella marina*) e 12,96 mg/ ml (*Rhinella jimi*) acondicionadas em alíquotas de 200 µL e mantidas em freezer -80 °C até o momento do uso.

### 4.3 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

- Formaldeído/Formalina (Sigma-Aldrich): foi empregado solução de formaldeído a 1 % que foi preparada por diluição da solução estoque à 37 % em solução fisiológica 0,9 % (TJOLSEN et al., 1992) e foi administrada por via subcutânea no dorso da pata posterior direita no volume de 25 µL;
- λ-Carragenina (Sigma-Aldrich): foi empregada solução de carragenina a 1% que foi preparada por dissolução de 1 g de carragenina em 100 ml de solução fisiológica 0,9 % (WINTER et al., 1962) e foi administrada por via subcutânea intraplantar na pata posterior direita no volume de 25 µL;
- Diazepam (União Química): foi empregado solução de diazepam nas doses de 2 mg/ Kg e 5 mg/ Kg (CRAWLEY; DAVIS, 1982). As soluções foram

- preparadas a partir da diluição da solução de ampolas de diazepam (5 mg/ml) com solução fisiológica 0,9 % e foi administrada por via intraperitoneal;
- Sertralina (Momenta): foi empregado na dose de 10 mg/ Kg (MIKAIL et al., 2012). A solução de sertralina foi preparada a partir de comprimidos de 50 mg previamente macerados e dissolvidos completamente em solução fisiológica à 0,9 % e foi administrada por via intraperitoneal;
  - Paracetamol (Sigma-Aldrich): foi empregado na dose de 200 mg/ Kg (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A solução de paracetamol foi preparada por dissolução de 6 mg do fármaco em 1 ml de solução fisiológica a 0,9 % e foi administrada por via intraperitoneal;
  - Indometacina (Tocris Bioscience): foi empregada na dose de 30 mg/ Kg (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A solução de indometacina foi preparada dissolvendo 30 mg da droga em 1 ml de solução fisiológica a 0,9 % e foi administrada por via intraperitoneal;
  - Veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi*: as soluções estoques de veneno foram descongelados para a concentração de 60, 180 ou 360 µg/ 300 µL (MAILHO-FONTANA et al., 2013). Os venenos foram diluídos em solução fisiológica à 0,9 % e injetados por via subcutânea na região dorsal atrás da cabeça no volume de 300 µL.

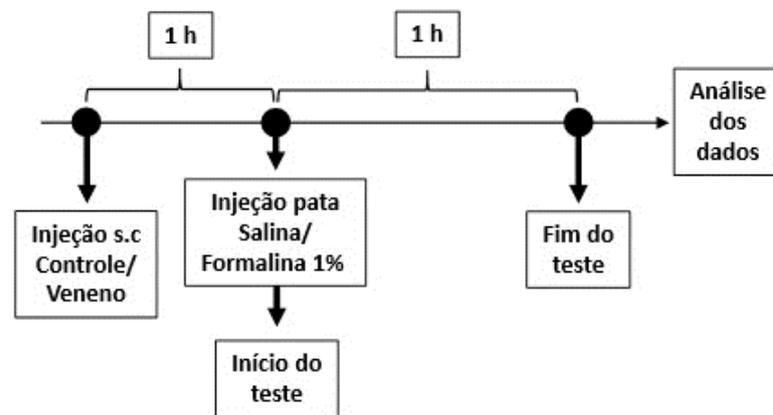
#### 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

##### 4.4.1 Teste da formalina

O teste da formalina foi empregado para avaliar se os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* alteram a resposta nociceptiva induzida por injeção intraplantar de formalina a 1% e foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Para tal, no dia do experimento os animais foram pré-tratados com injeção subcutânea no dorso com veneno de *Rhinella marina* ou *Rhinella jimi* nas doses de 60, 180 ou 360 µg/ 300 µL. Como controle negativo e positivo, os animais foram pré-tratados, respectivamente, com salina (300 µL; s.c. no dorso) e Paracetamol (200 mg/ Kg; i.p). Após 1 hora do pré-tratamento, os animais receberam injeção de 25 µL de formalina

a 1% no dorso da pata posterior direita. Imediatamente após a injeção de formalina, os camundongos foram colocados sob o aparato de observação constituído por um funil de vidro rodeado por dois espelhos e realizou-se a contagem do número total de comportamentos nociceptivos a cada 5 minutos durante 60 minutos. Considerou-se como comportamento nociceptivo a elevação, sacudida e/ou lambida da pata tratada. O protocolo experimental deste teste é representado de acordo do o fluxograma (Figura 2) abaixo:

Figura 2 Fluxograma representando o teste da Formalina 1%



#### 4.4.2 Edema de pata induzido por carragenina

O teste do edema de pata foi empregado para avaliar o efeito dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre o desenvolvimento do edema induzido por injeção intraplantar de carragenina e foi realizado de acordo com Morris (1987). O edema de pata foi mensurado com o auxílio de um pletismômetro de pata (Insight, Brasil), que consiste de um equipamento capaz de detectar alterações volumétricas da pata. Previamente, obteve-se as medidas basais de ambas as patas posteriores e, em seguida, os animais foram pré-tratados com veneno de *Rhinella marina* ou *Rhinella jimi* (60, 180 ou 360 µg/ 300 µL; s.c no dorso). Como controle negativo e positivo, os animais foram pré-tratados, respectivamente, com salina (300 µL; s.c no dorso) e indometacina (6 mg/ Kg; i.p).

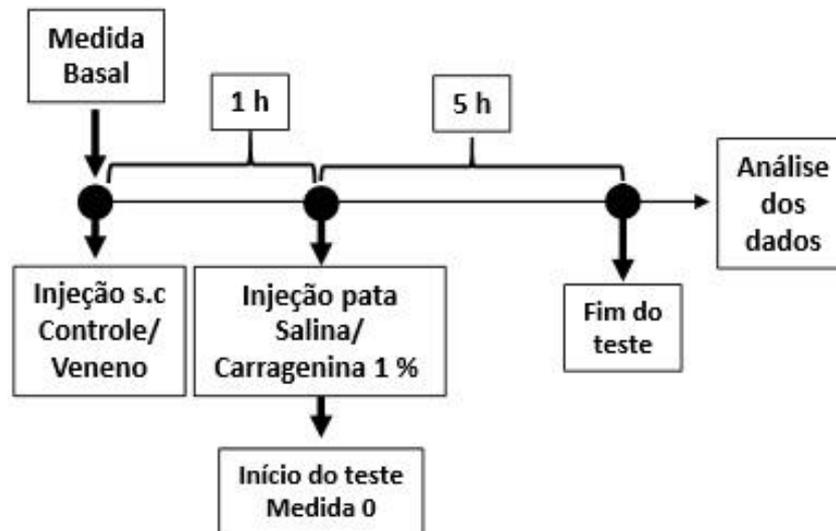
Passados 1 hora do pré-tratamento, os animais foram injetados com 25 µL de solução de carragenina a 1% na região plantar da pata direita (pata ipsilateral) e, imediatamente depois, mediu-se o volume de ambas patas posteriores. O volume

das patas injetadas e não-injetadas foram avaliadas 1, 2, 3, 4 e 5 horas após administração da solução de carragenina. Os dados obtidos foram transformados em % da diferença entre o volume da pata injetada e sua respectiva pata oposta (controle) de cada tratamento nos diferentes tempos avaliados, de acordo com a fórmula:

$$\text{\% da diferença do volume da pata} = \frac{(P_i - P_c)}{P_c} \times 100$$

Onde  $P_i$  é a pata injetada e  $P_c$  a pata controle não-injetada. Somente a porcentagem da diferença foi estatisticamente analisada. O protocolo experimental deste teste é representado de acordo com o fluxograma (Figura 3) abaixo:

Figura 3 Fluxograma representando o teste da Carragenina

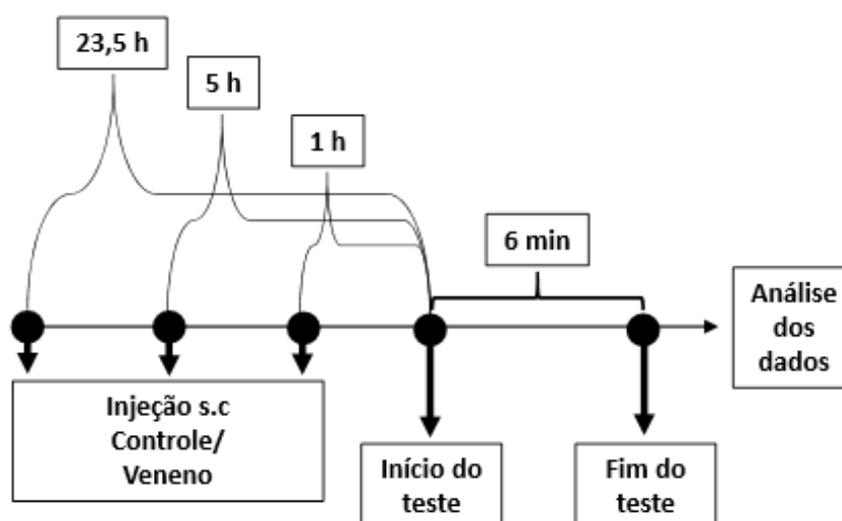


#### 4.4.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um modelo animal preditivo da ação de antidepressivos e tem sido usado extensivamente no desenvolvimento de novos componentes terapêuticos e para a compreensão dos substratos neurais envolvidos no comportamento depressivo (CRYAN et al., 2005). No presente estudo, empregamos o teste do nado forçado de acordo com o método modificado

de Zangen e colaboradores (1997). Neste método, os animais não foram submetidos ao pré-teste de 15 minutos em virtude do perfil de tratamento subcrônico (3 doses consecutivas) de veneno e fármacos no presente estudo. Para realização do teste utilizou-se um recipiente de vidro com capacidade para 2 L preenchido com 13 cm de água (aproximadamente 1,6 L) em temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O volume de preenchimento foi escolhido de forma a não permitir que o camundongo fosse capaz de tocar o fundo do recipiente com a cauda e nem de escalar o recipiente. Para a realização do experimento, os camundongos foram pré-tratados com 3 injeções subcutâneas consecutivas (administração subcrônica) dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* nos tempos 23,5, 5 e 1 hora antes do início do teste. Nesse sentido, cada camundongo recebeu 3 doses consecutivas de 60, 180 ou 360  $\mu\text{g}$ / 300  $\mu\text{L}$ . Como controle negativo e positivo, os animais foram subcronicamente pré-tratados, respectivamente, com salina (300  $\mu\text{L}$ ; s.c no dorso) e sertralina (10 mg/Kg; i.p). No momento do teste, o animal foi colocado no centro do recipiente com água e os comportamentos exibidos foram filmados durante 6 minutos. Após o teste os vídeos foram analisados e a duração em minutos da exibição dos comportamentos de nado e imobilidade foram contabilizados. O protocolo experimental deste teste é representado de acordo do o fluxograma (Figura 4) abaixo:

Figura 4 Fluxograma representando o teste da Carragenina



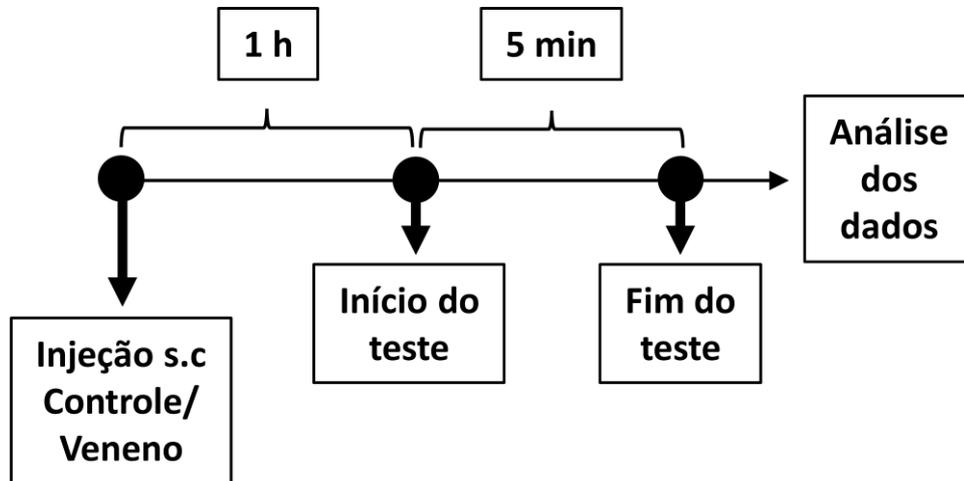
#### 4.4.4 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi empregado para avaliar se o pré-tratamento com o veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* alteram a atividade locomotora e o nível de ansiedade de camundongos de acordo com Brown e colaboradores (1999). Neste teste, observa-se que o comportamento inato de roedores quando expostos à ambientes abertos, onde se movimentam livremente ao longo do campo e preferencialmente próximo das paredes (tigmotaxia). O aparato de campo aberto consiste de uma caixa ladeada com 4 paredes de 72 cm de largura e 36 cm de altura. O assoalho da caixa é dividido em dezesseis quadrados semelhantes de 18 por 18 cm, sendo um dos quadrantes dispostos no centro do campo. Os testes foram realizados em sala sob iluminação com lâmpada fluorescente vermelha de 80 watts disposta sob o centro do campo à uma altura de 1 m.

Para a realização do procedimento, os animais foram pré-tratados com injeção subcutânea no dorso de veneno de *Rhinella marina* ou *Rhinella jimi* (60, 180 ou 360  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ) e, após uma hora, colocados individualmente no centro do campo. O comportamento exibido pelo animal foi registrado com uma câmera filmadora durante 5 minutos. Após esse período, o animal foi retirado do campo e o assoalho foi limpo com papel toalha e álcool 70%. Como controle negativo e positivo, os animais foram pré-tratados, respectivamente, com salina (300  $\mu\text{L}$ ; s.c no dorso) e diazepam (2 e 5 mg/Kg; i.p).

Após os experimentos, os vídeos foram analisados e os seguintes comportamentos contabilizados: nº de quadrantes cruzados, nº de entradas no quadrante central, nº de comportamento de erigir (rearing), nº de comportamentos de avaliação de risco (hesitação) e nº de comportamento de autolimpeza (grooming). Para avaliação do nível de atividade locomotora considerou-se a soma do número de quadrantes cruzados e do nº de comportamentos de erigir. O nível de ansiedade foi avaliado pelo nº de entradas no quadrante central, nº de comportamentos de hesitação, nº de comportamentos de autolimpeza. O protocolo experimental deste teste é representado de acordo do o fluxograma (Figura 5) abaixo:

Figura 5 Fluxograma representando o Teste do Campo Aberto



#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A influência dos diversos tratamentos sobre as variáveis estudadas, em função do tempo, foi estatisticamente analisada através de análise multivariada de variância de dois fatores com medidas repetidas, quando for o caso, para comparar os grupos durante todo o tempo do experimento. Os fatores analisados foram: tratamento, tempo e a interação tratamento x tempo. Nos casos em que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos foi realizado teste de múltiplas comparações de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Graphpad Prism 6.07, e o nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTE DA FORMALINA

Inicialmente, o estudo confirmou que a injeção intraplantar subcutânea de formalina à 1% induz resposta nociceptiva bifásica (Figura 6). Foram consideradas como resposta nociceptiva à injeção de formalina as respostas comportamentais de sacudir, elevar e/ou lambar a pata injetada. O curso temporal da resposta nociceptiva apresentou-se de maneira característica, sendo: uma fase inicial de curta duração (cerca de 5 minutos de duração) desenvolvida imediatamente após a administração da formalina a 1% e uma segunda fase mais duradoura (cerca de 20 minutos de duração) pós-injeção. Entre a primeira e segunda fase do teste observou-se um período de silenciamento comportamental de 10-15 minutos de duração. Após a segunda fase, os comportamentos se extinguiram gradualmente até sua quase total abolição. Para validar o teste empregamos como controle positivo o paracetamol por ser um fármaco que apresenta eficácia analgésica no teste da formalina. Nesse sentido, os resultados mostram que a injeção intraperitoneal de paracetamol (200mg/kg) reduziu significativamente a resposta comportamental nociceptiva tanto na primeira quanto na segunda fase do teste da formalina. Os dados da Figura 6 mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{1,8} = 48.88$  e  $P = 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,88} = 16.62$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{11,88} = 13,16$  e  $P < 0,0001$ ).

Os resultados mostram que o pré-tratamento dos camundongos com injeção subcutânea de veneno de *Rhinella marina* reduziu significativamente e de maneira dose dependente as duas fases da resposta nociceptiva induzida por injeção subcutânea de formalina 1% (Figura 7A, B e C). Na dose de 60  $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$  (figura 7A), o veneno atenuou significativamente a duração da segunda fase do teste a partir do 7º intervalo, mas não alterou significativamente a primeira fase do teste. Na dose de 180 $\mu\text{g}/300\mu\text{L}$  (Figura 7B), o veneno não atenuou significativamente a intensidade da primeira fase e atenuou significativamente a duração e intensidade da segunda fase do teste a partir do 7º intervalo. Por fim, na dose de 360  $\mu\text{g}/300\mu\text{L}$  (Figura 7C), o veneno atenuou significativamente a intensidade da primeira fase e aboliu a segunda fase do teste. Os dados da Figura 7A mostraram significativa

diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,16} = 42,67$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,176} = 38,44$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,176} = 14,51$  e  $P < 0,0001$ ). Os dados da Figura 7B mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,12} = 34,11$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,44} = 35,49$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,132} = 12,06$  e  $P < 0,0001$ ). Os dados da Figura 7C mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,16} = 37,66$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,176} = 28,31$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,176} = 11,30$  e  $P < 0,0001$ ).

Os resultados em relação ao pré-tratamento dos camundongos com injeção subcutânea de veneno de *Rhinella jimi* reduziu significativamente as duas fases de resposta nociceptiva induzida por injeção subcutânea de formalina 1% (Figura 8A, B e C). Na dose de 60  $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$  (Figura 8A), o veneno reduziu a primeira fase e atenuou significativamente a duração da segunda fase do teste da formalina a partir do 6º intervalo e permaneceu durante quase toda a fase do teste. Nas doses de 180  $\mu\text{g} / 300\mu\text{L}$  e 360  $\mu\text{g} / 300\mu\text{L}$  (Figura 8B e Figura 8C), o veneno atenuou significativamente a intensidade da primeira fase e atenuou significativamente a duração e intensidade da segunda fase do teste da formalina. Os dados da Figura 8A mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,16} = 43,79$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,176} = 34,10$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,176} = 12,60$  e  $P < 0,0001$ ). Os dados da Figura 8B mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,16} = 45,54$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,176} = 34,80$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,176} = 13,59$  e  $P < 0,0001$ ). Os dados da Figura 8C mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{3,16} = 42,92$  e  $P < 0,0001$ ), quanto ao tempo ( $F_{11,176} = 32,42$  e  $P < 0,0001$ ) e significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{33,176} = 12,64$  e  $P < 0,0001$ ).

Figura 6 Curso temporal da resposta nociceptiva induzida por injeção subcutânea de formalina a 1% na pata de animais pré-tratados com salina ou paracetamol (200 mg/Kg). Sal + Sal = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção subcutânea de salina (Sal) na pata. Sal + For = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção subcutânea de formalina (For) na pata. Para + For = pré-tratamento com paracetamol (Para) e injeção intraplantar de formalina (For). A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . \* Diferente dos grupos Sal + Sal. # Diferente dos grupos Sal + For e Sal + Sal. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 5 animais

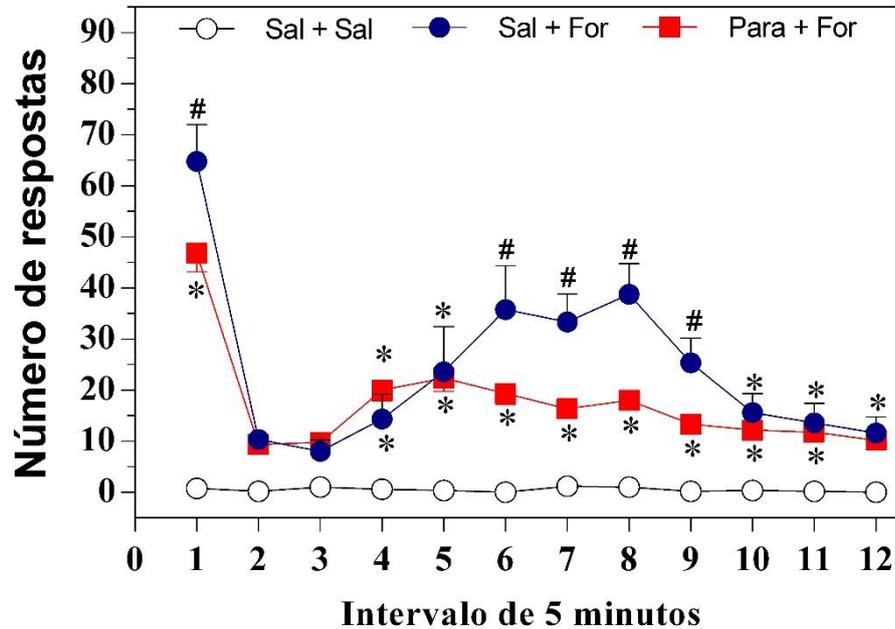


Figura 7 Efeitos da administração subcutânea do veneno de *Rhinella marina* sobre reposta nociceptiva no teste da formalina 1%. As figuras (A), (B) e (C) representam as doses 60 (Rm 60), 180 (Rm 180) e 360  $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$  (Rm 360) de veneno de *Rhinella marina*, respectivamente. Sal + Sal = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção intraplantar de salina (Sal). Sal + For = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção intraplantar de formalina (For). Rm + For = pré-tratamento com veneno de *Rhinella marina* (Rm) e injeção intraplantar de formalina (For). Rm + Sal = pré-tratamento com veneno de *Rhinella marina* (Rm) e injeção intraplantar de salina (Sal). A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . Rm = veneno de *Rhinella marina*; \* Diferente do Sal + Sal e Rm + Sal; # Diferente do Rm + For, Rm + Sal e Sal + Sal. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 5 animais.

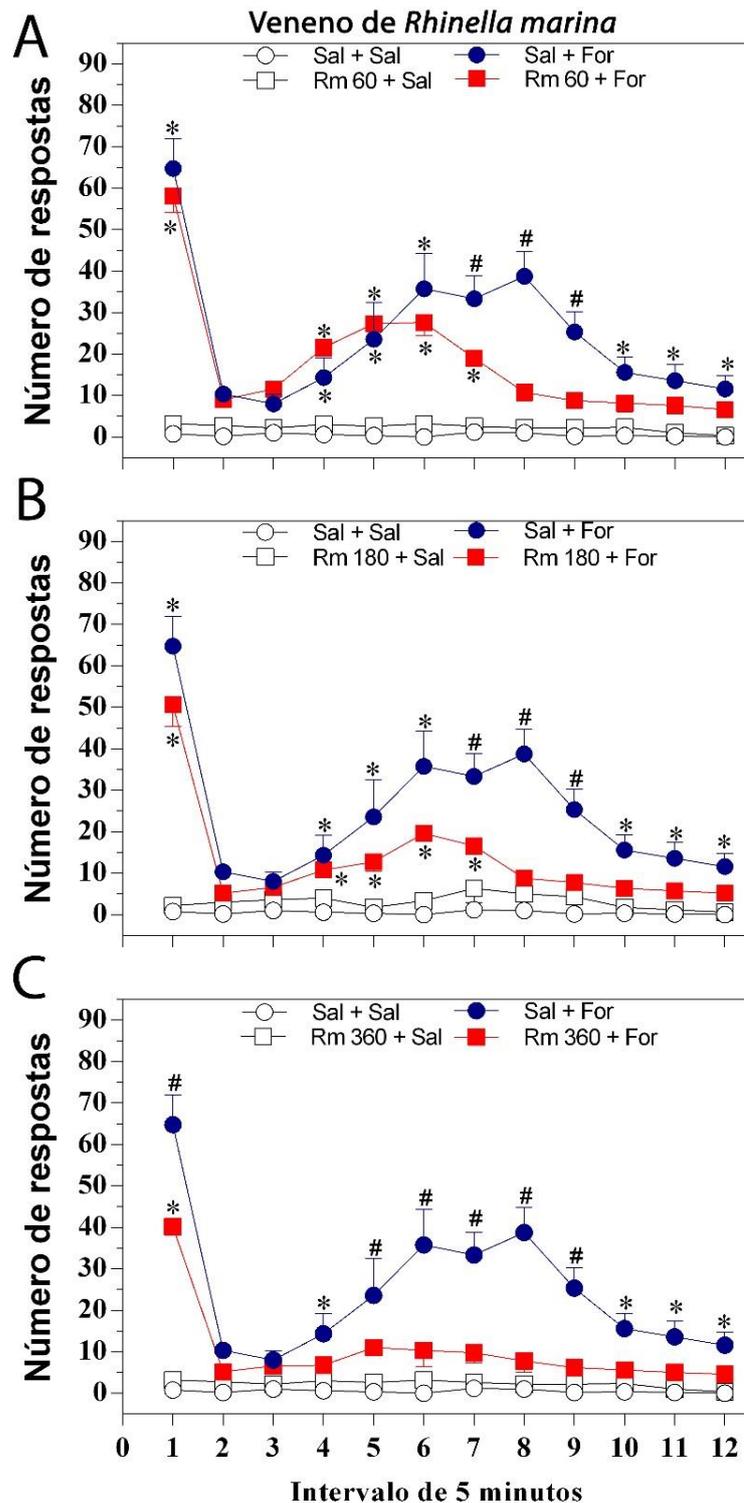
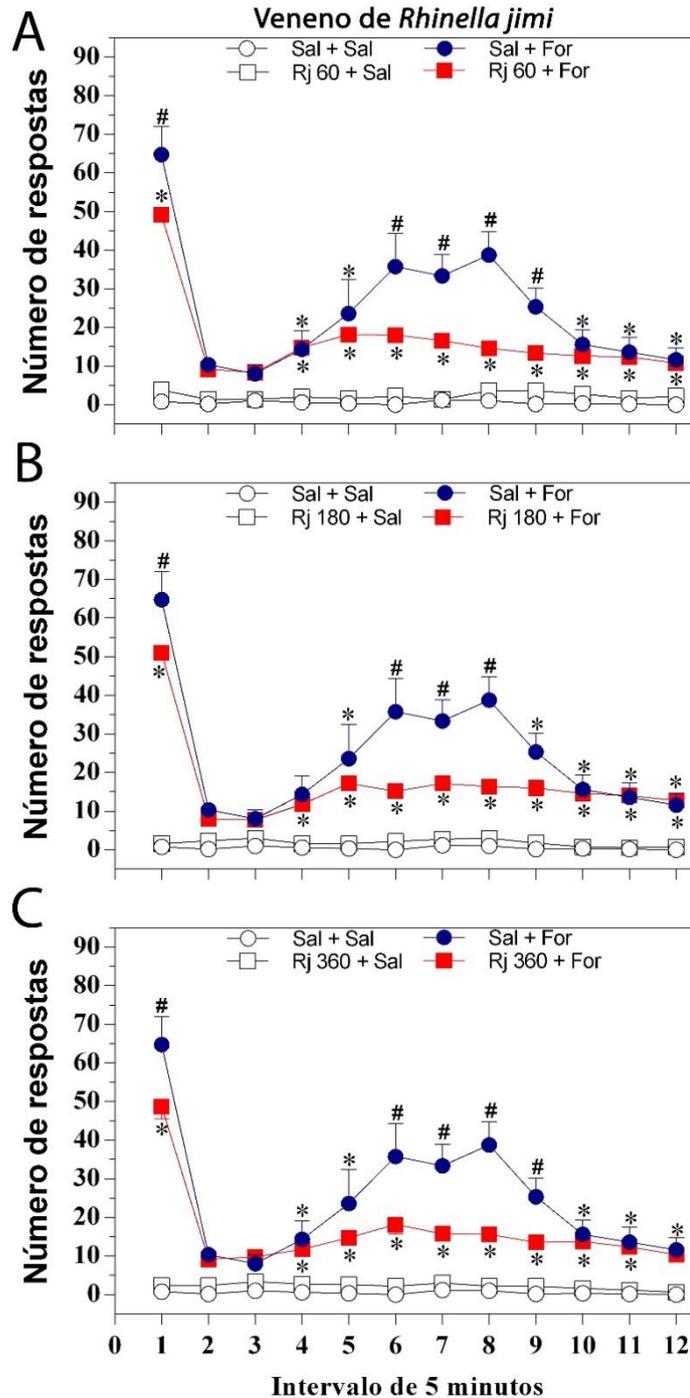


Figura 8 Efeitos da administração subcutânea do veneno de *Rhinella jimi* em diferentes doses sobre a resposta nociceptiva no teste da formalina 1%. As figuras (A), (B) e (C) representam as doses 60 µg/300 µL (Rj 60), 180 µg/300 µL (Rj 180) e 360 µg/300 µL (Rj 360), respectivamente. Sal + Sal = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção intraplantar de salina (Sal). Sal + For = pré-tratamento com salina (Sal) e injeção intraplantar de formalina (For). Rj + For = pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* (Rj) e injeção intraplantar de formalina (For). Rj + Sal = pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* (Rj) e injeção intraplantar de salina (Sal). A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . Rj = veneno de *Rhinella jimi*; \* Diferente do Sal + Sal e Rj + Sal; # Diferente do Rj + For, Rj + Sal e Sal + Sal. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 5 animais.



## 5.2 TESTE DA CARRAGENINA

O presente estudo demonstrou que a injeção subcutânea intraplantar de carragenina a 1% induz edema de pata indicado pelo aumento significativo do percentual de diferença de volume da pata injetada em comparação à pata controle não injetada (Figura 9). A partir da 1ª hora o percentual de aumento de volume da pata tratada com carragenina aumentou gradual e significativamente, atingindo pico de aumento na 3ª hora pós-injeção, reduzindo gradativamente após a 4ª, quando comparado com o controle tratado com salina. Na 5ª hora a diferença dos volumes das patas não se diferiram mais dos valores basais. Também foi demonstrado que o pré-tratamento com indometacina (6 mg/ Kg / i.p) inibiu o desenvolvimento do edema na 1ª e 2ª hora e significativamente reduziu o edema na 3ª e 4ª hora. Os valores basais, do tempo 0 e 5 horas pós injeção de carragenina não foram significativamente alterados. Os dados da figura 9 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ( $F_{2,8} = 51.3$ ;  $p < 0,0001$ ), tempo ( $F_{6,24} = 33.04$ ;  $p < 0,0001$ ) e mostraram significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{12,48} = 13.55$ ;  $p < 0,0001$ ).

Posteriormente, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com injeção subcutânea no dorso de veneno de *Rhinella marina* sobre edema de pata induzido pela carragenina (Figuras 10 A, B e C). Os resultados mostraram que edema induzido por carragenina, representado pelo aumento significativo do percentual de diferença de volume da pata injetada em comparação à pata esquerda controle não injetada, foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento com veneno de *Rhinella marina* nas doses de 180 µg/ 300 µL (Figura 10B) e 360 µg/ 300 µL (Figura 10C), mas não com a dose de 60 µg/300µL (Figura 10A). Nas doses de 180 µg/ 300 µL e 360 µg/ 300 µL o edema de pata foi significativamente reduzido na 3ª e 4ª hora pós-injeção quando comparado com do grupo pré-tratado com salina. Além disso, da dose de 180 µg/ 300 µL, o volume da pata foi significativamente maior quando comparado com o grupo pré-tratado com os grupos controles. Na 5ª hora a diferença dos volumes das patas não se diferiram significativamente dos valores basais. Os dados da figura 10A, 10B e 10C foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ( $F_{2,8} = 70.48, 53.81$  e  $99$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos), tempo ( $F_{6,24} =$

36.21, 28.69 e 33.62, respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos) e mostraram significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{12, 48} = 10.72, 11.06$  e  $11.93$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos).

Também avaliamos o efeito da injeção subcutânea no dorso de veneno de *Rhinella jimi* sobre o edema de pata induzido pela carragenina (Figuras 11 A, B e C). Os resultados mostraram o edema induzido por carragenina foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* em todas as doses testadas. Na dose de  $60 \mu\text{g}/ 300 \mu\text{L}$  (Figura 11A), o veneno bloqueou o aumento do volume da pata entre a 1ª e 2ª hora e atenuou significativamente o edema entre a 3ª e 4ª hora após administração de carragenina quando comparado com o grupo pré-tratado com salina. Na dose de  $180 \mu\text{g}/ 300 \mu\text{L}$  (Figura 11B) e  $360 \mu\text{g}/ 300 \mu\text{L}$  (Figura 11C) o edema foi atenuado significativamente entre 3ª e 4ª sem alterar significativamente o aumento do volume na 1ª e 2ª hora pós injeção de carragenina quando comparado com o grupo pré-tratado com salina. Os dados da figura 11A, 11B e 11C foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ( $F_{2, 8} = 35.33, 130.3$  e  $105.1$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos), tempo ( $F_{6, 24} = 30.15, 50.97$  e  $59.69$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos) e mostraram significativa interação tratamento versus tempo ( $F_{12, 48} = 11.40, 9.21$  e  $8.24$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  em todos os casos).

Figura 9 Curso temporal do edema de pata induzido pela injeção subcutânea intraplantar de carragenina (Car) a 1% em animais pré-tratados com indometacina (Indo; 6 mg/Kg). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM da porcentagem (%) de diferença entre a pata injetada com carragenina ou salina e sua respectiva pata controle não injetada. Sal + Sal = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar de salina. Sal + Car = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar de carragenina. Indo + Car = pré-tratamento com indometacina e injeção intraplantar de carragenina. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . \* Diferente dos grupos Sal + Sal. # Diferente dos grupos Indo + Car e Sal + Sal.

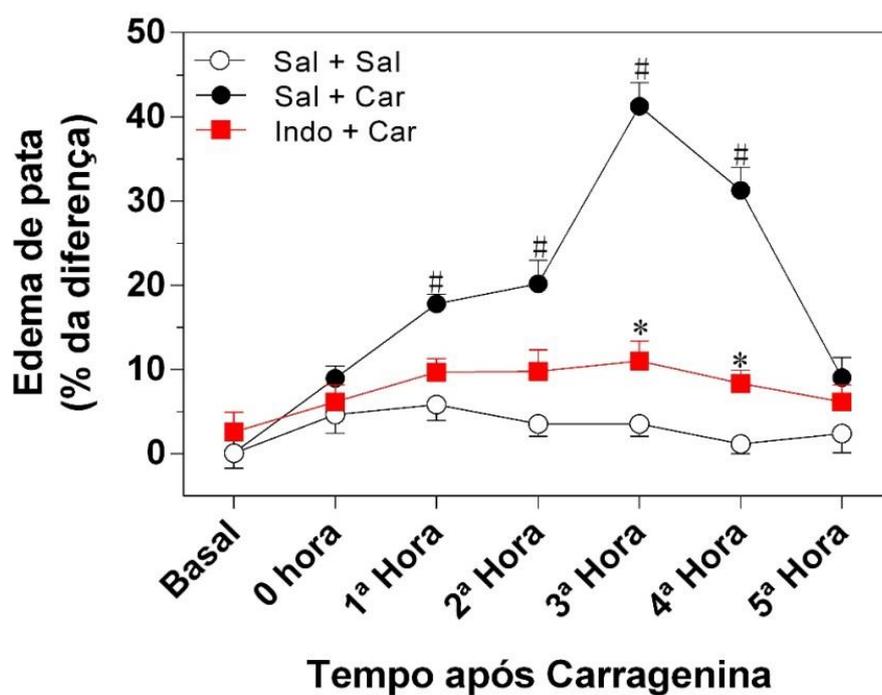


Figura 10 Efeito do veneno de *Rhinella marina* sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina a 1%. O veneno de *Rhinella marina* foi administrado nas doses de 60 $\mu$ g/300 $\mu$ L (A), 180 $\mu$ g/300 $\mu$ L (B) e 360 $\mu$ g/300 $\mu$ L (C). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM da porcentagem (%) da diferença entre a pata injetada e sua respectiva pata não injetada. Sal + Sal = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar com salina. Sal + Car = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar de carragenina. Rm + Car = pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* e injeção intraplantar de carragenina. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . \* Diferente dos grupos Sal + Sal. # Diferente dos grupos Rm + Car e Sal + Sal.

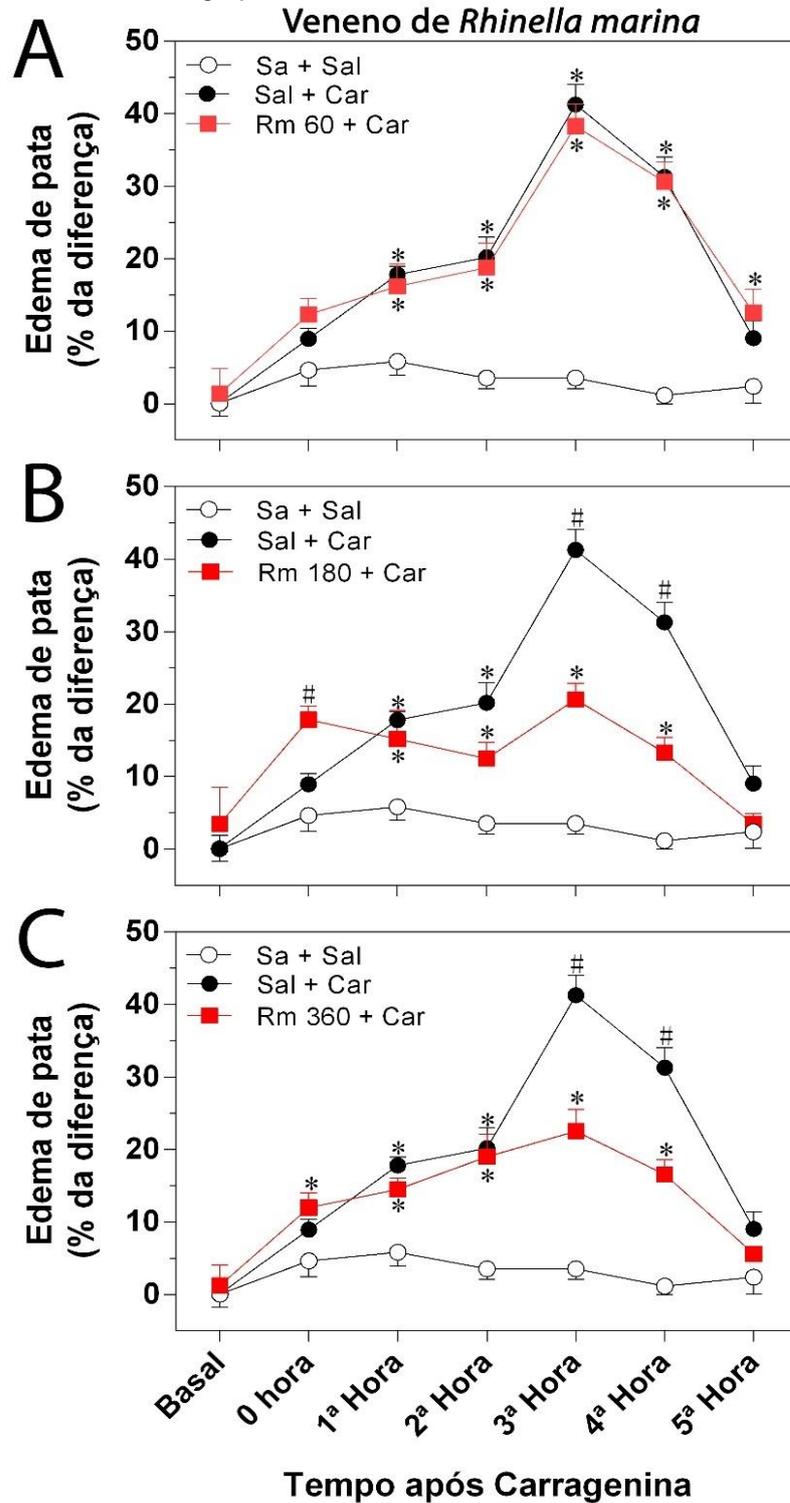
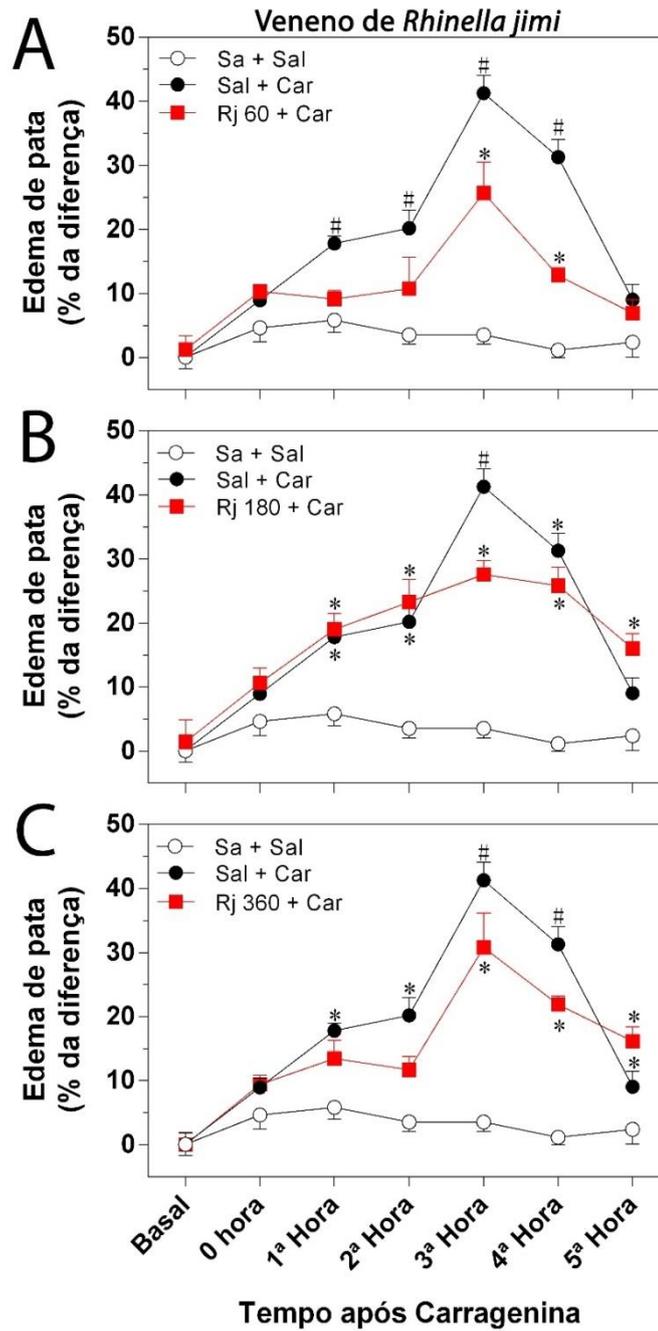


Figura 11 Efeito do veneno de *Rhinella jimi* sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina a 1%. O veneno de *Rhinella jimi* foi administrado nas doses de 60 $\mu$ g/300 $\mu$ L (A), 180 $\mu$ g/300 $\mu$ L (B) e 360 $\mu$ g/300 $\mu$ L (C). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM da porcentagem (%) de diferença entre a pata injetada e sua respectiva pata não injetada. Sal + Sal = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar de salina. Sal + Car = pré-tratamento com salina e injeção intraplantar de carragenina. Rm + Car = pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* e injeção intraplantar de carragenina. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . \* Diferente dos grupos Sal + Sal. # Diferente dos grupos Rj + Car e Sal + Sal



### 5.3 TESTE DO NADO FORÇADO

No presente estudo avaliamos o efeito do pré-tratamento subcrônico (3 administrações consecutivas) com injeção subcutânea dorsal de veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre o comportamento de nado e imobilidade no teste do nado forçado. Inicialmente mostramos que os animais pré-tratados subcronicamente com solução salina e submetidos ao nado forçado exibiram comportamento de imobilidade e nado com duração total 174 e 169 segundos, respectivamente (Figura 12A, 12B, 13A e 13B). Também avaliamos o efeito do pré-tratamento subcrônico com sertralina (10 mg/ Kg; figuras 12A, 12B, 13A e 13B), um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da receptação de serotonina. Os resultados mostraram que a sertralina diminui a duração da imobilidade (105 segundos) e aumentou a duração do nado (236 segundos) quando comparada com o grupo controle salina.

Os resultados também mostram que a injeção subcutânea dorsal de veneno de *Rhinella marina* aumentou o tempo de imobilidade (figura 12A) e reduziu o tempo de nado (figura 12B) de maneira significativa nas doses de 180 e 360 µg/ 300 µL, mas não na dose de 60 µg/ 300 µL, quando comparados com o grupo tratado com solução salina. Nas doses de 60, 180 e 360 µg/ 300 µL o tempo de imobilidade foi respectivamente 194, 223 e 245 segundos e o tempo de nado foram 147, 123 e 105 segundos respectivamente. Já o tratamento subcrônico com o veneno de *Rhinella jimi* (Figura 13A e 13B) não apresentou alterações significativas no tempo de imobilidade e de nado em nenhuma das doses testadas. Nas doses de 60, 180 e 360 µg/ 300 µL o tempo de imobilidade foi respectivamente 190, 182, 214 segundos e o tempo de nado foram 164, 173 e 138 segundos respectivamente. Os dados da figura 12A e 12B foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ( $F_{4,20} = 24,77$  e  $23,92$ , respectivamente;  $p < 0,0001$  para ambos casos). Os dados da Figura 13A e 13B não mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ( $F_{4,20} = 14,86$  e  $11,21$  respectivamente;  $p < 0,0001$  para ambos casos).

Figura 12 Efeitos do pré-tratamento com veneno de *Rhinella marina* sobre o tempo de imobilidade (A) e nado (B) de camundongos expostos ao teste do nado forçado. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 5 animais. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . Rm = veneno de *Rhinella marina*. \* Diferente do grupo salina.

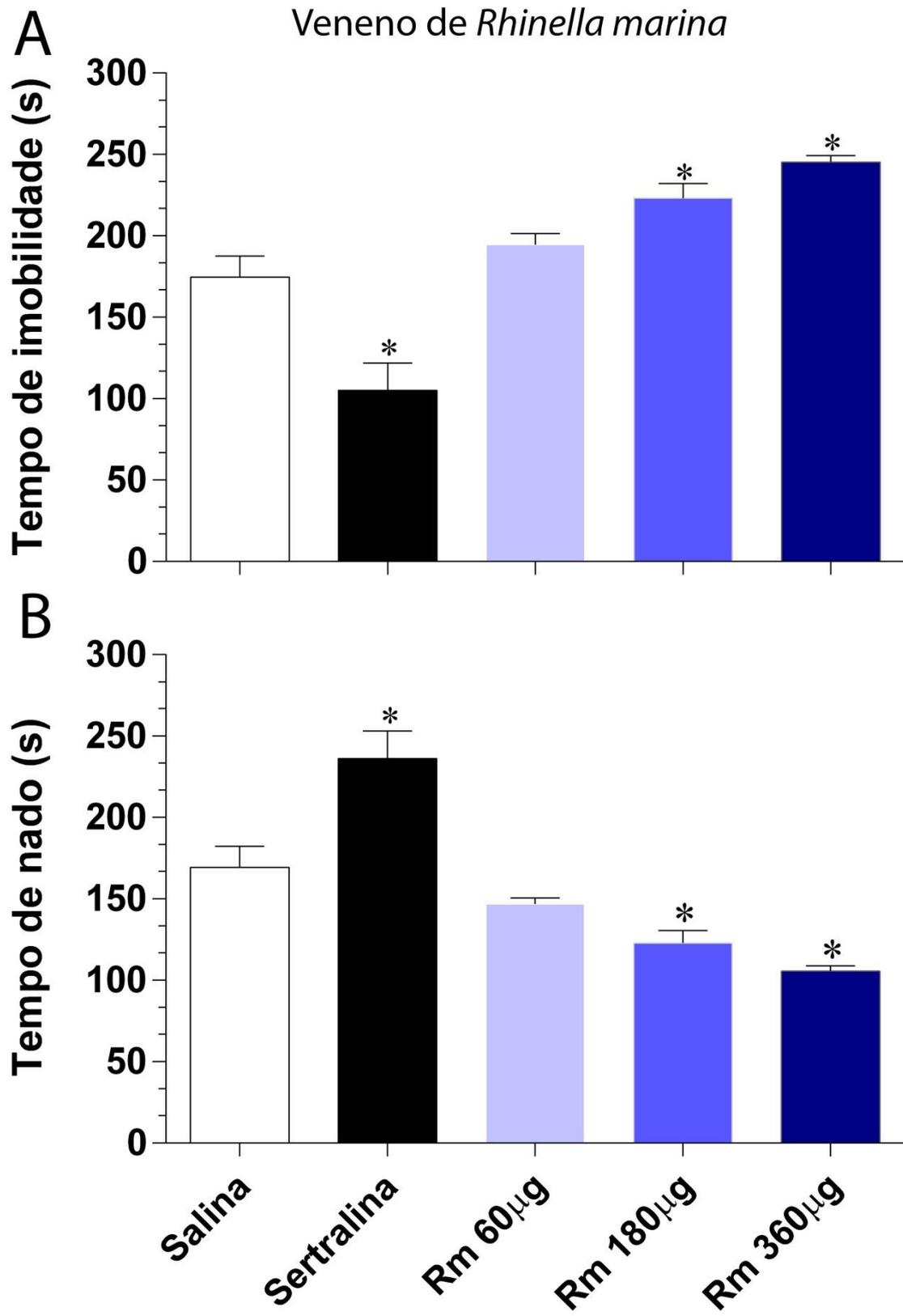
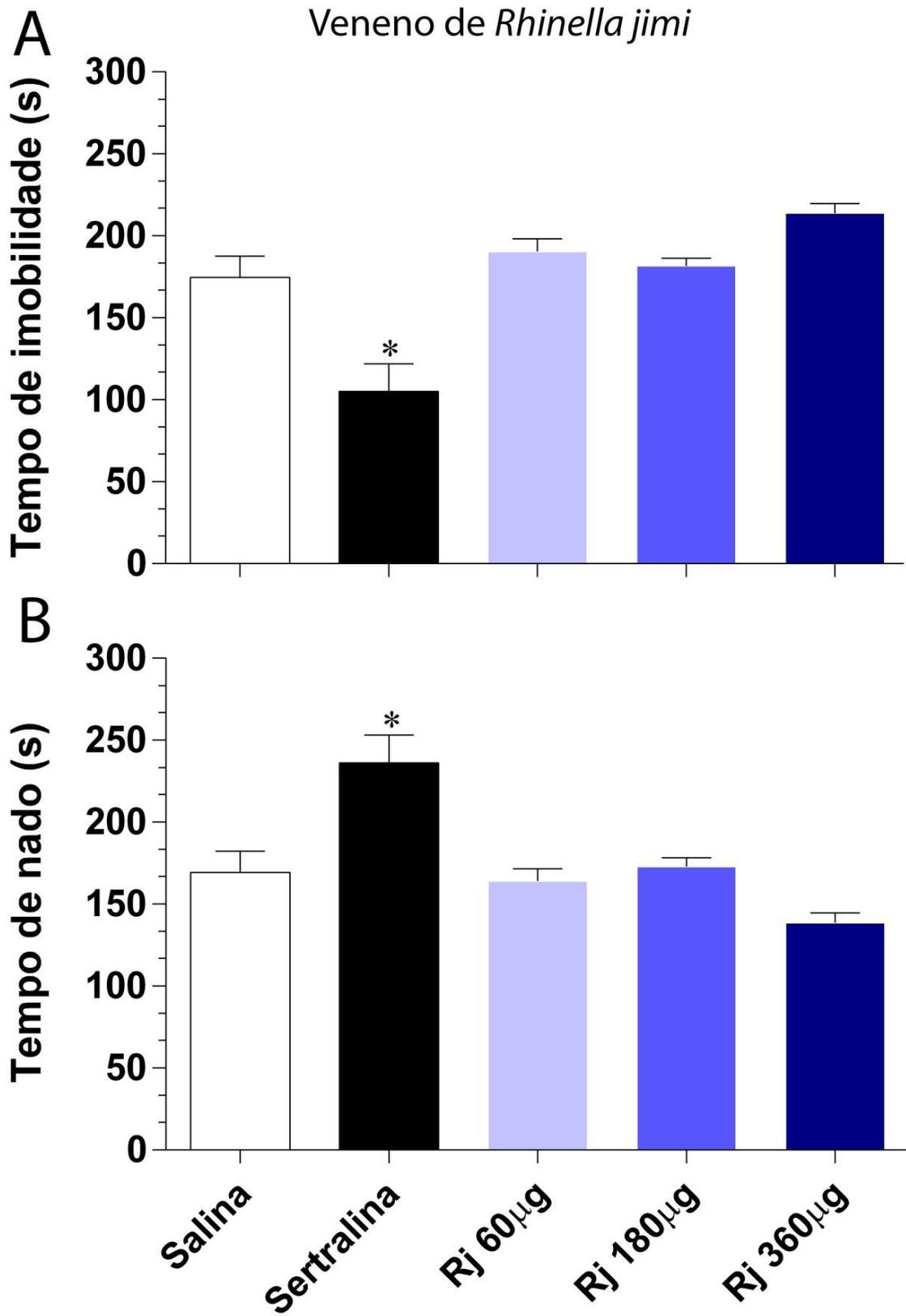


Figura 13 Efeitos do pré-tratamento com veneno de *Rhinella jimi* sobre o tempo de imobilidade (A) e nado (B) de camundongos expostos ao teste do nado forçado. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 5 animais. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . Rj = Veneno de *Rhinella jimi*; \* Diferente do grupo salina.



#### 5.4 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto foi empregado como modelo para avaliar se os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* alteram a atividade locomotora e/ou alteram os comportamentos associados ao nível de ansiedade dos animais. Dessa forma, os resultados mostraram que no teste do campo aberto a administração subcutânea de veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* não altera significativamente a atividade locomotora em nenhuma das doses testadas quando comparado ao grupo controle salina (Figura 14A e Figura 14B). Como controle positivo o estudo também avaliou o efeito do diazepam na dose 0,06 mg/ ml, a qual produz efeito ansiolítico, e na dose 0,15 mg/ ml, a qual produz efeito sedativo (Figura 14). Os resultados mostram que o diazepam reduziu significativamente a atividade locomotora na dose 0,15 mg/ ml, mas não na dose 0,06 mg/ ml. Os dados da figura 14A foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 4,46$  e  $p = 0,005$ ). Os dados da figura 14B não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 2,64$  e  $p = 0,092$ ).

O estudo também avaliou o efeito do veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* sobre a atividade exploratória, comportamento de hesitação e comportamento de autolimpeza, os quais estão associados ao nível de ansiedade dos animais. Os resultados mostraram que o veneno de ambas espécies não alterou significativamente a atividade exploratória (Figura 15A 15B), comportamentos de hesitação (Figura 16A e 16B) e comportamentos de autolimpeza (Figura 17A e 17B). Os dados da figura 15A foram diferentes quanto ao tratamento. Os dados da figura 15B não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 1,65$  e  $p = 0,19$ ). Os dados da Figura 16A não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 1,279$  e  $p = 0,3053$ ). Os dados da figura 16B não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 1,417$  e  $p = 0,2538$ ). Os dados da Figura 17A não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 0,96$  e  $p = 0,4628$ ). Os dados da figura 17B não foram diferentes quanto ao tratamento ( $F_{5, 24} = 0,6286$  e  $p = 0,6797$ ).

Figura 14 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre a atividade locomotora (nº de quadrantes cruzados + elevação) de camundongos expostos ao teste do campo aberto. Os venenos de *Rhinella marina* (Rm) e de *Rhinella jimi* (Rj) foram administrados nas doses de 60, 180 e 360 µg / 300 µl (s.c. no dorso). O diazepam (Dia) foi administrado nas doses de 2 e 5 mg / Kg. Os dados foram apresentados como média ± EPM de 5 animais. A significância estatística foi fixada em  $p < 0,05$ . \* diferente do grupo salina (Sal).

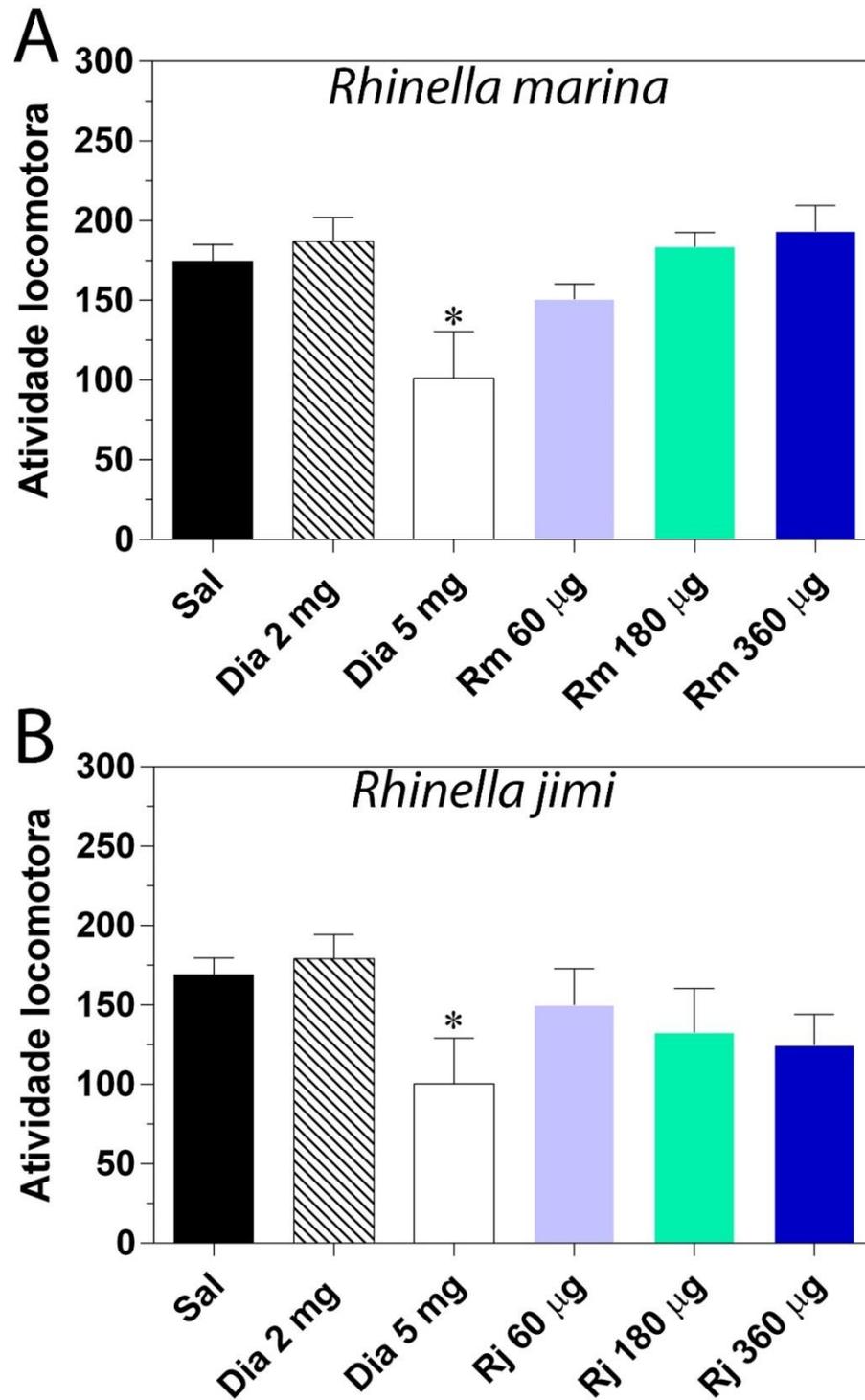


Figura 15 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre a atividade exploratória (nº de entradas quadrante central) de camundongos expostos ao teste do campo aberto. Os venenos de *Rhinella marina* (Rm) e de *Rhinella jimi* (Rj) foram administrados nas doses de 60, 180 e 360  $\mu\text{g}$  / 300  $\mu\text{l}$  (s.c. no dorso). O diazepam (Dia) foi administrado nas doses de 2 e 5 mg / Kg. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 animais. Sal = salina.

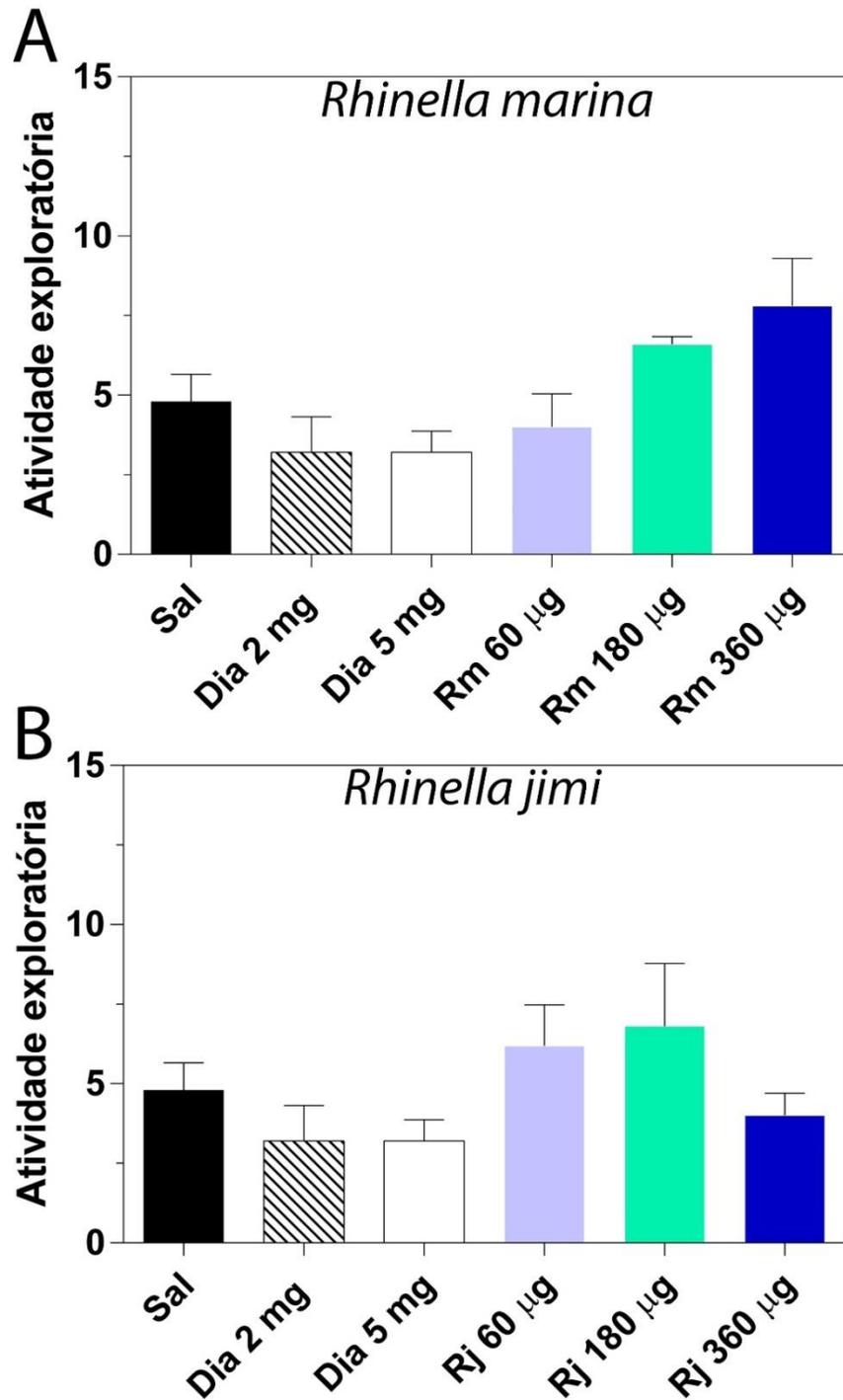


Figura 16 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre o nº de comportamentos de hesitação exibidos por camundongos expostos ao teste do campo aberto. Os venenos de *Rhinella marina* (Rm) e de *Rhinella jimi* (Rj) foram administrados nas doses de 60, 180 e 360  $\mu\text{g}$  / 300  $\mu\text{l}$  (s.c. no dorso). O diazepam (Dia) foi administrado nas doses de 2 e 5 mg / Kg. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 animais. Sal = salina.

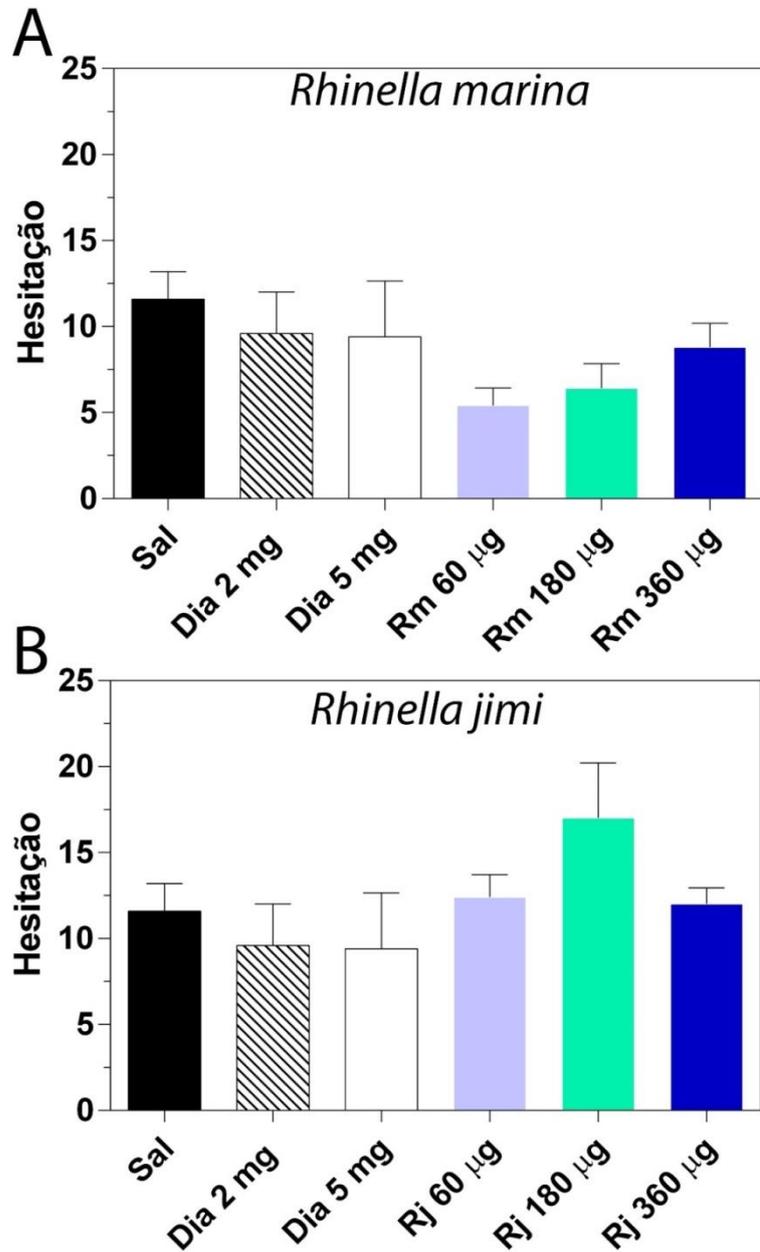
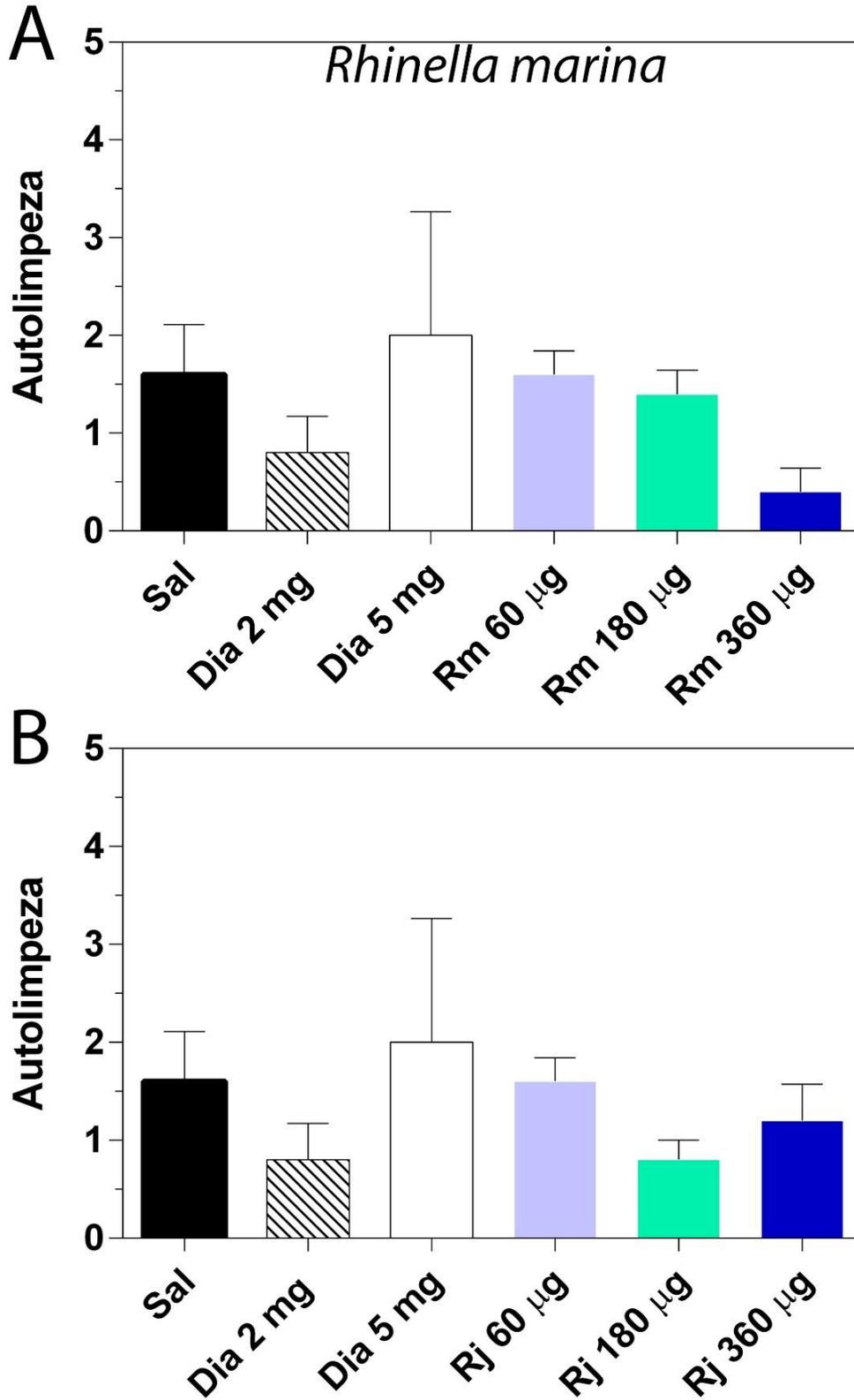


Figura 17 Efeito dos venenos de *Rhinella marina* (A) e de *Rhinella jimi* (B) sobre o nº de comportamentos de autolimpeza exibidos por camundongos expostos ao teste do campo aberto. Os venenos de *Rhinella marina* (Rm) e de *Rhinella jimi* (Rj) foram administrados nas doses de 60, 180 e 360  $\mu\text{g}$  / 300  $\mu\text{l}$  (s.c. no dorso). O diazepam (Dia) foi administrado nas doses de 2 e 5 mg / Kg. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 5 animais. Sal = salina.



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o veneno de *Rhinella marina* e de *Rhinella jimi* atenuam significativamente tanto a 1ª fase (fase neurogênica) quanto a 2ª fase (fase inflamatória) da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de formalina a 1%. Além disso, o efeito antinociceptivo observado dos venenos provavelmente não resultou de sedação ou efeito no sistema motor uma vez que nenhum dos venenos alterou significativamente a atividade locomotora e exploratória no teste do campo aberto. Esses resultados corroboram evidências prévias mostrando que venenos de anuros bufonídeos apresentam atividade antinociceptiva (CARVALHO, 2009; WANG, et al, 1994; ZHANG, et al, 1998). Além disso, o perfil de resposta antinociceptiva do veneno de ambas espécies mostrou similaridade ao perfil observado com o tratamento com paracetamol, o qual também reduziu ambas fases do teste da formalina. O paracetamol é um fármaco anti-inflamatório fraco (HUNSKAAR; HOLE, 1986) e possui discreta ação inibitória sobre a síntese de prostaglandinas (PG) na periferia (FLOWER; VANE, 1972). De fato, drogas analgésicas (de ação central) e anti-inflamatórias podem apresentar ações distintas sobre as fases do teste da formalina. Drogas analgésicas como a morfina e o paracetamol atenuam ambas fases do teste da formalina enquanto que drogas anti-inflamatórias como a indometacina, que atuam predominantemente na inibição da ciclooxigenase (COX), tem ação somente sobre a 2ª fase do teste (CHEN, et al, 1995; TJØLSEN et al, 1992; HUNSKAAR; HOLE, 1986). De acordo com Hunskaar e Hole (1986), o efeito antinociceptivo do paracetamol na 1ª fase do teste da formalina deve-se à sua ação sobre a COX-3 no sistema nervoso central que conseqüentemente leva à inibição da síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; FELDBERG; GUPTA, 1999) além de modular o sistema opióide (MAREK; AGHAJANIAN, 1998; RUGGIERI et al., 2008), canabinóide (HÖGESTÄTT, et al. 2005; DANI et al., 2007) e serotoninérgico (PELLISSIER et al., 1996; PINI et al., 1996). Por outro lado, o efeito periférico do paracetamol durante a 2ª fase do teste da formalina pode envolver inibição, mesmo que discreta, da COX-1 e 2 (AMINOSHARIAE; KHAN, 2015). Portanto, os resultados indicam claramente que os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* empregados no estudo produzem efeito antinociceptivo que pode envolver tanto mecanismos centrais quanto periféricos.

Porém, os mecanismos da antinocicepção dos venenos testados no presente estudo somente poderão ser elucidados com futuros estudos adicionais empregando antagonistas farmacológicos dos principais neurotransmissores envolvidos com a modulação central da nocicepção bem como da quantificação dos principais mediadores periféricos da inflamação tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e PGE<sub>2</sub>.

No presente estudo também foi demonstrado que o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina a 1% foi significativamente atenuado pelos venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi*. Ambos venenos não inibiram principalmente a intensidade sem interferir significativamente no desenvolvimento do edema. Além disso, o efeito antiedematogênico (anti-inflamatório) de ambos venenos foi menos intenso em comparação ao da indometacina, a qual atenuou significativamente tanto a intensidade e duração do edema induzido por carragenina. Diversos autores dividem a resposta inflamatória induzida por carragenina em 3 fases distintas, de acordo com o perfil de mediadores inflamatórios liberados ao longo de tempo (DI ROSA et al., 1971). Assim, a primeira fase se desenvolve até 90 minutos após a injeção intraplantar de carragenina e envolve a liberação simultânea de histamina e serotonina, que são mediadores inflamatórios responsáveis pelo aumento inicial da permeabilidade vascular. A segunda fase, que se desenvolve entre 90-150 minutos após a injeção de carragenina, é principalmente mediada pela liberação de cininas, tal como a bradicinina, e está associada com o pico do edema de pata. E a terceira fase, ou fase tardia, que se desenvolve ente 150 e 360 minutos após a injeção de carragenina e é principalmente mediada por PGE<sub>2</sub> (DI ROSA et al., 1971; TEXEIRA et al., 2006). No presente estudo, observou-se que o veneno de *Rhinella marina* atenuou principalmente na 3ª fase enquanto que o veneno *Rhinella jimi* atenuou a partir da 2ª fase de desenvolvimento do edema induzido por carragenina. Portanto, é possível sugerir que o efeito anti-inflamatório do veneno de *Rhinella marina* está associada à interferência da ação de mediadores pró-inflamatórios da 3ª fase, tal como a PGE<sub>2</sub>, enquanto que o efeito anti-inflamatório do veneno de *Rhinella jimi* envolve a interferência de mediadores da 2ª fase, tal como a bradicinina, além da PGE<sub>2</sub>.

O presente estudo também mostrou que o veneno de *Rhinella marina*, mas não o veneno de *Rhinella jimi*, significativamente aumentou o tempo de imobilidade e reduziu o tempo de nado nos animais submetidos ao teste do nado forçado. Este

efeito foi observado nas doses de 180 e 360 µg / 300 µl, mas não na dose de 60 µg / 300 µl. Tal efeito foi oposto ao observado por drogas com ação antidepressiva tal como a sertralina (10 mg/Kg), caracterizado pela diminuição do tempo de imobilidade como demonstrado no presente estudo e em evidências prévias (DETKE et al., 1995). O teste do nado forçado, desenvolvido previamente por Porsolt e colaboradores (1977), caracteriza-se por induzir estresse comportamental, de forma a provocar alteração comportamental típica de imobilidade nos animais após um período de atividade vigorosa e tentativa de fuga (PORSOLT et al., 1977; PORSOLT, 1979). Evidências mostram que substâncias com atividade antidepressiva em humanos, tal como a sertralina, normalmente reduzem significativamente o tempo de imobilidade neste modelo, (PORSOLT et al., 1977; PORSOLT, 1979) por mecanismos que envolvem dessensibilização de auto receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub> (GRAEFF, 1993; GRAEFF et al, 1996). Dessa forma, uma possível hipótese para o efeito observado com o veneno de *Rhinella marina* seria o aumento da expressão de auto receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub>, o que explicaria o aumento no tempo de imobilidade. Além disso, Noda e colaboradores (2000) associaram o efeito de drogas que potencializam a imobilidade no teste do nado forçado, tal como a fenciclidina (PCP), ao desenvolvimento de sintomas negativos da esquizofrenia. Além disso, esses autores mostraram que o aumento da imobilidade induzido pelo PCP no teste do nado forçado é bloqueado pela clozapina, risperidona e olanzapina, que são fármacos antagonistas de receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos. Outra possibilidade seria de que veneno de *Rhinella marina* ative mecanismos indutores de sono (GARG et al, 2007) o que potencializaria a imobilidade resultante de exposição a situações de estresse inescapável como ocorre no teste do nado forçado. No entanto, o efeito potencializador da imobilidade do nado induzido pelo veneno de *Rhinella marina* aparentemente não de efeito sedativo já que, como previamente relatado, a atividade locomotora e exploratória não foi significativamente alterada nos animais tratados com este veneno.

Por fim, no presente estudo mostrou-se que o pré-tratamento com os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* não alteram significativamente a atividade locomotora e os comportamentos associados ao nível de ansiedade no teste do campo aberto, quando comparados com o grupo controle tratado com salina. A

ausência de efeito sobre a atividade locomotora reforça a proposição de que os efeitos antinociceptivos e alterações no teste do nado forçado não estão associados à efeitos sedativos ou de prejuízo locomotor, tal como é observado com o diazepam, uma droga da classe dos benzodiazepínicos, quando utilizado na dose de 5 mg/Kg. Evidências mostram que o diazepam em doses acima de 5 mg / Kg, o produz significativa sedação (CRAWLEY; DAVIS, 1982), corroborando com os resultados do presente estudo. Por outro lado, o diazepam administrada na dose de 2 mg / Kg, uma dose considerada ter com alto efeito ansiolítico e baixo efeito sedativo, não alterou a atividade exploratória, comportamento de hesitação e de autolimpeza, a qual são considerados parâmetros indicadores de grau de ansiedade (BROWN et al., 1999; CHOLERIS et al, 2001). Ao contrário dos nossos resultados, evidências mostram que na dose de 2 mg / Kg o diazepam induz significativa hiperlocomoção, a qual é considerada um aumento da atividade exploratória e ansiedade reduzida (KASH et al., 1999; SHIMADA et al., 1995). Estas inconsistências detectadas podem estar relacionadas à sensibilidade da linhagem de camundongo empregada em nosso estudo. De acordo com Crawley e colaboradores (1997), diferentes linhagens, inclusive variações de camundongos suíços, possuem graus de respostas quando expostos ao teste do campo aberto, o que poderia implicar em respostas diferentes aos ansiolíticos. Além disso, o teste do campo aberto pode apresentar menor sensibilidade para detectar efeitos ansiolíticos quando comparados a outros modelos como o teste do labirinto em cruz elevado, um modelo reconhecido pela sua sensibilidade à tais efeitos (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGNI, 2000). Outra provável explicação para tais incoerências pode estar relacionada às condições ambientais tal como ruído externo, nível de iluminação ambiental e intensidade e tipo de manipulação prévia feita pelos cuidadores do biotério que forneceu os animais para o estudo. Nesse sentido, com base nas informações apresentadas e com base nos resultados do estudo não é possível concluir satisfatoriamente que os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* não possuem efeito sobre o nível de ansiedade, principalmente pelo fato de não termos tido efeitos adequados com o diazepam, empregado como controle positivo de fármaco ansiolítico. Portanto, será necessário empregar modelos experimentais mais sensíveis na detecção de efeitos sobre o nível de ansiedade, tal como o teste do

labirinto em cruz elevado, além de garantir que fatores ambientais sejam melhores controlados.

É importante destacar que o presente estudo teve caráter preliminar e uma de suas principais limitações está na utilização de venenos na sua forma bruta. A composição química complexa dos venenos de bufonídeos levanta a possibilidade de diversos candidatos aos efeitos biológicos observados no estudo tornando-se necessário o isolamento e caracterização química para a completa elucidação das características farmacodinâmicas e farmacocinéticas das moléculas ativas do veneno. Estudos indicam que o veneno de *Rhinella marina* é composto principalmente por 2 grupos de substâncias: aminas biogênicas (bufotenina, dehidrobufotenina, N-metil-serotonina e serotonina) e bufadienolídeos esteroides (marinobufagina, telocinobufagina, bufanina, helebregenina e resinobufagina) (FERREIRA, et al, 2013; MAILHO-FONTANA, et al, 2013). Já o veneno de *Rhinella jimi* parece ser composto principalmente por telocinobufagina, helebregenina e outros componentes esteroidais (TEMPONE et al., 2008; VITOR, 2009). No entanto, é consenso que os anuros bufonídeos compartilham grande parte de sua composição química entre suas espécies, diferenciando principalmente na concentração de seus constituintes químicos em decorrência de fatores como hábitos alimentares e características ambientais onde vivem (FLIER et al, 1980; MA et al., 2009; YANG et al., 2015; SCHWARTZ et al, 2007, CLARKE, 1997). Portanto, é possível que o efeito biológico dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* decorra de substâncias semelhantes, diferindo apenas na sua concentração. Em conclusão, conjunto de resultados contribuem para o avanço na fronteira do conhecimento sobre os efeitos biológicos desencadeados por veneno de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* e sinalizam para potencialidade de exploração biotecnológica.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que:

- Os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* possuem atividade antinociceptiva no teste da formalina a 1%;
- Os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* possuem atividade anti-inflamatória no teste da carragenina a 1%;
- Os venenos de *Rhinella marina*, mas não de *Rhinella jimi*, potencializa a duração da imobilidade comportamental no teste do nado forçado;
- Os venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* não alteram a atividade locomotora e não alteram os comportamentos associados ao nível de ansiedade quando avaliada no teste do campo aberto.

## REFERÊNCIAS

- ABOLS, I.A.; BASBAUM, A.I. Afferent connections of the rostral medulla of the cat: a neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of pain. **J Comp Neurol**. 201(2):285-97, 1981.
- AKAIKE, A.; SHIBATA, T.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Analgesia induced by microinjection of morphine into, and electrical stimulation of, the nucleus reticularis paragigantocellularis of rat medulla oblongata. **Neuropharmacology**. 17(9):775-8, 1978.
- ALBE-FESSARD, D.; BERKLEY, K.J.; KRUGER, L.; RALSTON, H.J. 3rd; WILLIS, W.D.Jr. Diencephalic mechanisms of pain sensation. **Brain Res Rev**. 9:217-296, 1985
- AMINOSHARIAE, A.; KHAN, A. Acetaminophen: old drug, new issues. **J Endod**. 41(5): 588-93, 2015.
- AMMONS, W.S. Electrophysiological characteristics of primate spinothalamic neurons with renal and somatic inputs. **J Neurophysiol**. 61: 1121–1130, 1989a.
- AMMONS, W.S. Responses of primate spinothalamic tract neurons to renal pelvic distension. **J Neurophysiol**. 62:778–788, 1989b.
- ANDRADE, L.H.S.G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev Psiq Clin**. 25 (6):285-290, 1998.
- ANDREW, D.; CRAIG, A.D. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. **Nat Neurosci**. 4:9–10, 2001a.
- ANDREW, D.; CRAIG, A.D.: Spinothalamic lamina I neurons selectively responsive to cutaneous warming in the cat. **J Physiol**. 537:489– 495, 2001b.
- ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM V-TR**. Porto Alegre: Artmed. 2014.
- AZAMI, J.; LLEWELYN, M.B.; ROBERTS, M.H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**. 12(3):229-46, 1982.
- BADIO, B.; DALY, J.W. Epibatidine, a potent analgesic and nicotinic agonist. **Mol Phamacol**. 45(4):563-9, 1994.
- BAHLS, S–C. Aspectos clínicos da depressão em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, 78(5):359-366, 2002.
- BAHLS, S-C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação**, Curitiba, 3:49 -60, 1999.

BARROS, de V, H. Estudo do possível efeito de alcaloides obtidos a partir da secreção cutânea de *Rhinella jimi* e *Rhinella icterica* na penetração do vírus da raiva em células de mamífero mediado pelo receptor nicotínico de acetilcolina. **Dissertação**. São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan, 2013.

BATISTA, C.V.F.et, al. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS Letters**. 49(4):85-89, 2001.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**.15(2):74-80, 1994.

BESSON, J.M. et al. Physiologie de la nociception. **J Physiol**. 78:7-107, 1982.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol Biochem Behav**. 67(2):225-32, 2000.

BOWERY, N.G. Historical perspective and emergence of the GABAB receptor. **Adv Pharmacol**. 58:1–18, 2010.

BROCCARDO, M. et al. Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin. **J Pharmacol**. 73(3):625-31, 1981.

BROWN, R.E.; COREY, S.C.; MOORE, A.K. Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. **Behavior Genetics**. 26:263-271.1999.

BURSTEIN, R.; POTREBIC, S. Retrograde labeling of neurons in the spinal cord that project directly to the amygdala or the orbital cortex in the rat. **J Comp Neurol**. 335:469-485, 1993.

CALIL, H.M.; MIRANDA, A.M.A. Transtornos depressivos. In: Rotinas em Psiquiatria. Porto Alegre, **Artes Médicas**, 140-52, 1995.

CALVINO, B; GRILO, R.M. Central pain control. **Joint Bone Spine** .73(1):10-6, 2006.

CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**. 41(5): 588-93, 2013.

CARVALHO, I. F. Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri*. **Dissertação** (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2009.

CHEN, Y.F.; TSAI, H.Y.; WU, T.S. Anti-inflammatory and analgesic activity from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Medica**. 61:2–8, 1995.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev.** 25(3):235-60, 2001.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol Rev Camb Philos Soc.** 72(3):365-79, 1997.

COELHO, C.F. Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. **Tese.** São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2009.

CRAIG, A.D. Spinal distribution of ascending lamina I axons anterogradely labeled with phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat. **J Comp Neurol.** 313:377-393, 1991.

CRAIG, A.D.; KROUT, K.; ANDREW, D. Quantitative responses characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. **J Neurophysiol.** 86:1459-1480, 2001.

CRAWLEY, J.N, et al. Behavioral phenotypes of inbred strains of mice . **Psychopharmacology** 132 : 107 – 124 .1997.

CRAWLEY, J.N.; DAVIS, L.G. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. **Brain Res Bull.** 8(6): 609-12, 1982.

CRYAN, J. F. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** [S.l.], v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CUNHA-FILHO, G.A. et al. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated a major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, 45:777-782, 2005.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia.** 20(7):398-9, 1964.

DANI, M.; GUINDON, J.; LAMBERT, C.; BEAULIEU P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. **Eur J Pharmacol.** 573(1-3):214-5, 2007.

DAPSON, R.W. Histochemistry of mucus in the skin of the frog *Rana pipiens*. **Anat Rec.**166(4): 615-625, 1970.

DAS, M. et al A sleep inducing factor from common Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. **Toxicon.** 38(9):1267-81, 2000.

DA-SILVA, A,T.P. Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator extraído da secreção cutânea de *Rhinella jimi* (Amphibia – Anura). **Dissertação.**

Ceará. Universidade Estadual do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 2009.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol.** 5:305-315, 1991.

DESALLES, A.A. et al. Pain suppression induced by electrical stimulation of the pontine parabrachial region. Experimental study in cat. **J Neurosur.** 67:397-407, 1985.

DETKE, M.J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: The effects of water depth. **Behav Brain Res.** 73: 43–46.1995.

DI ROSA M.; GIROUD J.P.; WILLOUGHBY D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol.** 104(1) 15-29, 1971.

DI ROSA M.; PAPADIMITRIOU J.M.; WILLOUGHBY D.A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol.** 105:239–256, 1971b.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J Pharm Pharmacol.** 24(2): 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens of anti-inflammatory drugs. **J Pharm. Pharmacol.** 23(4):.297-8, 1971.

DICKENSON, A.H.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. **Brain Res.** 170(1):95-111, 1979.

DOCHERTY J.P. Barriers to the diagnosis of depression in primary care. **J Clinical Psychiatry.** 58(1): 5-10, 1998.

DOODY, J.S. et al. Indirect impacts of invasive cane toads (*Bufo marinus*) on nest predation in pig-nosed turtles (*Carettochelys insculpta*). **Wildl Res.** 33(5):349-354, 2006.

DOYLE, J. et al. Amphibian peptides that inhibit neuronal nitric oxide synthase. Isolation of lesuerin from the skin secretion of the Australian Stony Creek frog *Litoria lesueuri*. **Eur J Biochem.** 269(1):100-9, 2002.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. The biology of amphibians. New York: **MacGraw – Hill**, 1996.

ELKAN, E. Ground substance: anuran defence against desiccation. In: LOFTS, B. Physiology of the Amphibia. New York: **Academic Press**, 1976.

ERSPAMER V. Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. **Annu Rev Pharmacol.** 11:327-50, 1971.

FELDBERG, W.; GUPTA, K. Pyrogen fever and prostaglandin-like activity in cerebrospinal fluid. **J Physiol.** 228(1):41-53, 1973.

FELDBERG, W.; GUPTA, K. Pyrogen fever and prostaglandin-like activity in cerebrospinal fluid. **J Physiol.** 228(1):41-53, 1973.

FERREIRA, P. M, et al. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon.** 72:43–51, 2013.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain. In: Wall, P.D., Melzack, R. (Eds.), **Textbook of Pain.** 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 309-329, 1999.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; CLANTON, C.H.; ANDERSON, S.D. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. **Brain Res.** 126(3):441-53, 1977.

FLIER, J.; EDWARDS, M. W.; DALY, J. W.; MYERS, C. W. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. **Science.** 208(4443): 503-505, 1980.

FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). **Nature, New Biol.,** 240,41041 1.1972.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Version 5.6 (9 January 2013).

GARG, A. et al. Toad skin-secretions: potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds. **The internet Journal of Pharmacology.** 5(2), 2007.

GARRETT, C.M.; BOYER, D.M. *Bufo marinus* (Cane Toad). Predation. **Herpetol Rev.** 24:148, 1993.

GIESLER, G.J.JR. et al. Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. **J Neurophysiol.** 46(6):1285-308, 1981.

GIESLER, G.J.JR.; MENETREY, D.; BASBAUM, I. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the cat. **J Comp Neurol.** 184:107-126, 1979.

GIUNTINI, P.B. Avaliação do estado de ansiedade em pacientes submetidos a cirurgias eletivas sob regime ambulatorial ou sob regime de internação. **Tese.** Ribeirão Preto: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP, 2006. 96p

GOMES, A. et al. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian J Exp Biol.** 45(7):579-93, 2007.

GRAEFF, F.G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav.** 54:129–141, 1996.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Rev Neurosc.** 44:181- 211, 1993.

GRANGER, D.N; KUBES, P.J. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Leukob Biol.** 55(5): 662-675, 1994.

GRIFFITHS, A.D.; MCKAY, J.L. Cane toads reduce the abundance and site occupancy of Merten's water monitor (*Varanus mertensi*). **J Wildl Res.** 34(8):609-615, 2007.

GUECK, T.; SEIDEL, A.; FUHRMANN, H. Consequences of eicosapentanoic acid (n-3) and arachidonic acid (n-6) supplementation on mast cell mediators. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, 88: 259-265, 2004.

HABERMEHL, G. Venomous animals and their toxins. **New York: Springer Verlag**, 1981.

HAEFELY, W.E. The GABA a – benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. In: BURROWS, G.D.; ROTH, R. NOYES JR: Handbook of anxiety, vol 3: The Neurology of anxiety. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, pp 165-188, 1990.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **J Comp Psychol.** 18(3):385-403, 1934.

HAMMOND, D.L.; YAKSH, T.L. Peripheral and central pathways in pain. **Pharmac Ther.** 14:459-475, 1981.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria.** 82(5):206-212, 2006.

HOBBS, S.F.; CHANDLER, M.J.; BOLSER, D.C.; FOREMAN, R.D. Segmental organization of visceral and somatic input onto C3-T6 spinothalamic tract cells of the monkey. **J Neurophysiol.** 68:1575–1588, 1992.

HÖGESTÄTT, E.D. et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **J Biol Chem.** 280(36):31405-12, 2005.

HONG-YUE, M. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of Liu-Shen-Wan and its individual fractions. **J Ethnopharmacology** .12(1):108-14, 2007.

HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J.E.; RUTKIN, B. Chronic thalamic stimulation for the control of facial anesthesia dolorosa. **Arch Neurol.** 29(3):158-61, 1973.

HUNSKAAR S.; BERGE O. G.; HOLE K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, 25, 125–132.1986.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**. 30:103-104, 1987.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M.; JORDÃO, A.E.; SILVA, J.R.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M.T. Parotoid macroglans in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**. 54(3):197-207, 2009.

JASMIN, L.; BURKEY, A.R.; CARD, J.P.; BASBAUM, A.I. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid in the rat. **J Neurosci**. 17:3751-3765, 1997.

JULIUS D; BASBAUM A,L. Molecular mechanisms of nociception . **Nature**. 413:203-210. 2001.

KAPLAN H.I.; SADOCK B.J. Comprehensive textbook of psychiatry. New York: **Lippincot Williams and Wilkins**, 2005.

KASH, S.F.; TECOTT, L.H.; HODGE, C.; BAEKKESKOV, S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 96 (4): 1698–1703. 1999.

KENSHALO, D.R.JR; LEONARD, R.B.; CHUNG, J.M.; WILLIS, W.D. Responses of primate spinothalamic neurons to graded and to repeated noxious heat stimuli. **J Neurophysiol**. 42(5): 1370-89, 1979.

KEOMANY, S. et al. Toad Poisoning in Laos. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 77(5): 850–853.2007.

KERR, F.W.; LIPPMAN, H.H. The primate spinothalamic tract as demonstrated by anterolateral cordotomy and mottomisural myelotomy. In: BONICA, J.J. **Advances in Neurology**. New York: **Reaven**, 4:147-156, 1974.

KUMAR, R.; CLERMONT, G.; VODOVOTZ, Y.; CHOW, C.C. The dynamics of acute inflammation. **Journal of Theoretical Biology**. 230:145-155, 2004.

LADER, M. Benzodiazepines revisited – will we ever learn? **Addiction**. 106(12):2086–2109, 2011.

LAFER, B.; VALLADA FILHO, H. P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 21(1):18-23, 1999.

LETNIC, M.; WEBB, J. K.; SHINE, R. Invasive cane toads (*Bufo marinus*) cause mass mortality of freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) in tropical Australia. **Biol Conserv**.141(7):1773-1782, 2008.

LI, L.F; LU, J.; LI, X.M.; XU, C.L.; YANG, J.; QU, R.; MA, S.P. Antidepressant-like effects of the saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang in a rat unpredictable chronic mild stress model. **Fitoterapia**. 83(1):93-103, 2012.

LIEBERMAN, J.A. History of the Use of Antidepressants in Primary Care. Primary care companion. **Journal of Clinical Psychiatry**.5:6-10, 2003.

LIMA, A. et al. Guia de Sapos da Reserva Adolpho Ducke - Amazônia Central. Editora Attema, INPA, Manaus, 168p, 2006.

LO T,N; ALMEIDA A.P; BEAVEN M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther** 221: 261-267. 1982.

LOESER J.D; MELZACK R. Pain: an overview. *The Lancet* 1999. Vol 353: 1607-1609.

LUENGO, M.L. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2(2):64-72, 2005.

LYNN, R.B. Mechanisms of esophageal pain. *Am. J. Med.* 27;92(5A):11S-19S, 1992.

LYTTLE, T., GOLDSTEIN, D.; GARTZ, J. Bufo toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. **J Psychoactive Drugs**. 28(3): 267-90, 1996.

MA, X.C, et al. Simultaneous quantification of seven major bufadienolides in three traditional Chinese medicinal preparations of chansu by HPLC-DAD. **Nat Prod Commun**. Feb;4(2):179-84.2009.

MACKENZIE, J.W. Daycase anaesthesia and anxiety. A study of anxiety profiles amongst patients attending a Day Bad Unit. **Anaesth Oxford**. 44(5): 437-440, 1989.

MAILHO-FONTANA, P, L, et al. Passive and active defense in toads: The parotoide macroglands in *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus*. Published online XX Month Year in **Wiley Online Library** (wileyonlinelibrary.com).

MAREK, G.; AGHAJANIAN, G.K. 5-Hydroxytryptamine- induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by [mu]-opiate receptor activation. **Neuroscience**. 86(2):485–97, 1998.

MAYER, D.J.; PRICE, D.D. Central nervous system mechanism of analgesia. **Pain**. 379-404, 1976.

MAYER, D.J.; WOLF, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J.C. Analgesia from electric stimulation in the brain stem of the rat. **Science**. 174:1351-1354, 1971.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454(7203):428-35, 2008.

MERSKEY H, BOGDUK N. Classification of chronic pain. 2nd ed. Seattle: **IASP Press**, 1994.

MERSKEY, H.; BOGDUK N. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In **H. Merskey & N. Bogduk (Eds.)**, Classification of chronic pain, IASP task force on taxonomy (2nd ed., pp. 209-214). Seattle, WA: IASP Press, 1994.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. IASP Task Force on Taxonomy: Classification of Chronic Pain: Description of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms. 2ed. Seattle: IASP Press, 1994.

MESQUITA, J.R.D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W. S. de.; SILVA, N. P. da.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W de M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, p. 66 - 81, 20. 2008.

MIKAIL, H.G et al. Sertraline behavioral response associates closer and dose-dependently with cortical rather than hippocampal serotonergic activity in the rat forced swim stress. **Physiol Behav.**Sep 10;107(2):201-6.2012.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol.** 66(6):355-474, 2002.

MILLAN, M.J. Multiple opioid systems and pain. **Pain.** 27(3):303-47, 1986.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology.** 57(1):1-164, 1999.

MILNE, R.J.; FOREMAN, R.D.; GIESLER, G.J. JR; WILLIS, W.D. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. **Pain.** 11(2):163-83, 1981.

MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R.; PIANI, S.; GOZZINI, L.; ERSPAMER V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. **Int J Pept Protein Res.** 17(3):275-83, 1981.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol.** 225:115-21. 2003

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não esteroidais e sua farmacologia local. **Lacta Fisiart.** 16(4): 186-190. 2009.

MUTH-SELBACH, U.S.; TEGEDER, I.; BRUNE, K.; GEISLINGER, G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. **Anesthesiology.** 91(1):231-9, 1999.

NEERATI, P. Detection of antidiabetic activity by crude paratoid gland secretions from common Indian toad (*bufo melano stictus*). **J Nat Sc Biol Med.**6:429-33, 2015.

NEGRI, L.; MELCHIORRI, P.; LATTANZI, R. Pharmacology of amphibian opiate peptides. **Peptides**, 21(11): 1639-47, 2000.

NEMEROFF, C.B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. **J Psychiatry.** 68(8): 17-25, 2007.

NEWMAN, H.M.; STEVENS, R.T.; APKARIAN, A.V. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord

and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat. **J Comp Neurol.** 365:640-685, 1996.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. The human nervous system: structure and function. In: Pain and temperature, **Williams & Wilkins** (eds), 1996.

NODA, Y.; KAMEI, H.; MAMIYA, T.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA T. Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. **Neuropsychopharmacology.** Oct;23(4):375-87.2000.

OLIVEIRA, D, A.P.; GOMES, L.; OLIVEIRA, R.F. Prevalência de Depressão em Idosos que Frequentam Centros de Convivência. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo. 4(40):734-736, 2006.

PELLISSIER, T. et al. Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors: in vivo and in vitro evidence. **J Pharmacol Exp Ther.** 278(1):8-14, 1996.

PERITO, M.E.S.; FORTUNATO, J.J. Marcadores biológicos da depressão: Uma revisão sobre a expressão de fatores neutrófilos. **Neurocienc.** 20(4):597-603, 2012. **Pharmacol Biochem Behav.** Oct;67(2):225-32.2000.

PINEAU, X.; ROMANOFF, C. Envenomation of domestic carnivorous. **Rec Med Vet.** 171:182–192, 1995.

PINI, L.A.; SANDRINI, M.; VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur J Pharmacol.** 308(11):31-40, 1996.

PINTO, E.G. et al. Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura). **Rev Inst Adolfo Lutz** (Impr.), São Paulo, 68(3), 2009.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **Eur J Pharmacol.** 57:201–210, 1979.

PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.** 266(5604):730- 32, 1977.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of south American toad Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined analyses. **Zool. J. Linn. Soc,** v. 146, n. 3, p. 407-452, 2006.

PROUDFIT, H.K.; ANDERSON, E.G. Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. **Brain Res.** 98(3):612-18, 1975.

PROUDFIT, H.K.; ANDERSON, E.G. New long latency bulbospinal evoked potentials blocked by serotonin antagonists. **Brain Res.** 65(3):542-6, 1974.

PROUDIFT, H.K. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. **Prog Brain Res.** 77:357-370, 1988.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; CASTELLANO, C.; FILIBECK, U.; OLIVERIO, A.; MELCHIORRI, P. Behavioural data on dermorphins in mice. **Eur J Pharmacol.** 82(3-4):223-7, 1982.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. **Advance Access Publication.** 5:181-186, 2007.

RETALLACK, G.J. Woodland hypothesis for Devonian tetrapod evolution. **J Geol.** 119(3):235-258, 2011.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.** 96(3):414-95, 1952.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science.** 164:444-445, 1969.

ROBERTS, M.H.T.; REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. **Pain.** 25(1):83-93, 1986.

RONALDS, C.; CREED, F.; STONE, K.; WEBB, S.; TOMENSON, B. Outcome of anxiety and depressive disorders in primary care. **Br J Psychiatry.** 171:427-23, 1997.

ROST, K.; ZHANG, M.; FORTNEY, J.; SMITH, J.; COYNE, J.; SMITH, G.R.Jr. Persistently poor outcomes of undetected major depression in primary care. **Gen Hops Psychiatry.** 20-1, 1998.

RUGGIERI, V.; VITALE, G.; PINI, L.A.; SANDRINI, M. Differential involvement of opioidergic and serotonergic systems in the antinociceptive activity of N-arachidonoyl-phenolamine (AM404) in the rat: comparison with paracetamol. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 377(3):219-29, 2008.

SAKATE, M., LUCAS DE OLIVEIRA, P.C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **J Venom Anim Toxins.** 6:1–9, 2000.

SCHWARTZ, C.A.; CASTRO, M.S.; JÚNIOR, O.R.P.; MACIEL, N.M.; SCHWARTZ, E.N.F.; SEBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E (Eds). *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, p. 146-168, 2007.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, A.G.; GARCIA, P.C.A.; GRANT, T.; HADDAD, C.F.B; LAGONE, J. Brazilian amphibians – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2014.

SERHAN, C. N. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem.* **Cell Biol.** 122, 305–321, 2004.

SHERA, F.K.; LAURENCE, H.T.; CLYED, H.; STEINUNN, B. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Pro Natl Acad Sci.** 96(4): 1698-1703, 1999.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.**18:385-405, 2004.

SHIMADA, T.; MATSUMOTO, K.; OSANAI, M.; MATSUDA, H.; TERASAWA, K.; WATANABE, H. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. **Gen Pharmacol.** 26(1):205-10, 1995.

SIEGEL, P.; WEPSIC, J.G. Alteration of nociception by stimulation of cerebellar structures in the monkey. **Physiol. Behav.** 13(2):189-94, 1974.

SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. **Adv Pharmacol.** 54:231–263, 2006.

SILVA, F.T. Alterações psicológicas e fisiológicas em voluntários saudáveis submetidos à situação ansiogênica do “Vídeo-recorded Stroop color-word test”: efeitos do diazepam. **Tese.** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 223p. 2001.

SONNE, L., et al. Intoxicação por veneno de sapo em um canino. **Cienc Rural.** 38:1787-1789, 2008.

SPANDE, T.F.; GARRAFFO, H.M.; YEH, H.J.; OPU, Q.L.; PANNELL, L.K.; DALY, J.W. A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. **J Nat Prod.** 55(6):707-22, 1992.

SURMEIER, D.J.; HONDA, C.N.; WILLIS, W.D. Responses of primate spinothalamic neurons to noxious thermal stimulation of glabrous and hairy skin. **J Neurophysiol.** 56(2):328-50, 1986a.

SURMEIER, D.J.; HONDA, C.N.; WILLIS, W.D. Temporal features of the responses of primate spinothalamic neurons to noxious thermal stimulation of hairy and glabrous skin. **J Neurophysiol.** 56(2):351-69, 1986b.

TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; DE ANDRADE, H.F.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon.** 52:13–21, 2008.

TILLEY, S.L.; COFFMAN, T.M.; KOLLER, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **Journal of Clinical Investigation.**108:15-23, 2001.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** 51:5-17, 1992.

TOLEDO, R. C;JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** 105A, 593-608, 1993.

TOLEDO, R.C.; JARED C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp Biochem Physiol.** 111, 1–29, 1995.

TRAUB, R.J. The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. **Pain.** 67(1):151-61, 1996.

VITAL BRAZIL, O.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno de batrachios do gênero Bufo. **Braz Med.** 2:175–180, 1925.

VITOR, O.A. Atividade antinociceptiva de um componente biativo presente em veneno de sapo *Rhinella jimi* sobre dor neuropática experimental. **Dissertação.** Fortaleza. Universidade Estadual do Ceara, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde; 2009.

WALL, P.D. The role of substantia gelatinosa as a gate control. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.**58:205-31. 1980.

WANG, D.B.I.Z. Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway. **Tumor Biology.** 35(5):4885–4890, 2014.

WANG, G, et al. The application of tradicional chinese medicine to the management of hepatic cancerous pain. **J Tradit Chin Med.** 14:132-138, 1994.

WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain.** 40:229-238, 1990.

WIERTELAK, E.P.; FURNESS, L.E, WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA-nitric oxide cascade. **Brain Revs** 664(1-2):9-16, 1994.

WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 308(1136):253-70, 1985.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol.** 14(1):2-31, 1997.

WILLIS, W.D.; ZHANG, X.; HONDA, C.N.; GIESLER, J.R. Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. **Pain.** 92:267–276, 2001.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology,** 3, 1-16. 1984.

WINTER C,A.; RISLEY E; NUSS G,M. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol** 111: 544-547.1962

XU, W.; LUO, H.; ZHANG, Y.; SHAN, L.; LI, H.; YANG, M.; LIU, R.; ZHANG, W. Simultaneous determination of five main active bufadienolides of Chan Su in rat

plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. 859:157–163, 2007.

YAKSH, T.L.; HAMMOND, D.L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmission of nociceptive transmission. **Pain**. 13:1-85, 1982.

YANG, S.; YANG, F.; WEI, N.; HONG, J.; LI, B.; LUO, L.; RONG, M.; YAROV-YAROVY, V.; ZHENG, J.; WANG, K.; et al. A pain-inducing centipede toxin targets the heat activation machinery of nociceptor TRPV1. **Nat Commun**, 2015.

YE, M.; QU, G.; GUO, H.; GUO, D. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure–activity relationships. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 91, p. 87–98, 2004.

YEH, J.Y.; HUANG, W.J.; KAN, S.F.; WANG, P.S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**. 54(2):112–124 2003.

ZANG, W.; LIU, Y.; C.; GAO, E.; BAO, W. Research on the active analgesic, componente of venenum bufonis. *J Shenyang Pharmaceutical University*. 15:268-271, 1998.

ZANGEN A; OVERSTREET D.H; YADID G.High serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in limbic brain regions in a rat model of depression: Normalization by chronic antidepressant treatment. **J Neurochem** 69: 2477–2483. 1997.

ZUG, G.R. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. California: **Academic Press**, 1993.

## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto (protocolo 2014/09) intitulado “Padronização do teste da formalina, teste da carragenina, teste de campo aberto e teste do nado forçado em camundongos *swiss webster*”. Ressalto que o protocolo 2014/09 também contempla o projeto “Avaliação do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, ansiolítico e antidepressivo do veneno bruto de *Rhinella marina*, *Rhinella schneideri* e *Rhinella fernandezae* em camundongos *swiss webster*”, sob a responsabilidade do Dr. Quintino Moura Dias Júnior está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), em 21 de novembro de 2014.

This is to certify that the work (protocol 2014/09) entitled “Standardization of the formalin, carrageenan, open field and forced swim tests in swiss Webster mice”. This protocol also includes the project “Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory, anxiolytic and antidepressive effect of the *Rhinella marina*, *Rhinella schneideri* and *Rhinella fernandezae* crude venoms’ in *swiss webster* mice” by Dr. Quintino Moura Dias Júnior is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimental and was approved by Ethic Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Rondônia Foundation (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), November 21, 2014.

Porto Velho, 21 de novembro de 2014.

Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)  
Dr. Andreimar M. Soares  
Ms. Luiz Herman Soares Gil  
Dr. Roberto Nicoletti  
Ms. André de Abreu Rangel Aguirre  
Felipe Stegun

*Juliana Pavan Zuliani*  
*Felipe Stegun*