



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Igor dos Santos Coelho

**EFEITO TERAPÊUTICO DO GALATO DE ETILA NA
NOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA E INDUZIDA POR
ALGÓGENOS EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis

2 Igor dos Santos Coelho

**EFEITO TERAPÊUTICO DO GALATO DE ETILA NA
NOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA E INDUZIDA POR
ALGÓGENOS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Igor dos Santos

Efeito terapêutico do galato de etila na nocicepção neuropática e induzida por algógenos em camundongos / Igor dos Santos Coelho ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos - Florianópolis, SC, 2014. 91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

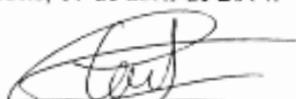
1. Neurociências. 2. galato de etila. 3. dor neuropática. 4. glutamato. 5. canais TRPA1/TRPV1. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

IGOR DOS SANTOS COELHO

**“EFEITO TERAPÊUTICO DO GALATO DE ETILA NA
NOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA E INDUZIDA POR
ALGÓGENOS EM CAMUNDONGOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 17 de abril de 2014.

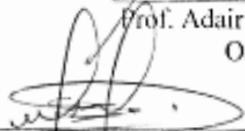


Prof. Rodrigo Bány Leal
Coordenador do Curso

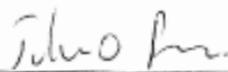
Banca Examinadora:



Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC



Prof. Eduardo M. Dalmarco
Membro – UFSC



Prof. Juliano Ferreira
Membro - UFSC



Prof. Manuella P. Kaster
Membro - UFSC



Prof. Morgana D. da Silva
Membro externo à UFSC

AGRADECIMENTOS

Aos animais de laboratório utilizados neste trabalho, os quais espero ter sido respeitoso o suficiente com suas vidas.

Ao professor Adair, que manteve as portas abertas para mim, pela confiança, orientação e suporte para a realização deste trabalho e pela paciência, “eu sei que sou um pouco enrolado”. A professora Cláudia Beatriz Nedel de Aguiar, embora as coisas não tenham corrido como planejado, agradeço pela confiança dada. Muito obrigado!

Aos amigos, colegas, camaradas e outros, Aos da primeira passagem Kelson, Flávia Carla, Ney Bala (Francisney), Vini (Vinicius Gadotti), Vanessa Emmel. Aos da primeira e segunda passagem Ana Paula Luiz e Fernanda Lapa. Aos da segunda passagem Kataaaa (Catharina), Gaudi (Fábio), Deisinha (Deise), Raiozinho de sol moreno (Marina), Serginho, Murilo, Bob (Franciane), Preta (Stella), Rafa (Rafaela), Bruno, Róli, Dani Loka (Daniela Dal Secco), Josiel, a minha “filha” Tátilla e tantos outros que tive a oportunidade de trabalhar. Agradeço por todo apoio técnico, intelectual e criativo, também pela confiança quando convidado a discutir, integrar ou apenas opinar sobre ideias e projetos. Todos os dias de trabalho foram alegradores por estarem lá, desejo muitas alegrias a todos. Muito obrigado!

Aos professores do programa e aos demais professores da fisiologia que sempre foram receptivos e instrutivos quando procurados.

Ao Nivaldinho (Nivaldo Manoel Vicente), que ao lado de Carlos Drummond de Andrade é funcionário público exemplar, pela amizade, eficiência e apoio em todos os momentos. Ao Sr. Carlos, outro exemplo de trabalho e dignidade, pelos cafés, proza e amizade. Dois exemplos de trabalho e dedicação em tempos onde isto parece não ser a regra, obrigado!

Ao povo brasileiro, CAPES, CNPq e UFSC, pelo apoio financeiro.

“O não poder contradizer prova uma incapacidade, não uma ‘verdade’”.

Friederich Nietzsche

RESUMO

O galato de etila (GE) é um composto fenólico encontrado em um grande número de espécies de plantas, como por exemplo: *Phyllanthus urinaria*, *Pistacia integerrima*, *Lagerstroemia speciosa*; e possui diversos efeitos biológicos comprovados em estudos “in vivo” e “in vitro”. O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo do GE na dor crônica de origem neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI), além de investigar os mecanismos de ação subjacentes a este efeito em camundongos. O GE (10 e 100 mg/kg), administrado intragastricamente (i.g.), foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica (avaliada através do filamento de von Frey) e térmica ao frio (avaliada através do teste da acetona) induzida pela LPNI. Além disso, o GE (100 mg/kg, i.g.) também reduziu as concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na medula espinal dos animais submetidos à LPNI. O GE (100 mg/kg, i.g.) causou uma redução significativa da resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de agonistas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA, AMPA e cainato, agonista de receptor de potencial transitório do tipo TRPA1 e TRPV1 e da citocina IL1- β , não tendo efeito sobre o agonista receptor metabotrópico de glutamato (trans-ACPD) e a citocina TNF- α . Ademais, a antinocicepção promovida pelo GE (100 mg/kg, i.g.) foi bloqueada pela administração de glibenclamida (2 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Em síntese, o presente trabalho demonstrou que o GE apresenta um importante efeito antinociceptivo em modelos de dor aguda e crônica, em particular na dor neuropática. O seu efeito parece envolver a redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, o bloqueio de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e de receptores de potencial transitório (TRPV1 e TRPA1); bem como a ativação de K_{ATP} . Assim, este estudo agrega novas evidências científicas e fornece subsídios para a continuidade dos estudos com o GE, visando confirmar seu potencial terapêutico para o tratamento de dores crônicas.

Palavras-chave: galato de etila, dor neuropática, TRPV1, TRPA1, glutamato; canais de potássio sensíveis ao ATP; citocinas.

ABSTRACT

Ethyl gallate (EG) is a phenolic compound generally found in a large number of plant species, such as *Phyllanthus urinaria*, *Pistacia integerrima* and *Lagerstroemia speciosa*, having many biological effects proven by *in vivo* and *in vitro* studies. The main objective of this study was to evaluate the antinociceptive effect of EG in chronic neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation (PSNL), as well as to investigate the mechanisms underlying this effect in mice. EG (10-100 mg/kg), administered intragastrically (i.g.), was able to reduce mechanical (evaluated with von Frey filament) and cold (evaluated with acetone) thermal hyperalgesia induced by PSNL. Furthermore, EG (100 mg/kg, i.g.) was also able to reduce concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α proinflammatory cytokines in the spinal cord of animals that had undergone PSNL. Also, EG (100 mg/kg, i.g.) significantly inhibited the nociception induced by intrathecal injection of a NMDA, AMPA and kainate glutamatergic ionotropic receptors agonist, as well as TRPA1 and TRPV1 transient receptor potential channels and IL-1 β cytokine. However, EG was unable to inhibit the nociception induced by intrathecal injection of metabotropic glutamate receptor agonist (trans-ACPD) and TNF- α cytokine. Moreover, the antinociception promoted by EG (100 mg/kg, ig) was blocked by the administration of glibenclamide (2 mg / kg, ip), which is a blocker of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. In summary, the present study demonstrated that GE has significant antinociceptive effect in models of acute and chronic pain, especially neuropathic pain. Its mechanism of action appears to involve the reduction in concentrations of proinflammatory cytokines and the blockade of ionotropic glutamate receptors (NMDA, AMPA and kainate) and TRPV1 and TRPA1 transient potential receptors, as well as the activation of K_{ATP}. Thus, this study adds new scientific evidences and provides subsidies for further studies with EG, confirming its therapeutic potential for the treatment of chronic pain.

Keywords: Ethyl gallate, neuropathic pain, TRPV1, TRPA1, glutamate; ATP-sensitive potassium channels; cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho de Descartes, R. (1644). Conceito da via da dor.....	20
Figura 2 – Diferentes neurônios nociceptivos transmitem diferentes tipos de estímulos.....	24
Figura 3 – Conexões entre as fibras aferentes primárias e a medula espinal.....	25
Figura 4 – Estrutura molecular do galato de etila.	35
Figura 5 – Ligadura parcial do nervo isquiático	44
Figura 6 – Plataforma para avaliações de hiperalgesia mecânica.	45
Figura 7 – Esquema cronológico de avaliações LPNI.....	45
Figura 8 – Injeção intratecal e comportamento avaliado.....	47
Figura 9 – Efeito do GE sobre a hiperalgesia mecânica.	51
Figura 10 – Efeito do GE sobre a hiperalgesia térmica (frio).	53
Figura 11 – Efeito do tratamento com galato de etila sobre as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	55
Figura 12 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por IL-1 β e TNF- α	56
Figura 13 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por NMDA, AMPA, cainato e trans-ACPD.....	57
Figura 14 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.	58
Figura 15 – Efeito da glibenclamida sobre a antinocicepção induzida pelo GE.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP – trifosfato de adenosina
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CDME – corno dorsal da medula espinal
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
GRD – gânglio da raiz dorsal
E.P.M. – erro padrão da média
ERK – cinase regulada por sinais extracelulares
ERO – espécie reativa de oxigênio
GE – galato de etila
GABA – ácido γ -aminobutírico
Gi – proteínas G inibitórias
Glu – glutamato
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 β – interleucina-1 beta
IL-6 – interleucina-6
i.g. – intragástrica
i.t. – intratecal
KA – cainato
LPNI – ligadura parcial do nervo isquiático
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
mGLURs – receptores metabotrópicos para o glutamato
NGF – Fator de crescimento neural
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
PKA – proteína cinase A
PKC – proteína cinase C
SNC – sistema nervoso central
SNP – sistema nervoso periférico
SP – substância P
TNF- α – fator de necrose tumoral- α
trans-ACPD – (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-ácido dicarboxílico
TRPA1 – receptor de potencial transitório anquirina-1
TRPM8 – receptor de potencial transitório melastina-8
TRPs – receptores de potencial transitório
TRPV1 – receptor de potencial transiente vanilóide-1
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	NOCICEPÇÃO	22
1.2	CLASSIFICAÇÃO DA DOR	26
1.3	DOR NOCICEPTIVA	27
1.4	DOR NEUROPÁTICA	27
1.5	CANAIS DE POTÁSSIO	33
1.6	CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS À ATP (KATP)	33
1.7	GALATO DE ETILA	35
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.1.1	Objetivos específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	ANIMAIS	42
4.2	NEUROPATIA INDUZIDA PELA LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO (LPNI)	42
4.3	MENSURAÇÃO DA HIPERALGESIA AO ESTÍMULO MECÂNICO	44
4.4	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO	45
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS	46
4.6	NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS	46
4.7	NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	48
4.8	NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO	48
4.9	PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NO EFEITO DO GE	49
4.10	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES	49
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	EFEITO DO GE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA LPNI	50
5.2	EFEITO DO GE NA HIPERALGESIA AO FRIO INDUZIDA PELA LPNI	52
5.3	EFEITO DO GE SOBRE AS CONCENTRAÇÕES ESPINAIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	54

5.4	EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	56
5.5	EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS	56
5.6	EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO	57
5.7	ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO GE	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	70
8	PERSPECTIVAS	72
9	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A palavra "dor" e seus sinônimos geralmente se referem a experiências conscientes associadas a ferimentos ou doença, mas também é utilizada para descrever um desconforto relacionado a outras sensações desagradáveis. Estas circunstâncias são as bases de uma discussão de longa data a respeito de como pensar sobre a dor e seus mecanismos. Vários modelos teóricos foram propostos para explicar a base fisiológica da dor, embora nenhuma ainda responda completamente todos os aspectos envolvidos na percepção da dor (MOAYEDI; DAVIS, 2013).

De acordo com Perl (2007), Aristóteles (384-322 a.C.), reconhecia a dor como importante para a "disposição" e argumentava que esta seria uma emoção; séculos depois, Galeno (130-201 d.C.) reconhecendo o cérebro como o órgão dos sentidos colocou a dor na esfera das sensações. Outro nome importante no entendimento sobre a dor foi Avicena (980-1037 d.C.) o qual percebeu que em doentes a dor poderia ser dissociada de outras sensações como o tato e temperatura e propôs que a dor poderia ser uma sensação independente.

Como citado acima, muitos conceitos foram apresentados ao longo dos séculos, mas os maiores avanços ocorreram a partir do século 19, e o acúmulo de conhecimento no campo da Neuroanatomia e Neurofisiologia deram suporte para as teorias vindouras, entre elas a teoria da especificidade, teoria da intensidade, teoria do padrão e por último a teoria do portão da dor (para revisão ver PERL, 2007; MOAYEDI; DAVIS, 2013).

Figura 1 – Desenho de Descartes, R. (1644). Conceito da via da dor.



Fonte: Melzack e Wall (1965).

Apesar de muito trabalho e avanço desde que estas ideias foram lançadas, questões fundamentais ainda estão em debate. Neste sentido, Craig (2003) faz a seguinte colocação “a dor resulta a partir de elementos neurais específicos (teoria da especificidade) ou por uma atividade padronizada dentro de um subsistema somatossensorial convergente (teoria do padrão)”. Por outro lado, Basbaum (2011) levanta o questionamento em relação às teorias da especificidade e do padrão, em que dá ênfase a diferença entre a codificação periférica do estímulo nociceptivo e o processamento e percepção da dor pelo sistema nervoso central (SNC). Assim, ele concorda que o primeiro explica-se perfeitamente com a teoria da especificidade. Entretanto em relação aos neurônios de segunda e terceira ordem no SNC há ainda falta de respostas de como efetivamente ocorre o processamento e percepção da dor.

Paralelamente às discussões citadas acima, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Este conceito foi baseado na definição multidimensional proposta por Melzack e Casey (1968), que inclui as dimensões sensorio-discriminativa (intensidade, localização, duração, qualidade), afetivo-motivacional (desconforto e a resposta associada) e cognitivo-avaliativa (apreciação, valores culturais, contexto e estado cognitivo) (para revisão ver TREEDE et al., 1999).

De acordo com Loeser (1980), a dor possui quatro componentes básicos: a nocicepção, a percepção da dor, o sofrimento ou desconforto e o comportamento associado. Quanto aos comportamentos associados à dor, de fato, Loeser e Melzack (1999) comentam que estes são inerentes à percepção da dor e a intensidade do desconforto, e são expressos tanto por ações evidentes (ex. lambear a pata, em animais) quanto pelo deixar de realizar uma ação (ex. hipolocomoção), assim pode-se inferir que os comportamentos estereotipados expressam de fato a existência da nocicepção, da dor e do sofrimento.

Neste sentido têm surgido outras possibilidades e formas de avaliar a dor que podem superar esta visão monocromática em relação aos modelos animais de dor, onde podem ser avaliados outros comportamentos em animais experimentais, o

que de certa forma poderia oferecer uma melhor extrapolação dos resultados (MOGIL, 2009; LANGFORD et al., 2010).

Os diferentes modelos animais utilizados para investigar a dor, frequentemente abordam apenas a nocicepção (componente sensorial), portanto considerados modelos de nocicepção (para revisão ver MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; LAMOTTE; SHIMADA; SIKAND, 2011). Neste sentido, Le Bars; Gozariu; Cadden (2001) descrevem os testes comportamentais usados para estudar a nocicepção como testes com sistema de “entrada-saída” onde o experimentador deve decodificar o significado das respostas observadas, para isso é importante ao descrever os modelos também especificar as características da entrada (o estímulo aplicado) e da saída (a reação do animal). Estes testes são amplamente utilizados e são importantes ferramentas para o estudo dos mecanismos da dor bem como para trabalhos que busquem novos tratamentos para o seu alívio.

1.1 NOCICEPÇÃO

A fim de responder de forma eficaz às situações de perigo ou potencialmente perigosas, é imprescindível que saibamos exatamente a natureza desta ameaça e a sua localização, e são exatamente estas informações que os nociceptores codificam. A existência deste receptor sensorial foi proposta em 1906 pelo fisiologista Sherrington, que a partir da definição de estímulo adequado para a dor, postulou a existência de nociceptores que detectariam lesões nos tecidos ou estímulos potencialmente lesivos, antecipando evidências experimentais diretas por várias décadas (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990).

De acordo com a IASP, o nociceptor é um receptor sensorial capaz de realizar a transdução e codificação de estímulos nocivos e ainda diferencia-se do termo neurônio nociceptivo, que seria um neurônio periférico ou central capaz de codificar um estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). Já a nocicepção é o termo neurofisiológico para processo de codificação e processamento de estímulos nocivos pelo sistema neural (LOESER; TREEDE, 2008), os quais representam a primeira linha de defesa contra potenciais ameaças.

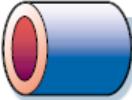
Os nociceptores são capazes de identificar formas muito específicas de estímulos nocivos, que de acordo com a IASP se

refere a um evento lesivo real ou potencial aos tecidos, transduzido e codificado pelos nociceptores (LOESER; TREEDE, 2008). Estímulos nocivos podem ser de natureza térmica, química ou mecânica. Contudo, interessantemente os nociceptores possuem a propriedade de codificar de modo específico cada um destes estímulos, desta forma, demonstrando a variedade de nociceptores envolvidos em vários tipos de dor (TREEDE; MEYER; CAMPBELL, 1998; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Esta característica segundo Julius; Basbaum (2001), não é uma resposta primitiva inespecífica às lesões de tecidos, em vez disto é mediada por vias de transdução de sinais especializadas, localizadas no terminal nociceptivo presente nos tecidos. Como exemplo, temos os receptores da família TRP onde o TRPV1 um membro desta são ativados por estímulos de calor moderado, baixo pH tecidual e por mediadores endógenos (ex. anandamida entre outros) e por substâncias irritantes presente na pimenta vermelha (ex. capsaicina) que pertencem a classe química denominada de vanilóides.

As fibras sensoriais possuem tanto um ramo axonal periférico, inervando tecidos periféricos, quanto um ramo axonal central, fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem na medula espinal (BASBAUM et al., 2009), e são classificadas em três grupos, com base em critérios anatômicos e funcionais (Figura 2). As fibras do tipo A α e A β , mielinizadas e de maior diâmetro (6 – 20 μ m), são responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos inócuos, estando relacionadas ao tato e propriocepção, enquanto as fibras do tipo A δ e C estão relacionadas à detecção de estímulos nocivos e à nocicepção.

Figura 2 – Diferentes neurônios nociceptivos transmitem diferentes tipos de estímulos.

	Limiar Térmico
 <p>Fibras Aα e Aβ</p> <p>Mielinizadas Grande diâmetro Propriocepção, Tato</p>	xxxxx
 <p>Fibras Aδ</p> <p>Pouco mielinizada Diâmetro intermediário Nociceptiva (mecânica, térmica, química)</p>	<p>~ 53 °C Tipo I</p> <p>~ 43 °C Tipo II</p>
 <p>Fibras C</p> <p>não-Mielinizadas Pequeno diâmetro Temperatura inócua, prurido Nociceptiva (mecânica, térmica, química)</p>	~ 43 °C

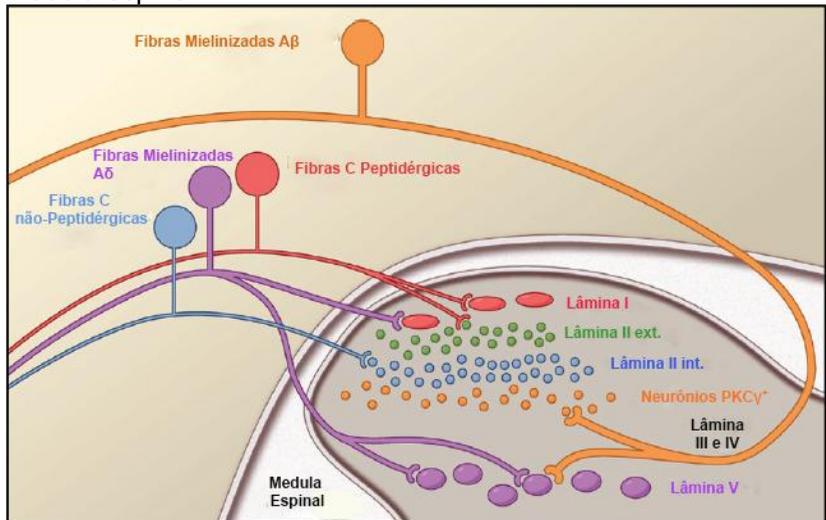
Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

As fibras Aδ possuem diâmetro médio (1 – 5 μm), são mielinizadas e responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos, térmicos e químicos associados à dor aguda. São ainda subdividas em Tipo I, as quais respondem tanto a estímulos químicos quanto mecânicos, com limiar de ativação térmico elevado (>50°C), e Tipo II, as quais apresentam menor limiar de ativação térmico (<43°C), porém elevado limiar de ativação mecânica. Já as fibras do tipo C, de pequeno diâmetro (0,2 – 1.5 μm) e não mielinizadas, estas também são responsivas tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, porém apresentam uma menor velocidade de condução e estão associadas à dor secundária, lenta e difusa, geralmente associada a quadros de dor crônica (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009). Além da diferenciação anatômica, estas fibras também diferem na expressão de

receptores e de canais iônicos, o que confere certa especificidade aos neurônios nociceptivos a determinados estímulos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias (ou neurônios aferentes primários) projetam-se ao corno dorsal da medula espinal (CDME) de maneira específica e organizada. O CDME possui uma organização laminar, sendo que cada lâmina é distinta anatômica e funcionalmente. As fibras nociceptivas (A δ e C) inserem-se nas camadas mais superficiais (lâminas I e II) e no caso das fibras A δ , também na lâmina V, enquanto as fibras responsáveis primariamente pelo tato e propriocepção (fibras A β) inserem-se nas lâminas III – V, mais profundas (Figura 3) (BASBAUM et al., 2009).

Figura 3 – Conexões entre as fibras aferentes primárias e a medula espinal.



Existe uma organização laminar muito precisa no corno dorsal da medula espinal; subconjuntos de fibras aferentes primárias atingem neurônios espinais dentro de lâminas distintas. Fonte: Adaptado de Basbaum et. al. (2009).

A parte mais interna da lâmina II, onde se inserem as fibras C não-peptidérgicas, é caracterizada pela presença de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma gama da proteína cinase C (PKC), envolvida na dor persistente induzida

por lesões periféricas de origem inflamatória ou neuropática (MALMBERG et al., 1997). Corroborando com essa divisão anatômica, estudos eletrofisiológicos demonstram que os neurônios espinais localizados nas lâminas I e II geralmente são responsivos a estímulos nocivos (via fibras A δ e C), enquanto neurônios localizados nas lâminas III e IV são primariamente responsivos a estímulos inócuos (via fibras A β). Já os neurônios localizados na lâmina V recebem tanto estímulos inócuos quanto estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DA DOR

A dor pode ser classificada de acordo com dois fatores: a duração e a origem. Em relação a sua origem pode ser distinguida como, nociceptiva (estimulação excessiva de nociceptores sem lesão tecidual), dor neurogênica (ativação de nociceptores por mediadores liberados após lesão de tecidos ou pelo próprio neurônio nociceptivo), neuropática (quando a dor tem como origem lesão do sistema somatossensorial) ou psicogênica (quando não possui um fator identificável) (MILLAN, 1999).

Já quando nos referimos a sua duração, basicamente a dor é dividida em aguda ou crônica. Na dor aguda ocorre à ativação dos nociceptores em resposta a um estímulo nociceptivo, não necessariamente com a presença de lesão tecidual. Contudo, na presença de lesão esta não sobrepuja a capacidade regenerativa dos tecidos e a dor pode desaparecer antes mesmo do processo de cicatrização terminar (LOESER; MELZACK, 1999). Relativamente ao tempo não existe um limite preciso, variando de minutos a horas ou semanas (3-6 meses) dependendo da origem causadora da dor (CARR; GOUDAS, 1999; LOESER; MELZACK, 1999). Quando a dor persiste por tempo superior a seis meses passa a ser considerada como uma dor crônica e pode perdurar por anos. A dor crônica frequentemente é considerada sem propósito fisiológico, isto contrasta com a função protetora dos reflexos motores (reflexo de retirada e flexão) e de comportamentos protetores associados a estados dolorosos (LOESER; MELZACK, 1999). Neste contexto a dor é compreendida como uma patologia e deve ser tratada como tal.

1.3 DOR NOCICEPTIVA

A capacidade de detectar os estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência. Isto é demonstrado claramente em indivíduos que sofrem de anomalias congênitas, por exemplo, uma mutação no gene SCN9A, que causa uma perda funcional de canais de sódio Na(v) 1.7 levando a incapacidade de detectar estímulos dolorosos (DIB-HAJJ; YANG; WAXMAN, 2008). Essas pessoas não são capazes de detectar estímulos nociceptivos, assim, estas pessoas não apresentam comportamentos adequados de proteção contra essas condições, onde muitas das quais podem ser fatais (BASBAUM et al., 2009).

A dor nociceptiva é um alarme mediado tanto pelas fibras C não mielinizadas de alto limiar quanto por neurônios sensoriais primários A δ mielinizados os quais conduzem informações para o SNC (WOOLF; MA, 2007). Esses neurônios nociceptivos expressam receptores e canais iônicos como, receptores de potencial transitório (TRP), tornando-os hábeis para responder a estímulos térmicos ou mecânicos intensos, bem como a mediadores químicos exógenos e endógenos (DHAKA; VISWANATH; PATAPOUTIAN, 2006). A dor nociceptiva ocorre em resposta a estímulos nocivos e continua apenas enquanto o estímulo estiver presente, cessando imediatamente ou pouco tempo após este desaparecer.

Entretanto, na presença de lesão persistente, componentes periféricos e centrais responsáveis pela transmissão da dor exibem um incremento na sua plasticidade, levando ao aumento da sinalização intracelular o que resulta no quadro de hipersensibilidade dolorosa. Esta plasticidade por um lado facilita reflexos protetores e pode ser benéfica, mas quando estas mudanças persistem o resultado é uma condição de dor crônica (BASBAUM et al., 2009).

1.4 DOR NEUROPÁTICA

Enquanto que a dor nociceptiva é uma função básica e fundamental do sistema nervoso periférico e central, sinalizando um dano tecidual real ou iminente e assim preservando a integridade do organismo. Por outro lado a dor neuropática, que resulta como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afeta o sistema somatossensorial (SCHOLZ;

WOOLF, 2007; LOESER; TREEDE, 2008; MOGIL, 2009), não possui função biológica protetora, e do ponto de vista clínico constitui-se numa doença com alta prevalência e um alto fardo social e econômico impactando diretamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (HALL et al., 2006; QUINTANS et al., 2013).

Os sintomas comuns da dor neuropática incluem o aparecimento de sinais sensoriais anormais, tais como aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos (hiperalgesia), sensibilidade dolorosa a estímulos normalmente inócuos (alodinia), e dor espontânea (BACKONJA; STACEY, 2004).

Após a lesão axonal de nervos periféricos ocorre degradação da bainha de mielina e perda de neurônios, processo conhecido como degeneração Walleriana. Tal processo resulta da infiltração de macrófagos e outras células do sistema imune (células T e neutrófilos), as quais liberam citocinas pró-inflamatórias como por ex. interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e mediadores inflamatórios (ex. bradicinina, prostaglandinas), além de fatores de crescimento (NGF – fator de crescimento do nervo) no local da lesão (MOALEM; TRACEY, 2006; SCHOLZ; WOOLF, 2007), sendo que estas mudanças são responsáveis pela sensibilização central e periférica e como consequência o surgimento da hiperalgesia e alodinia (SOMMER; KRESS, 2004).

A sensibilização de nociceptores também pode ser mediada pela família dos TRP. Um membro importante desta família é o TRP vanilóide 1 (TRPV1), este é altamente expresso em fibras do tipo C e A δ (LUMPKIN; CATERINA, 2007). Na dor neuropática a sinalização intracelular está alterada, desta forma as vias de segundos mensageiros como o AMP-cíclico (AMP-c), proteínas cinases (PKA, PKC, MAPK) e óxido nítrico (NO) estão relacionadas com a indução e manutenção da dor neuropática (HUCHO; LEVINE, 2007). A sinalização de bradicinina e prostaglandinas envolvem a ativação PKC e PKA, estas por sua vez potencializam a atividade de canais TRPV1 (JULIUS; BASBAUM, 2001), adicionalmente canais TRPV1 tem sua expressão aumentada em modelos de dor neuropática (HONG; WILEY, 2005).

Diversos receptores sensíveis à alteração da temperatura foram identificados e denominados de termosensores e estes pertencem à família de canais TRP. Estes são expressos em

neurônios nociceptivos, como o receptor da subfamília anquirina 1 (TRPA1) e o da subfamília melastatina 8 (TRPM8), e tem sido demonstrado seu envolvimento na patofisiologia da dor neuropática sobretudo na hiperalgesia ao frio (XING et al., 2007; ZURBORG et al., 2007).

De fato, estudos relatam que o estabelecimento da hiperalgesia ao frio, bem como aumento da resposta de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) ao frio em animais neuropáticos é dependente da ativação de receptores TRPA1 (DJOUHRI et al., 2004; OBATA et al., 2005), e ainda, outros trabalhos demonstram também um aumento da expressão dos receptores TRPA1 nestas situações (OBATA et al., 2005; KATSURA et al., 2006). Além disso, o bloqueio desse canal resulta na redução da hiperalgesia ao frio (OBATA et al., 2005).

Do mesmo modo a participação dos TRPM8 tem sido implicada no aumento da sensibilidade ao frio. De fato, estudos demonstraram o aumento da expressão destes receptores em ratos submetidos ao modelo de lesão neural por constrição crônica (CCI), resultado que foi acompanhado pelo surgimento de hiperalgesia ao frio (XING et al., 2007; SU et al., 2011). Por outro lado, a redução da expressão destes canais ou seu bloqueio foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio (XING et al., 2007; SU et al., 2011; PATEL et al., 2014).

A excitabilidade aumentada das fibras do tipo A δ e C resultam em um quadro de dor em pontada e queimação, estes sintomas também são gerados por canais de sódio que são diferencialmente expressos, distribuídos e ativados de forma anormal na dor neuropática (AMIR; MICHAELIS; DEVOR, 1999; TAL; WALL; DEVOR, 1999). De fato, após a lesão de nervos ocorre um aumento da densidade de canais de sódio tanto no local da lesão como ao longo do axônio (WOOLF; MANNION, 1999; SUN et al., 2012).

Os mecanismos celulares e moleculares subjacentes às diversas condições de dor neuropática são complexos e ainda não foram totalmente compreendidos. Contudo, sabe-se que alterações no sistema nervoso periférico e central estão intimamente associadas com a dor neuropática, que incluem o aumento da excitabilidade do neurônio aferente primário (CAMPBELL et al., 1988; MATZNER; DEVOR, 1994) e o aumento da sinalização glutamatérgica nos neurônios do corno dorsal da medula (WANG et al., 2007; ZHANG; CHEN; PAN,

2009). Por outro lado, o aumento da excitabilidade neuronal pode ser decorrente da diminuição na inibição sináptica mediada por ácido γ -aminobutírico e glicina nos neurônios do corno dorsal da medula (COULL et al., 2003; ZHOU et al., 2012).

Todavia, a compreensão da patogênese da dor neuropática avançou para além da sinalização neurônio-neurônio e atualmente tem sido demonstrado o importante papel das células da glia na sua gênese e manutenção (TSUDA; INOUE; SALTER, 2005). Após lesão em nervos é observado que as células microgлияis na medula espinal, passam do estado de repouso para ativado através de alterações fenotípicas e funcionais. Além disto, estas são ativadas por mediadores e sinais neurais, incluindo a substância-P, o NO, NGF, o glutamato, as prostaglandinas (PGs), e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (INOUE et al., 2004; GUO; SCHLUESENER, 2007).

Da mesma forma, tem sido demonstrado que astrócitos também estão envolvidos na manutenção da dor neuropática (KAWASAKI et al., 2008a). Sob condições fisiológicas os astrócitos são importantes na manutenção da homeostasia, através da regulação dos níveis de íons extracelulares, proteínas e neurotransmissores no seu ambiente circundante (MIKA et al., 2013).

Os astrócitos também apresentam mudanças estruturais e funcionais após lesões em nervos, resultando em um estado ativado que induz a produção e liberação de mediadores inflamatórios que podem levar a ativação da proteína cinase (p38 MAPK) que por sua vez pode ativar fatores de transcrição, como o NF κ B (fator nuclear kappa B) que está envolvido na manutenção de dores neuropáticas em modelos animais (MA; BISBY, 1998; INOUE et al., 2004; MIKA et al., 2013). Além disto, estudos demonstram que interferências na ação deste fator de transcrição reduzem os parâmetros nociceptivo da dor neuropática em modelos animais (TEGEDER et al., 2004; SUN et al., 2006; DE MOS et al., 2009).

Assim, astrócitos e microglia agem como possíveis moduladores de dor neuropática através da liberação de um grande número de mediadores inflamatórios (ZHUO; WU; WU, 2011). Em modelos animais de dor neuropática, a microglia ativada aumenta a síntese e secreção de citocinas e quimiocinas,

incluindo a IL-1 β , TNF- α , IL-6, prostaglandina E2 (PGE2) e NO bem como outros mediadores (ZHUO; WU; WU, 2011).

Neste contexto, citocinas pró-inflamatórias parecem estar diretamente relacionadas nas dores de origem neuropática. A IL-6 liberada a partir de células como mastócitos, macrófagos, linfócitos e células gliais tem sua expressão aumentada assim como o seu receptor IL-6R no local da lesão, bem como na medula espinal, particularmente na lâmina superficial do CDME (MA; QUIRION, 2005; AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). Além disto, a sinalização iniciada através da liberação de IL-6 resulta no aumento de BDNF, substância-P e galanina, e assim, pode promover aumento da excitabilidade neuronal (MURPHY et al., 2000; MIKA et al., 2013)

Da mesma maneira a IL-1 β está envolvida na dor neuropática uma vez que sua expressão também se encontra aumentada em neuropatias induzidas após lesões de nervo ou administração de quimioterápico (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002; GAO; YAN; WENG, 2013). Igualmente, o aumento da expressão de TNF- α esta diretamente relacionada à dor de origem neuropática. Estudos utilizando o modelo de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) demonstram aumento dos níveis de TNF- α , no local da lesão nervosa, bem como aumento da expressão temporal desta citocina (GEORGE et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a injeção intra-isquiática de TNF- α em ratos reproduz aumento da sensibilidade dolorosa, similar àquela associada a dor neuropática (SORKIN; DOOM, 2000).

Estudos demonstram que a administração exógena destas citocinas é capaz de causar dor e hiperalgesia (SOMMER; KRESS, 2004; GADOTTI et al., 2012), possivelmente atuando de forma sinérgica (MOALEM; TRACEY, 2006). Como demonstrado por Stellwagen e colaboradores (2005), citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. De fato, é bem estabelecida que a sinalização glutamatérgica inicialmente seja dependente do receptor AMPA, assim a maior densidade deste receptor na membrana celular contribuem para aumentar a força sináptica (LI; ZHUO, 1998; YOUN; GERBER; SATHER, 2013).

Se por um lado vários mecanismos excitatórios tem sua atividade aumentada ou potencializada, portanto facilitando a transmissão da dor e perpetuando o quadro neuropático,

mecanismos chave para o controle da dor se encontram reduzidos. Os neurônios inibitórios possuem papel importante na transmissão da informação da dor no corno dorsal da medula CDME (GU et al., 1996), e evidências indicam que lesões neurais induzem apoptose seletiva de interneurônios inibitórios gabaérgicos (MOORE et al., 2002), assim impondo uma mudança drástica nas conexões desta circuitaria (SCHOLZ et al., 2005).

No mesmo sentido, têm sido demonstrados que receptores opióides tipo μ (MOR) tem sua expressão reduzida nos GRD e CDME seguido de lesão neural periférica no modelo de ligadura do nervo espinal, indicando que a sensibilização poderia decorrer também da redução deste mecanismo de controle da excitação pós lesão (KOHNO et al., 2005). Outro mecanismo alternativo da desinibição medular após lesão nervosa envolve a redução sináptica da expressão do transportador potássio-cloreto KCC2 em neurônios da lâmina I, que altera a homeostasia deste ânion nestes neurônios. A mudança resultante do gradiente de ânion faz com que uma corrente aniônica inibitória passe a ser excitatória. O efeito é que a liberação de GABA pelos interneurônios inibitórios passa a exercer paradoxal ação excitatória sobre os neurônios da lâmina I, aumentando a sensibilização central (COULL et al., 2003).

Outra mudança importante que tem sido encontrada é a redução da expressão de canais de potássio. Estes são essenciais entre outras funções para a manutenção do potencial de membrana. Neste sentido, estudos demonstram uma redução destes canais nos neurônios aferentes primários e no GRD, em animais submetidos ao modelo de axotomia periférica, bem como uma redução da atividade destes canais em animais submetidos ao modelo de ligadura do nervo espinal (KAWANO et al., 2009a; TSANTOULAS et al., 2012). Além disto, foi demonstrado que animais transgênicos que não expressam estes canais apresentam hiperalgesia mecânica (*in vivo*) e hiperexcitabilidade de neurônios do GRD (*in vitro*) (TSANTOULAS et al., 2012). Ainda não são bem conhecidos os mecanismos que levam a estas alterações, porém foi identificado um fator silenciador de transcrição para estes canais, assim como o aumento da expressão destes fatores em modelos *in vitro* e *in vivo* após indução de neuropatia experimental induzida pela ligadura parcial

do nervo isquiático (LPNI) (MUCHA et al., 2010; ROSE et al., 2011).

1.5 CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais de potássio (K^+) são os mais amplamente distribuídos entre todos os tipos de canais iônicos e formam poros que atravessam a membrana celular e são seletivos para os íons (K^+), em mamíferos suas subunidades são codificadas por aproximadamente 80 genes fazendo desta a mais diversa entre todas as famílias de canais iônicos (COETZEE et al., 1999; MALJEVIC; LERCHE, 2013). Além disto, os canais de potássio são expressos basicamente em todos os tecidos e estão envolvidos em várias funções fisiológicas, fundamentalmente na regulação do potencial de membrana e da excitabilidade celular (COETZEE et al., 1999; GONZALEZ et al., 2012).

Os canais de potássio são classificados e agrupados em famílias e subfamílias de acordo com o número de domínio transmembrana de cada uma das subunidades (2TM, 4TM e 6TM ou 7TM), bem como por suas características fisiológicas e farmacológicas (MALJEVIC; LERCHE, 2013). A sua abertura é regulada por um grande número de estímulos, como mudanças na voltagem da membrana, concentração de certos íons (ex. Ca^{2+} , Mg^{2+}), pequenas moléculas orgânicas (ex. poliaminas como a espermidina), e proteínas (ex., proteína G) (COETZEE et al., 1999; GUTMAN et al., 2005). Além disto, os canais de potássio parecem contribuir de forma marcante para o efeito antinociceptivo de muitas drogas. Neste sentido, eles são vistos como potenciais alvos para a investigação de compostos que possam ter efeitos analgésicos.

1.6 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS À ATP (K_{ATP})

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) estão presentes em neurônios sensoriais centrais e periféricos, assim como em muitos outros tecidos, incluindo células da ilhota pancreática, coração, músculo esquelético e músculo liso vascular, onde desempenham papéis fisiológicos fundamentais (VIRGILI et al., 2011; MILSTEIN et al., 2012; ASHCROFT; RORSMAN, 2013).

Os canais de K_{ATP} são formados por 8 sub-unidades, quatro destas são membros da família Kir6.x de canais de potássio retificadores de influxo (Kir6.1 ou Kir6.2), enquanto as outras 4 são receptores de sulfoniluréias (SUR1, SUR2A, SUR2B e SUR2C) (INAGAKI et al., 1995; INAGAKI et al., 1996). Os papéis fisiológicos e fisiopatológicos dos canais K_{ATP} têm sido amplamente estudados na manutenção da homeostasia, no sistema cardiovascular e na regulação do tônus vascular (ZHUO et al., 2005)

Como citado anteriormente estes canais são amplamente expressos em neurônios aferentes tanto periféricos quanto centrais, onde regulam a excitabilidade da membrana e liberação de neurotransmissores, oferecendo uma via de neuroproteção (reduzindo a excitabilidade neuronal) (BABENKO; AGUILAR-BRYAN; BRYAN, 1998; LISS; ROEPER, 2001). Estas funções são também pertinentes para a patogênese da dor neuropática, a qual pode resultar do aumento da excitabilidade de neurônios periféricos (CHI; JIANG; NICOL, 2007).

Já está bem estabelecido que os canais K_{ATP} , estão envolvidos na resposta de muitas drogas com atividade antinociceptiva (OCANA et al., 2004). Estudos demonstram que agonistas de receptores opióides (μ e δ) ativam canais de potássio retificadores de influxo (Kir6.x) por meio da ativação de proteínas $G_{i/o}$ (NORTH, 1989). As proteínas $G_{i/o}$ são capazes de ativar dois diferentes tipos de canais Kir: GIRK (canais de potássio retificadores de influxo regulados por proteína G) (MARK; HERLITZE, 2000) e KATP (WADA et al., 2000). De fato, vários estudos corroboram estes dados mostrando que o efeito antinociceptivo de algumas substâncias (ex. morfina, inosina e o flavonoide miricitrina) é drasticamente reduzido pelo tratamento de animais (camundongos) com a toxina pertussis (toxina que inativa a proteína $G_{i/o}$) em modelos de dor (MEOTTI et al., 2007; MACEDO-JUNIOR et al., 2013).

Especificamente tem sido demonstrado que a glibenclamida (uma sulfoniluréia capaz de bloquear canais K_{ATP}) antagoniza o efeito antinociceptivo de substâncias e drogas que ativam vias de sinalização reconhecidamente capazes de abrir este canal como: morfina (OCANA et al., 1990; MEOTTI et al., 2007; HERVERA et al., 2011), inosina (MACEDO-JUNIOR et al., 2013) e diclofenaco (ORTIZ, 2011), bem como por compostos

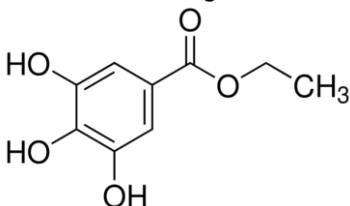
naturais como galato de etila (SANTOS et al., 1999) e cúrcuma (DE PAZ-CAMPOS et al., 2012).

Como apresentado acima, a ativação de canais K_{ATP} é um importante mecanismo envolvido na antinocicepção de muitas drogas e produtos naturais, portanto representam um alvo farmacológico interessante para novos compostos com atividade analgésica.

1.7 GALATO DE ETILA

O galato de etila (GE) (Figura 4) é um composto fenólico encontrado naturalmente em um grande número de espécies de plantas entre as quais se destacam: *Phyllanthus urinaria* (SANTOS et al., 1999), *Pistacia integerrima* (MEHLA et al., 2013), *Lagerstroemia speciosa* (GAO et al., 2010), *Ailanthus altissima* (LOU; TANG; WANG, 2012), *Alchornea trewioides* (QIN et al., 2012), *Hamamelis virginiana* (KOSTALOVA; MISIKOVA; GABOROVA, 2001), *Ampelopsis brevipedunculata* (XU; LIU; XU, 1995), e também no vinho tinto onde são encontrados em abundância compostos fenólicos entre estes os galatos (CLIFFORD et al., 1996).

Figura 4 – Estrutura molecular do galato de etila.



Fonte: o autor (2014).

Dados da literatura têm demonstrado que compostos fenólicos como os galatos possuem diversas propriedades biológicas, como efeito antioxidante (WU et al., 1998; HAWAS, 2007; ZHENG et al., 2009), atividades antiparasitária (CALDERON et al., 2006), anticâncer (SALEEM et al., 2002; KIM et al., 2012), antimicrobiana (SHIBATA et al., 2005), na prevenção de choque séptico (GOTES et al., 2012) e antinociceptivo (CECHINEL FILHO et al., 1996; SANTOS et al., 1999).

Estudos que abordaram o efeito antinociceptivo do GE demonstraram que ele foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pelo ácido acético em camundongos (CECHINEL FILHO et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que o galato de etila também reduziu a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de bradicinina e substância P em ratos, bem como, o comportamento nociceptivo causado pela injeção intraplantar de formalina e capsaicina em camundongos, sendo que este efeito foi observado pela sua administração sistêmica, espinal e supraespinal (SANTOS et al., 1999). Além disso, os mesmos autores também demonstraram que a antinociceção causada pelo GE envolve a ativação de canais de potássio operados por baixa e alta condutância de cálcio, canais de potássio sensíveis ao ATP e ativação da proteína $G_{i/o}$ (SANTOS et al., 1999).

Corroborando os resultados de Santos e colaboradores (1999), foi demonstrado em outro estudo que o GE também foi capaz de promover o relaxamento de traqueia isolada de cobaia (*in vitro*), sendo que esta ação depende da ativação de canais de potássio operados por alta condutância de cálcio e canais de potássio sensíveis ao ATP (PAULINO et al., 1999). Assim, os dados descritos até o momento indicam que o GE possui um importante efeito farmacológico o qual pode ser observado através de diversos estudos (*in vivo* e *in vitro*) e o seu efeito envolve a participação dos canais de potássio, sendo que este efeito parece ser imprescindível para explicar o mecanismo de ação do galato de etila no controle da dor (CECHINEL FILHO et al., 1996; SANTOS et al., 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A dor constitui-se num importante problema de saúde mundial, e permanece como um grande desafio de clínicos e pesquisadores. A dor crônica é um problema de saúde pública que causa desconforto/sofrimento pessoal e social afetando a qualidade de vida do paciente acometido como também dos seus familiares. A dor crônica neuropática pode originar-se a partir de doenças ou lesões que acometam o SNC ou SNP. Além disto, milhares de pessoas em todo o mundo sofrem desta condição crônica, sendo que a falta de tratamento adequado ou a inexistência de um tratamento efetivo pode levar disfunções transitórias ou permanentes e assim compromete a qualidade de vida e o engajamento nas atividades diárias.

De maneira geral, os mecanismos moleculares subjacentes associados à dor neuropática ainda não são completamente entendidos, e como consequência, os tratamentos disponíveis atualmente são muitas vezes insatisfatórios e grande parte deles apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais (WOOLF; MANNION, 1999; MENDELL; SAHENK, 2003). Portanto, ainda há uma grande necessidade de se buscar novas e melhores drogas analgésicas (WANG; WANG, 2003). Nesse contexto, considerando os estudos realizados anteriormente, os quais demonstram a atividade antinociceptiva do GE em modelos animais, e os indícios de que os mecanismos de ação podem envolver alvos associados ao desenvolvimento da dor persistente, torna-se pertinente investigar o possível efeito do GE em modelos de dor crônica de origem neuropática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo do GE na dor neuropática causada pela lesão parcial do nervo isquiático em camundongos, bem como os mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da administração intragástrica (i.g.) do GE sobre a hiperalgesia mecânica e térmica (frio) induzida pela ligação parcial do nervo isquiático;
- Verificar o efeito da administração prolongada do GE sobre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α) na medula espinal em animais submetidos à LPNI;
- Avaliar o efeito do GE sobre a nocicepção induzida por agentes algogênicos (NMDA, cainato, AMPA, Trans-ACPD, IL-1 β e TNF- α , capsaicina e cinamaldeído) administrados pela via intratecal (i.t.) (medula espinal);
- Verificar a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito antinociceptivo induzido pelo GE, no modelo de injeção de NMDA i.t.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss adultos machos com dois a três meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número *PP00745*, e os experimentos foram realizados entre as 8:00 e 17:00 horas.

Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), em micro-isoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1 h e conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito ao tratamento recebido, sendo que estes foram expostos somente a um protocolo experimental.

4.2 NEUROPATIA INDUZIDA PELA LIGAÇÃO PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO (LPNI)

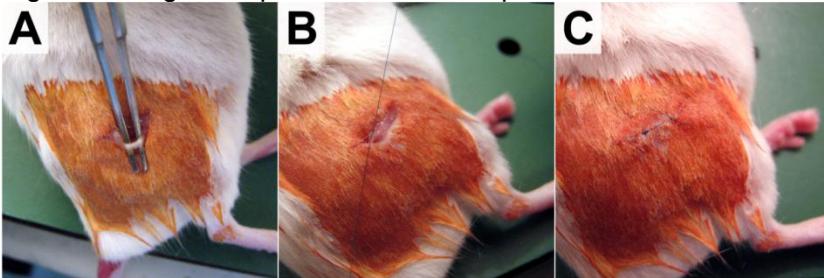
O efeito do galato de etila foi investigado no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI). Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular (1 mL/kg, i.m.) contendo uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e a anestesia foi mantida com isoflurano por via inalatória (2-3% em O_2 100%). Após a verificação do estado de consciência do animal (através da ausência de resposta ao pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área a ser operada (coxa direita). Em seguida, foi realizada uma incisão curvilínea no hemitórax direito do animal,

iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur, terminando próximo à fossa poplíteia, no nível da inserção dos músculos ísquiotibiais (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). A exposição do nervo isquiático foi conseguida pelo afastamento dos músculos semitendinoso e reto femoral. Aproximadamente 1/2 a 1/3 do nervo isquiático foi amarrado com o fio de sutura de polipropileno não absorvível (8-0) (MALMBERG; BASBAUM, 1998). Nos camundongos falso-operados (grupo Sham), o nervo isquiático foi exposto utilizando o mesmo procedimento cirúrgico, mas sem sofrer a ligadura. A incisão da pele foi fechada com fio de sutura de polipropileno (6-0) e realizada a assepsia no local com (Povidine[®] - Iodo) (Figura 5). Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos em uma sala aquecida até a recuperação completa da anestesia. Paralelamente avaliados animais que não passaram por procedimento algum, grupo este denominado “Naive”. A partir do 8º dia após o procedimento cirúrgico os animais foram avaliados quanto ao limiar nociceptivo mecânico e térmico, conforme descrito na figura 7.

Somente os animais que apresentaram hiperalgesia, permaneceram para a sequência dos experimentos. Os grupos experimentais foram então divididos como listado a seguir:

Grupo 1: Naive; Grupo 2: Sham/veículo; Grupo 3: Sham/GE (100 mg/kg); Grupo 4: LPNI/veículo; Grupo 5: LPNI/ GE (10 mg/kg); Grupo 6: LPNI/GE (100 mg/kg). Nas avaliações agudas foi administrada uma única dose do GE ou veículo, já durante o tratamento prolongado foi administrado duas doses diárias de GE ou veículo para os diferentes grupos experimentais como listado anteriormente. Sendo as administrações realizadas às 08:00h (1ª administração) e 17:00h (2ª administração). O período de tratamento prolongado foi de sete dias (10º-16º dias), interrompido por período igual (17º-23º dias) e retomado por mais cinco dias (24º-28º dias). A interrupção do tratamento prolongado teve por objetivo verificar a possibilidade deste em reduzir a hiperalgesia mecânicas e térmicas (frio) decorrente do período de tratamento anterior. Todas as avaliações seguidas dos ensaios de decurso temporal do efeito do GE foram realizadas 1 h após o primeiro tratamento do dia, bem como para os testes de nocicepção aguda.

Figura 5 – Ligadura parcial do nervo isquiático



(A) Exposição do nervo isquiático. (B) Ligadura do nervo isquiático. (C) Sutura da pele. Fonte: o autor (2014).

4.3 MENSURAÇÃO DA HIPERALGESIA AO ESTÍMULO MECÂNICO

A hiperalgesia mecânica foi avaliada conforme descrito anteriormente (BORTALANZA et al., 2002). Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, permitindo acesso à superfície ventral das patas, e a resposta ao estímulo mecânico foi efetuada da seguinte maneira: um filamento de von Frey com carga de 0,6 g (Stoelting, Chicago, IL) foi aplicado perpendicularmente na superfície ventral da pata posterior direita dos animais (região proximal aos dedos, metacarpo), sendo mantido por 3 segundos e a aplicação foi repetida 10 vezes, com intervalo de 1 minuto entre elas (Figura 6). A pressão aplicada foi suficiente para promover a curvatura do filamento utilizado. A resposta foi considerada positiva quando, após o estímulo com o filamento, o animal retirou completamente a pata da grade metálica. O resultado foi expresso como a porcentagem de retirada da pata frente ao estímulo mecânico.

Figura 6 – Plataforma para avaliações de hiperalgesia mecânica.

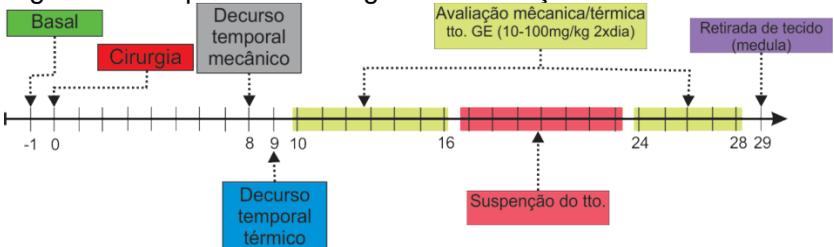


(A) Ilustra plataforma com animais em ambientação. (B) Animal sendo avaliado com filamento de von Frey. Fonte: o autor (2014).

4.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO

A hiperalgesia ao frio foi avaliada conforme o método descrito por (FLATTERS; BENNETT, 2004), com pequenas modificações. Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, permitindo acesso à superfície ventral das patas, e 20 μ L de acetona foi sutilmente aplicado na superfície ventral da pata posterior direita. A resposta comportamental foi avaliada durante 30 s e registrada em escores: 0 – nenhuma resposta; 1 – rápida retirada ou movimento brusco da pata; 2 – retirada prolongada ou agitação repetida da pata; 3 – agitação repetida seguida de lambida da pata. A aplicação de acetona foi repetida três vezes, em intervalos de cinco minutos, e a soma dos escores foi utilizada para as análises estatísticas (CORDOVA et al., 2011).

Figura 7 – Esquema cronológico de avaliações LPNI.



Fonte: O autor (2014).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

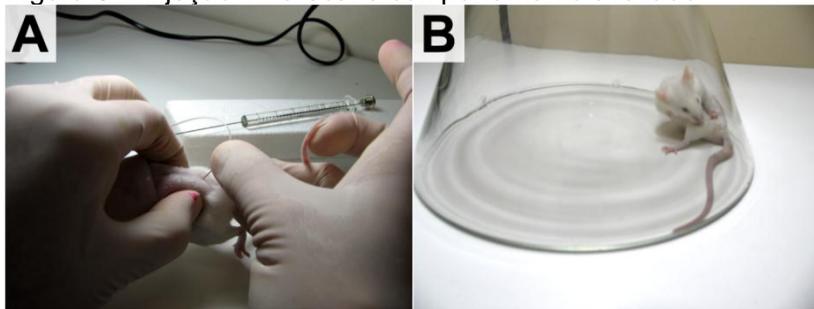
No 29º dia após a cirurgia os animais foram tratados normalmente e após 60 min foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% oxigênio), e seguido da verificação do estado de consciência estes foram sacrificados, sendo coletadas amostras da medula espinal (nível lombar, L1-L6) para posterior determinação da concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . As amostras da medula espinal após removidas foram homogeneizadas com PBS contendo Tween 20 (0.05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (0,1 mM), cloreto de benzometônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), BSA (0,5%), NaCl (0,4 M), PMSF (0,1 mM) e aprotinina 2 (ng/ml). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -80 °C. A concentração das citocinas foi determinada utilizando-se kits específicos de ELISA (R&D Systems; Minneapolis, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os valores obtidos foram estimados através da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido a absorbância no comprimento de onda de 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em leitor de placa de ELISA (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, Alemanha). A concentração de proteínas da amostra foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit). Desta forma todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por miligrama de proteína.

4.6 NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS

A fim de obter informações adicionais sobre o possível envolvimento dos receptores glutamatérgicos no efeito antinociceptivo do GE, realizou-se a administração via i.t. de agonistas de receptores glutamatérgicos, 60 minutos após o tratamento dos animais com GE (100 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.). O procedimento utilizado para a injeção intratecal foi similar ao descrito previamente por Hylden e Wilcox (1980) (Figura 8-A). Previamente os animais foram tricotomizados (2-3 dias anteriores ao dias de teste), além disto, foram ambientados nos funis de vidro por 10 minutos, em seguida retirados e imobilizados manualmente para a realização da injeção

intratecal, para tanto uma agulha de 30G acoplada por uma cânula a uma microseringa de 25 μ l foi inserida através da pele no espaço sub-aracnóide entre as vértebras espinhais L5-L6. A seguir, foi administrado via i.t. 5 μ l de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA, agonista seletivo de receptor glutamatérgico ionotrópico do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), N-metil-D-aspartato (NMDA, agonista seletivo de receptor glutamatérgico ionotrópico do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), cainato (agonista seletivo de receptor glutamatérgico ionotrópico do subtipo cainato, 110 pmol/sítio) ou D-Ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD, agonista seletivo de receptor metabotrópico do grupo I e II, 50 nmol/sítio) (SCHEIDT et al., 2002; GADOTTI et al., 2006). Após a injeção, os camundongos retornaram para os funis de vidro e o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a região posterior do corpo (patas posteriores, cauda, genitálias e abdômen) foi quantificado e considerado como comportamento indicativo de nocicepção durante os respectivos tempos: AMPA (1 min) NMDA (5 min), cainato (4 min) e trans-ACPD (15 min) (URCA; RAIGORODSKY, 1988; BRAMBILLA et al., 1996; BOXALL et al., 1998; SCHEIDT et al., 2002).

Figura 8 – Injeção intratecal e comportamento avaliado



(A) Manuseio para o procedimento de injeção intratecal. (B) Comportamento expresso pelo animal dentro do funil após injeção. Fonte: O autor (2014).

4.7 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

As citocinas IL-1 β e TNF- α contribuem diretamente na modulação da informação nociceptiva relacionada a processos inflamatórios como hiperalgesia e alodinia (FERREIRA et al., 1988; CUNHA; FERREIRA, 2003; COUTAUX et al., 2005). Com o intuito de avaliar o efeito antinociceptivo do GE na nocicepção induzida pela citocinas pró-inflamatórias, realizou-se a administração via i.t. (Figura 8-A) de 5 μ L de IL-1 β (1 pg/sítio) ou TNF- α (0,1 pg/sítio), conforme descrito anteriormente (MEOTTI et al., 2007; GADOTTI et al., 2012). Para isto, os animais foram pré-tratados com GE (100 mg/kg i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), 60 minutos antes da injeção da IL-1 β e do TNF- α . O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado durante 15 min, sendo contabilizado o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a parte posterior do corpo (patas posteriores, cauda, genitálias e abdômen) (Figura 8-B) (SAKURADA, 1996).

4.8 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO

Para avaliar o efeito antinociceptivo do GE na nocicepção induzida por agonistas de receptores de potenciais transitório TRPs, os animais foram tratados com GE (100 mg/kg i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), 60 min antes da injeção i.t. (Figura 8-A) de 5 μ L de capsaicina (ativador de canais TRPV1, 100 pmol/sítio) (SAKURADA et al., 1996) ou cinamaldeído (ativador de canais TRPA1, 30 pmol/sítio). A injeção i.t. dos agonistas TRPs foi realizada como descrito anteriormente (MEOTTI et al., 2007; GADOTTI et al., 2012). O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado durante 5 min para a capsaicina e 30 min para o cinamaldeído, sendo contabilizado o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a parte posterior do corpo (patas posteriores, cauda, genitália e abdômen) (Figura 8-B) (SAKURADA et al., 1996). A concentração e o tempo de avaliação do experimento realizado com o cinamaldeído foram obtidos através de curva de doses realizada pelo grupo (NUCCI, 2014).

4.9 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NO EFEITO DO GE

Para avaliar a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP, os animais foram pré-tratados com o bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP glibenclamida (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), 15 minutos antes da administração do GE (100 mg/kg i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g) (SANTOS et al., 2005). A resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA (450 pmol/sítio) foi avaliada 60 min após o tratamento com o GE ou veículo, como anteriormente descrito no item 4.6.

4.10 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: galato de etila (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), ácido caínico (cainato), ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazol propiônico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), capsaicina e glibenclamida (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, EUA), Interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (R&D Systems, Minneapolis, MN), cinamaldeído, xilazina, cetamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), isoflurano (Cristália, SP, Brasil). Todas as substâncias foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl), exceto a capsaicina (diluída em solução salina e DMSO) e o galato de etila (diluído em solução salina e Tween 80). A concentração final de DMSO e Tween não excedeu 5%.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média (E.P.M). As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas pelo teste *t* de Student ou por meio de análise de variância de (ANOVA) de uma ou duas vias quando apropriado seguida do teste *post-hoc* para múltiplas comparações de Bonferroni ou Student Newman-Keuls. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

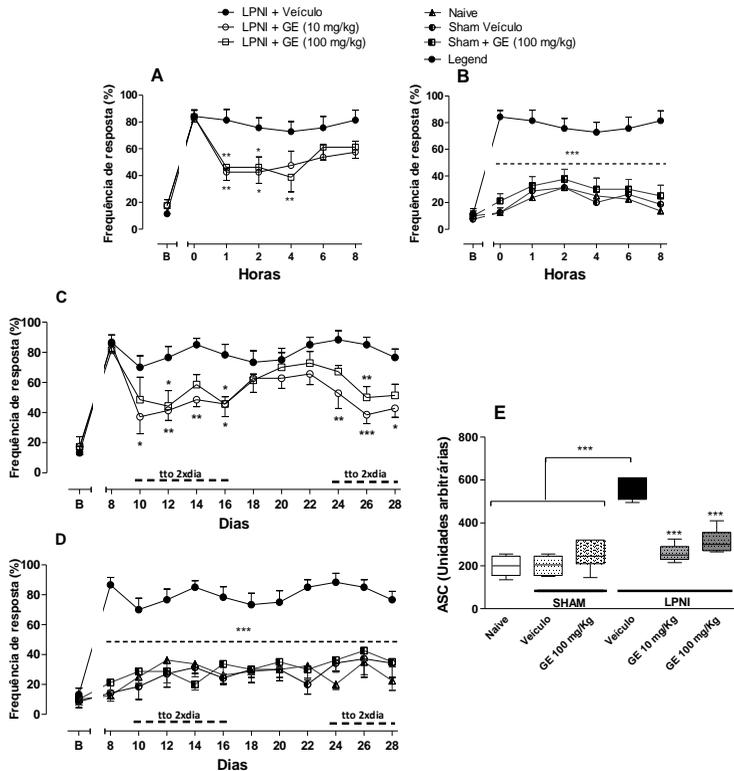
5.1 EFEITO DO GE NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA LPNI.

A hiperalgesia mecânica foi avaliada por meio de filamentos de von Frey, iniciando-se no oitavo dia após a LPNI e estendendo-se até o 28º dia pós-operatório. Conforme ilustrado na figura 9 (B e D), a LPNI induziu o aumento do comportamento nociceptivo quando comparado aos grupos controle naive e sham. Já o tratamento com ambas as doses de GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) foi capaz de reduzir de maneira significativamente a resposta nociceptiva por até quatro horas após o tratamento quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (Fig. 9A). A dose de 10 mg/kg do GE foi eficaz até duas horas com inibições de $89\pm 12\%$ a 100%, enquanto a dose de 100 mg/kg foi efetiva até quatro horas com inibições de $70\pm 18\%$ a 100% (Fig. 9A).

Os resultados apresentados na figura 9 C mostram que a administração diária (duas vezes ao dia) de GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. A dose de 10 mg/kg do GE foi efetiva ao longo do período de tratamento avaliado com inibições de $52\pm 15\%$ a $92\pm 12\%$, enquanto a dose de 100 mg/kg teve inibições de $63\pm 9\%$ a $80\pm 26\%$. Com o objetivo de verificar se o tratamento prolongado com GE teria efeito em reduzir a hiperalgesia em relação aos animais tratados com veículo o tratamento foi interrompido, entretanto como visto na figura 9 C, a hiperalgesia mecânica foi novamente observada nos animais até então tratados, sendo que ela foi reduzida novamente quando o tratamento foi restaurado, no 24º dia, com uma resposta semelhante à observado anteriormente e se manteve até o final do ensaio 28º dia (Fig. 9 C).

O cálculo da área sob a curva (Fig. 9 E) representa somente os dias de tratamento das figuras 9 (C e D), excluindo o período em que este foi suspenso. Esta análise revelou que os grupos LPNI que receberam as doses de 10 e 100 mg/kg do GE diferiram significativamente do grupo LPNI que recebeu apenas veículo.

Figura 9 – Efeito do GE sobre a hiperalgesia mecânica.



Efeito do tratamento com GE na hiperalgesia mecânica induzida pela LPNI em camundongos. No painel A, observa-se o decurso temporal do efeito da administração (aguda) do GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) no 8º dia pós-cirurgia na hiperalgesia mecânica. No painel C, observa-se o efeito do tratamento prolongado com o GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) 2 vezes ao dia do 10º-16º e 24º-28º dias pós-cirurgia. O painel E representa a área sob a curva (ASC) dos grupos experimentais representados no painel C e D. A letra B, representa a resposta de frequência de retina anterior a cirurgia. Cada grupo experimental foi composto por 7-9 animais, cada ponto representa a média e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo LPNI + Veiculo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo LPNI + veiculo. A significância estatística foi determinada por análise de variância de duas vias (medidas repetidas) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A ASC foi analisada por ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

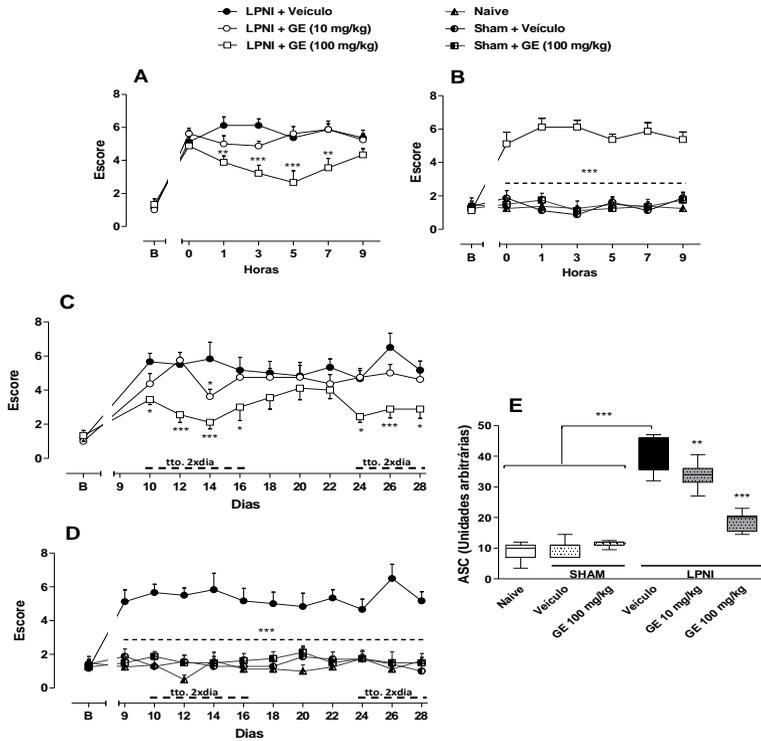
5.2 EFEITO DO GE NA HIPERALGESIA AO FRIO INDUZIDA PELA LPNI

A hiperalgisia térmica ao frio foi avaliada utilizando a aplicação da acetona (20 μ L) iniciando-se no 9º dia após a LPNI e estendendo-se até o 28º dia pós-operatório. Conforme ilustrado na figura 10 (B e D), a LPNI induziu o aumento do comportamento nociceptivo quando comparado aos grupos controle naïve e sham. O tratamento com GE (100 mg/kg, i.g.) foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva por até sete horas quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo, com inibições de $55\pm 11\%$ a $77\pm 18\%$, respectivamente (Fig.10 A).

Os resultados apresentados na figura 10 (C) demonstram que a administração diária (duas vezes ao dia) de GE (100 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a hiperalgisia ao frio induzida pela LPNI quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. As inibições observadas ao longo de todo período avaliado foram de $52\pm 7\%$, $59\pm 9\%$, $88\pm 9\%$, $54\pm 19\%$, $76\pm 12\%$, $67\pm 10\%$ e $64\pm 15\%$ para os dias 10, 12, 14, 16, 24, 26 e 28 de avaliação, respectivamente. Além disto, com o objetivo de verificar se o tratamento prolongado com GE teria efeito em reduzir a hiperalgisia em relação aos animais tratados com veículo o tratamento foi interrompido, porém, como observado na figura 10 (C) a hiperalgisia ao frio foi novamente observada, sendo que está foi reduzida novamente quando o tratamento foi reiniciado, no 24º dia, com uma resposta bastante similar ao observado no primeiro período de tratamento (Fig. 10 C).

O cálculo da área sob a curva (Fig. 10 E) representa apenas o período de tratamento das figuras (C e D), excluído o período quando este foi suspenso. Esta análise revelou que os grupos que receberam ambas as doses de GE (10 e 100 mg/kg) diferiram significativamente do grupo que recebeu apenas veículo.

Figura 10 – Efeito do GE sobre a hiperalgesia térmica (frio).

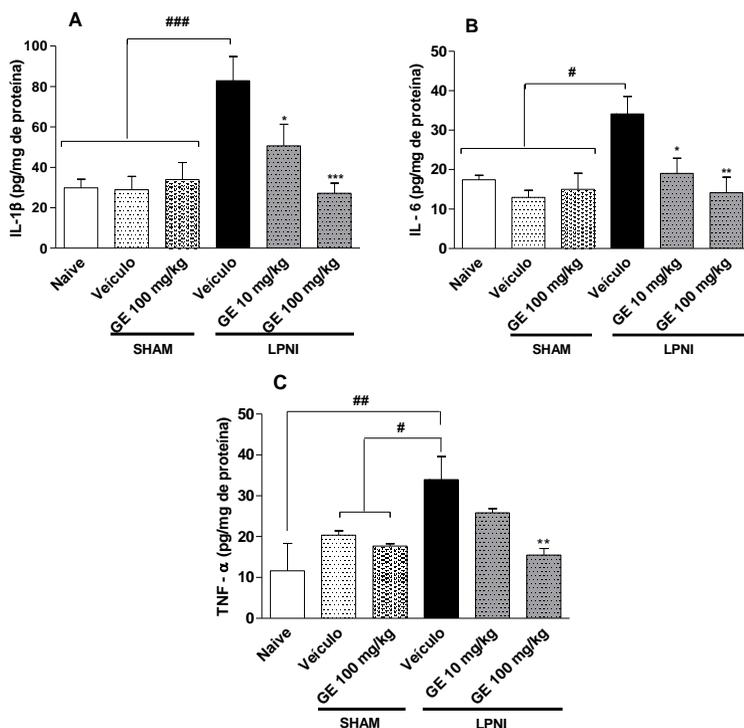


Efeito do tratamento com GE na hiperalgesia térmica (frio) induzida pela LPNI em camundongos. No painel A, observa-se o decurso temporal do efeito da administração (aguda) do GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) no 9º dia pós-cirurgia na hiperalgesia térmica (frio). No painel B, observa-se o efeito do tratamento prolongado com o GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) 2 vezes ao dia do 10º-16º e 24º-28º dias pós-cirurgia. O painel E representa a área sob a curva (ASC) dos grupos experimentais representados no painel C e D. A letra B representa o escore dos animais anterior a cirurgia. Cada grupo experimental foi composto por 7-9 animais, cada ponto representa a média e as linhas verticais indicam E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo LPNI + Veículo * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ ou *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo LPNI + veículo. A significância estatística foi determinada por análise de variância de duas vias (medidas repetidas) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A ASC foi analisada por ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

5.3 EFEITO DO GE SOBRE AS CONCENTRAÇÕES ESPINAIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

Os resultados apresentados na figura 11 A-C demonstram que o procedimento de ligadura parcial do nervo isquiático induziu um aumento significativo das concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na medula espinal dos animais quando comparado aos grupos naive e sham. Além disto, pode-se observar que o GE (10 e 100 mg/kg, i.g.) reduziu de forma significativa as concentrações das citocinas na medula espinal quando comparados com o grupo LPNI que receberam veículo. Assim, observa que a dose de 100 mg/kg de GE promoveu inibição de 100% das concentrações de IL-1 β e IL-6 e de 83 \pm 7% de TNF- α (fig.11 A-C), já a dose de 10 mg/kg de GE reduziu em 55 \pm 10% e 91 \pm 7% respectivamente as citocinas IL-1 β e IL-6 . Além disto, o GE não alterou as concentrações no grupo sham + GE 100 mg/kg, quando comprado com o grupos sham + veículo e grupo naive, indicando que o tratamento não altera as concentrações basais destas citocinas em situação onde não há presença de lesão.

Figura 11 – Efeito do tratamento com galato de etila sobre as concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

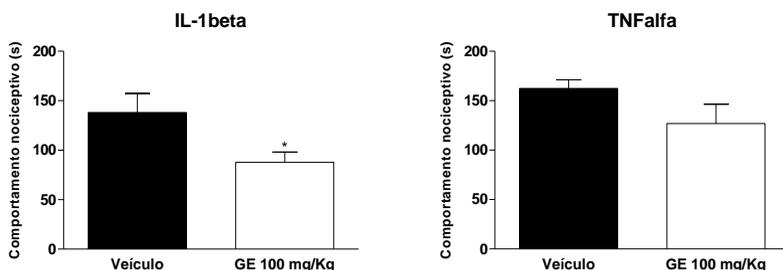


Efeito do tratamento com galato de etila (10 e 100 mg/kg, i.g.) sobre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (painel A), IL-6 (painel B) e TNF- α (painel C) nos segmentos medulares L1-L6 de camundongos submetidos à LPNI. O tecido foi retirado no 29º dia após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeções i.g. de GE ou veículo duas vezes ao dia do 10º ao 29º dia após a LPNI. Cada barra representa a média de 7-9 animais, as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados ao grupo LPNI + veículo (10 mL/kg, i.g.), * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001. A cerquilha indica níveis de significância do grupo LPNI + veículo (10 mL/kg, i.g.) em relação aos grupos naive, e sham, # P <0,05, ## P <0,01 e ### P <0,001. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste student Newman-Keuls.

5.4 EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Os resultados apresentados na figura 12 A-B demonstram que o GE (100 mg/kg, i.g.) foi eficaz em reduzir a nocicepção causada pela injeção i.t. de IL-1 β (1 pmol/sítio), com inibição de $36 \pm 8 \%$ (Fig. 12 A), porém não inibiu a nocicepção induzida pelo TNF- α (0,1 pmol/sítio) (Fig. 12B) quando comparado com o grupo veículo.

Figura 12 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por IL-1 β e TNF- α .



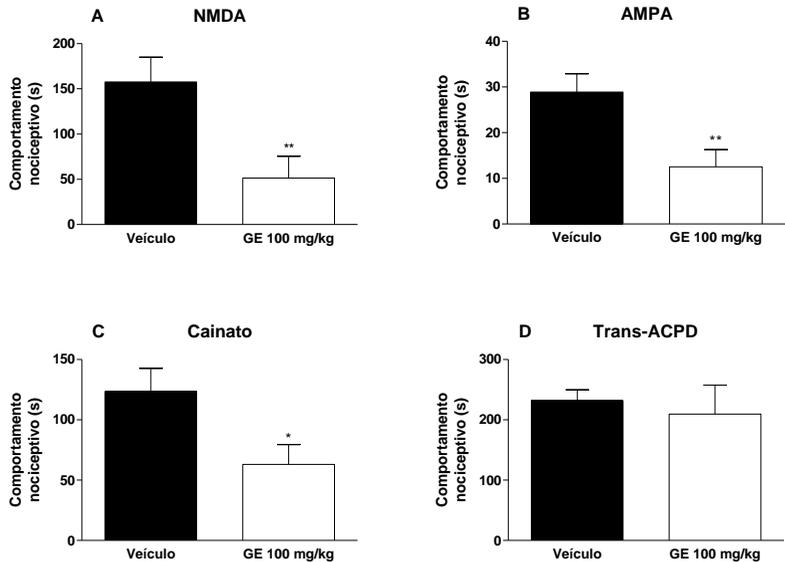
Efeito do GE (100 mg/kg i.g.), sobre a nocicepção induzida pela injeção intratecal de interleucina-1 β (painel A) e de fator de necrose tumoral- α (painel B) em camundongos. Os valores representam a média de 8-10 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média E.P.M. Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo veículo (teste t de Student). * $P < 0,05$.

5.5 EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS

Os resultados apresentados na figura 13 A-D demonstram que a administração via i.g. de GE (100 mg/kg) causou redução significativa do comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.t. de NMDA, AMPA e cainato em relação ao grupo controle (veículo), com inibições de $67 \pm 15\%$, $57 \pm 13\%$ e $53 \pm 12\%$, respectivamente (Fig. 13 A-C). No entanto, o mesmo tratamento

com o GE não apresentou efeito significativo na redução da nocicepção induzida pelo trans-ACPD (Fig. 13D).

Figura 13 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por NMDA, AMPA, cainato e trans-ACPD.



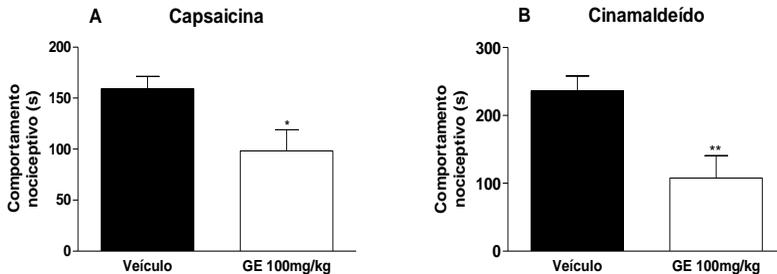
Efeito do galatão de etila (100 mg/kg, i.g.) sobre a nocicepção induzida pela injeção i.t. de NMDA (450 pmol/sítio, painel A), AMPA (135 pmol/sítio, painel B), cainato (110 pmol/sítio, painel C) e de trans-ACPD (50 nmol/sítio, painel D) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo veículo (teste t de Student), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5.6 EFEITO DO GE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE CAPSAICINA E CINAMALDEÍDO

Os resultados apresentados na figura 14 A-B demonstram que o GE (100 mg/kg, i.g.) causou redução significativa do comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.t. de capsaicina (100 pmol/sítio) (agonista TRPV1) e cinamaldeído (30

pmol/sítio) (agonista TRPA1) em relação ao grupo controle (veículo), com inibições de $38\pm 13\%$ e $54\pm 14\%$, respectivamente.

Figura 14 – Efeito antinociceptivo do GE sobre a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.

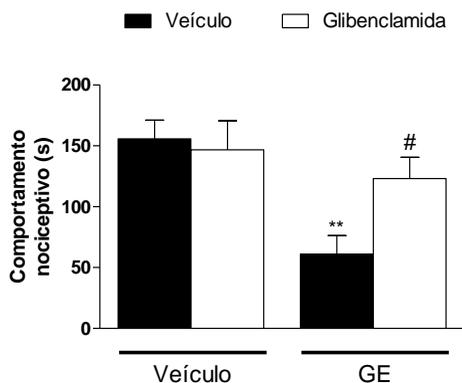


Efeito do GE (100 mg/kg i.g.) sobre a nocicepção induzida pela injeção i.t. de capsaicina (painel A) e de cinamaldeído (painel B) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (veículo) (teste t de Student), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5.7 ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO GE

A Figura 15 mostra que o pré-tratamento dos camundongos com glibenclamida (2 mg/kg, i.p., bloqueadora de canais de potássio sensíveis ao ATP) foi capaz de reduzir de forma significativa a antinocicepção induzida pelo GE (100 mg/kg, i.g.) na nocicepção causada pela injeção i.t. de NMDA. Além disso, os resultados mostram que a glibenclamida *per se* não alterou a resposta nociceptiva dos animais em relação ao grupo tratado com veículo.

Figura 15 – Efeito da glibenclamida sobre a antinociceção induzida pelo GE.



Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do GE (100 mg/kg, i.g.) na nociceção induzida pelo NMDA (450 pmol/sítio, i.t.) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (veículo + veículo) e # $P < 0,05$ difere significativamente do grupo do veículo + GE (ANOVA de uma via seguida pelo teste student Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

As dores crônicas neuropáticas causam grande desconforto e sofrimento nas pessoas afetadas, comprometendo significativamente a qualidade de vida destas pessoas (HALL et al., 2006; QUINTANS et al., 2013). Dados epidemiológicos mostram que a prevalência da dor crônica neuropática atinge até 17,9% e sua incidência pode chegar a 8,2/1000 pessoas por ano (VAN HECKE et al., 2013).

A dor neuropática esta relacionada normalmente a algum tipo de lesão ou a uma patofisiologia evidente, porém frequentemente também ocorre de forma silenciosa. Esta pode ser causada por tumores, fármacos usados na quimioterapia, distúrbios metabólicos, infecções virais, trauma ou hérnia de disco, entre elas destacamos as neuropatias e a síndrome da dor complexa regional (ZIMMERMANN, 2001).

A dor neuropática é geralmente difícil de tratar em função da sua etiologia heterogênea e dos complexos mecanismos moleculares e celulares que estão envolvidos na sua patofisiologia. Desta maneira, os fármacos disponíveis tem frequentemente potencial terapêutico limitado nas dores crônicas neuropáticas, e ainda oferecem algum risco devido aos seus efeitos colaterais (WOOLF; MANNION, 1999; BATISTA et al., 2010).

Por trás da instalação e manutenção da dor neuropática estão diversas mudanças celulares e moleculares. As alterações em nível celular, por exemplo, podem compreender a ativação e migração de células imunes e conseqüentemente liberação de mediadores inflamatórios tais como citocinas, quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas, que levam a reorganização da circuitaria no CDME (MOALEM; TRACEY, 2006; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Entre as alterações em nível molecular que estão diretamente relacionados com a dor neuropática estão, por exemplo, o aumento das atividades de proteínas cinases (PKA e PKC), aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (HUCHO; LEVINE, 2007), bem como alterações da expressão de canais iônicos e receptores (HONG; WILEY, 2005; KATSURA et al., 2006; SUN et al., 2012). Considerando esta grande diversidade de alterações presentes nas dores crônicas, em especial as de origem neuropática, parece compreensível a dificuldade de se controlar este tipo de

dor, tornando este um importante alvo para estudos de novos compostos que possam regular estas mudanças e por fim levar a redução dos sintomas dolorosos de origem neuropática.

Nas neuropatias, é comum a sensibilização dos nociceptores aferentes primários e mudanças adaptativas, tais como neuroplasticidade, a qual tem sido descrita em vários níveis do sistema nervoso (BESSON, 1999) e isto consequentemente é a causa da hiperalgesia e/ou alodinia presente nas neuropatias (MILLAN, 1999; PARADA et al., 2003). Neste sentido, o modelo de neuropatia induzida pela LPNI tem sido utilizado sistematicamente por causar alterações comportamentais, celulares e bioquímicas semelhantes às observadas em humanos (MALMBERG; BASBAUM, 1998; BORTALANZA et al., 2002; MEOTTI et al., 2006). Assim, o modelo de LPNI tem sido utilizado amplamente na busca de compostos que aliviem os sintomas observados na síndrome da dor crônica neuropática.

Com relação às análises comportamentais nossos dados vão ao encontro de trabalhos prévios utilizando o mesmo modelo (MALMBERG; BASBAUM, 1998; MEOTTI et al., 2006; MAZZARDO-MARTINS et al., 2012), uma vez que em nosso estudo o procedimento de LPNI foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica e térmica ao frio. Além disto, os resultados apresentados neste trabalho claramente mostram que o GE foi eficaz em inibir o comportamento nociceptivo induzido pela LPNI quando avaliado por estímulo mecânico (filamento de von Frey) e térmico ao frio (acetona). Além disso, foram obtidos avanços substanciais a cerca dos mecanismos subjacentes ao efeito antinociceptivo do GE no modelo de neuropatia utilizado.

Entre os diversos fatores que levam a sensibilização dos neurônios nociceptivos, buscamos primeiramente quantificar a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6. De fato, estas citocinas estão relacionadas diretamente na liberação de vários mediadores endógenos responsáveis pela neuroplasticidade tanto central quanto periférica e consequentemente na sensibilização dolorosa (MOALEM; TRACEY, 2006; ZHUO; WU; WU, 2011). Assim, os nossos resultados confirmam os dados descritos na literatura (DA SILVA et al., 2011; MAZZARDO-MARTINS et al., 2012) ao demonstrar que as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α foram significativamente aumentadas nos animais

submetidos à LPNI. Também, o tratamento prolongado com GE, foi capaz de reduzir significativamente as concentrações destas citocinas na medula espinal dos animais neuropáticos sugerindo, que ao menos em parte, o efeito antinociceptivo do GE esteja relacionado à redução da concentração destas citocinas em nível medular. Por outro lado, é importante mencionar que o GE *per se* não alterou as concentrações das citocinas estudadas quando comparado com os grupos controle (naive e sham), indicando que ele é capaz de reduzir o aumento das citocinas somente nos processos patológicos e não em condições fisiológicas.

De fato, está bem estabelecida que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão envolvidas na dor neuropática. Ademais, tem sido demonstrado consistentemente na literatura o aumento nos níveis destas citocinas bem como o aumento dos seus receptores em diferentes modelos de neuropatias (ex. lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou induzida por quimioterápico) (AUSTIN e MOALEM-TAYLOR, 2010; MA e QUIRION, 2005; SHAMASH, REICHERT e ROTSHENKER, 2002; GAO, YAN e WENG, 2013; GEORGE et al., 1999). Além disto, estudos demonstram que intervenções na sinalização ou produção destas citocinas reduzem os sinais da dor neuropática (SACERDOTE et al., 2013).

Por outro lado, tem sido demonstrado que lesões em nervos periféricos resultam em uma resposta inflamatória caracterizada pela ativação de macrófagos, mastócitos residentes e células de Schwann nos axônios, células satélites gliais no GRD e astrócitos e micróglia no CDME (SCHOLZ; WOOLF, 2007; AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011). Além disso, as respostas inflamatórias são aumentadas pelo infiltrado de macrófagos, neutrófilos, linfócitos-T e células NK (natural killer) (XIE et al., 2006; SCHOLZ; WOOLF, 2007). Estas células contribuem para a liberação de diversos mediadores inflamatórios como a bradicinina, substância-P, íons hidrogênio, NGF, prostaglandinas, histamina, ATP e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (RICHARDSON; VASKO, 2002).

Os nossos resultados demonstram também que o GE foi capaz de reduzir significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração intratecal de IL-1 β , mas não alterou a resposta causada pelo TNF- α . Desta maneira, o GE poderia

reduzir as concentrações de IL-1 β e também inibir a transmissão nociceptiva e conseqüente sensibilização gerada pela IL-1 β .

Somando aos nossos resultados sobre a concentração de citocinas tem sido demonstrado que a IL-1 β ativa diretamente neurônios sensoriais primários resultando em uma resposta hiperalgésica (BINSHTOK et al., 2008), e ainda, na medula espinal a IL-1 β aumenta as correntes excitatórias induzidas por AMPA e NMDA, enquanto diminui as correntes inibitórias espontâneas de glicina e GABA (KAWASAKI et al., 2008b). Além disto, a IL-1 β também induz a liberação de substância-P e glutamato a partir dos terminais nervosos no CDME contribuindo para a transmissão da dor (BASBAUM et al., 2009).

Uma vez que encontramos estes resultados e que tem sido demonstrada uma estreita relação existente entre a sinalização glutamatérgica e o aumento da expressão de citocinas (SULKOWSKI et al., 2013; YE et al., 2013). A nossa abordagem subsequente foi verificar o efeito do GE sobre a nocicepção induzida pela administração direta de agonistas glutamatérgicos em níveis medulares.

Está bem estabelecido que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos. Além disso, os neurônios nociceptivos ativados por glutamato podem liberar diversos mediadores inflamatórios e neuropeptídios envolvidos na transmissão nociceptiva tanto no SNP quanto SNC (MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). Na dor aguda o glutamato liberado na fenda sináptica gera correntes excitatórias pós-sinápticas em neurônios de segunda ordem, isto ocorre primariamente pela ativação de receptor glutamatérgico do subtipo AMPA e cainato (BASBAUM et al., 2009). Nestas condições muitos receptores do subtipo NMDA podem permanecer “silenciosos”, mas quando a sinalização é sustentada ou exacerbada leva a ativação destes receptores pela remoção do íon Mg⁺² que bloqueia o poro do canal (YOUN; GERBER; SATHER, 2013).

Os nossos dados demonstram que a administração sistêmica do GE foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela administração intratecal de agonistas glutamatérgico ionotrópicos AMPA, NMDA e cainato sem, no entanto, afetar a nocicepção causada pelo agonista glutamatérgico metabotrópico Trans-ACPD. Estes resultados sugerem que o GE apresenta sua ação antinociceptiva via

redução da ativação direta ou indireta dos receptores ionotrópicos glutamatérgico e desta forma reduzindo a dor neuropática causada pela LPNI.

No contexto da dor neuropática a transmissão glutamatérgica está diretamente implicada na sensibilização central. A transmissão sináptica produzida pela ativação dos receptores AMPA e NMDA é responsável pelo aumento da força sináptica no CDME (YOUN; GERBER; SATHER, 2013), aumentando o influxo de cálcio, o que pode levar a ativação de diversas proteínas cinases intracelulares como proteínas cinase A e C, MAPK e PI3K, que por sua vez aumentam ainda mais a excitabilidade destes neurônios, em especial pela modulação da função dos receptores NMDA e AMPA (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; YOUN; GERBER; SATHER, 2013). Desta maneira, compostos que atuem na inibição dos receptores glutamatérgicos merecem destaque uma vez que, esses receptores estão envolvidos em diversas condições de dor, incluindo a de origem neuropática (BLEAKMAN; ALT; NISENBAUM, 2006).

De fato, estudos demonstram que o bloqueio dos receptores glutamatérgico é capaz de reduzir a concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , em modelos de neuropatia induzida por lesão periférica e encefalomielite autoimune experimental (EAE) (KLEINSCHNITZ et al., 2004; SULKOWSKI et al., 2013). Outro estudo demonstra que a IL-1 β e o TNF- α induzem o aumento das concentrações de glutamato intra e extracelular e o pré-tratamento com MK-801 reduziu significativamente o aumento do glutamato extracelular (YE et al., 2013).

Assim, é plausível sugerir que o GE possa estar interferindo em algum ponto da sinalização glutamatérgica o qual parcialmente explicaria a redução nas concentrações de citocinas estudadas, bem como interferindo sobre este quadro de retroalimentação positiva entre o sistema glutamatérgico e citocinas pró-inflamatórias.

Apesar de ser a transmissão glutamatérgica essencial para a transmissão nociceptiva, diversas outras moléculas e vias de sinalização que contribuem para a detecção do estímulo nocivo também foram caracterizadas (JULIUS; BASBAUM, 2001). No campo da dor, uma grande família de receptores denominados TRPs, principalmente TRPV1 e TRPA1, parecem ser importantes

para a inicialização e manutenção dos impulsos elétricos em neurônios nociceptivos levando, portanto, a nocicepção (MORAN et al., 2011).

Os canais iônicos TRP, especialmente TRPV1 e TRPA1, estão altamente envolvidos na transdução e sensibilização em neurônios aferentes primários somatossensoriais. Além disto, estes canais iônicos são transdutores de ambos os estímulos térmicos e mecânicos, atuando como integradores moleculares para uma gama de diversos estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009; STUCKY et al., 2009).

Em nosso estudo, a LPNI foi capaz de reduzir os limiares nociceptivo mecânico e térmico (frio), e o GE foi capaz de restabelecer estes índices. Considerando estes resultados nossa abordagem subsequente foi investigar o efeito do GE na nocicepção induzida pela administração de capsaicina (agonista TRPV1) e cinamaldeído (agonista TRPA1) em nível espinal.

Nossos resultados mostraram que o GE foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pela administração intratecal de ambos agonistas. De fato, já foi, previamente, demonstrado que o GE reduz o comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina quando injetada periféricamente (intraplantar) (SANTOS et al., 1999). Assim, os resultados do presente estudo estendem estes achados e reafirmam que o GE pode modular a nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1 também em níveis centrais. Neste sentido, foi demonstrado o aumento da expressão do receptor TRPV1 no modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina (HONG; WILEY, 2005) e também sua co-expressão centralmente em neurônios positivos para substância-P (HWANG; BURETTE; VALTSCHANOFF, 2003). Também, foi demonstrado que a administração intratecal de capsaicina induz a liberação de glutamato na fenda sináptica e consequentemente promove a geração de potenciais pós-sinápticos excitatórios (SPICAROVA; PALECEK, 2008), sendo que este receptor pode sofrer modulação positiva pelas proteínas cinases A e C (BASBAUM et al., 2009).

Neste sentido podemos relacionar um possível efeito do GE pela inibição ou modulação direta do receptor TRPV1 prevenindo a liberação de glutamato e substância-P. Outra hipótese seria verificar se o GE poderia inibir a sinalização da substância-P liberada na fenda sináptica uma vez que o mesmo

reduziu a hiperalgesia mecânica causada pela substância-P em ratos (SANTOS et al., 1999).

Já em relação aos canais TRPA1, vários estudos têm demonstrado sua importância na transdução da nocicepção ao frio, particularmente em estados de dor aguda e crônica (STORY et al., 2003; DEL CAMINO et al., 2010). Um achado interessante mostra uma redução da expressão de canais TRPA1 no GRD de nervos espinais lesados (axotomia). Contudo, ocorre um aumento na sua expressão no GRD vizinho, sendo que este aumento da expressão de TRPA1 mostrou-se crítico para o desenvolvimento da hiperalgesia ao frio (KATSURA et al., 2006).

Nas terminações centrais, a ativação de TRPA1 é sugerida por facilitar a liberação de glutamato, levando ao aumento da frequência e amplitude da transmissão glutamatérgica de neurônios aferentes primários no CDME (PERTOVAARA; KOIVISTO, 2011). Neste sentido, Uta e colaboradores (2010) demonstraram que a ativação de TRPA1 na medula espinal pelo cinamaldeído aumentou a transmissão sináptica excitatória. Além disso, foi relatado recentemente que o antagonismo farmacológico do TRPA1 pelo composto A-967.079 foi eficiente em atenuar a hiperalgesia ao frio produzido por lesão do nervo isquiático em ratos, sem alterar a sensação de frio nociva em animais normais, sugerindo diferentes funções do TRPA1 em estados fisiológicos e patológicos (CHEN et al., 2011).

No presente estudo foi demonstrado que o GE inibiu a nocicepção espontânea induzida pelo agonista TRPA1, cinamaldeído; da mesma forma que foi efetivo em reduzir a hiperalgesia ao frio no modelo da LPNI. Assim, pode-se sugerir também que o efeito do GE poderia ser via inibição direta do receptor ou da sinalização mediada pela ativação dos receptores TRPA1. Por exemplo, inibindo a sinalização glutamatérgica como apresentado anteriormente, uma vez que o GE foi capaz de inibir a nocicepção de receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

Outra hipótese a ser verificada para o efeito do GE sobre a nocicepção aguda e crônica poderia ser por sua ação antioxidante (ZHENG et al., 2009; LIP et al., 2013). Em um estudo, Nishio e colaboradores (2013) demonstraram através de ensaios eletrofisiológicos que as EROs aumentam a transmissão sináptica excitatória e este efeito é bloqueado pelo uso de “scavengers” de EROs. Ainda neste estudo foi demonstrado que antagonistas de TRPA1 e TRPV1 também foram capazes de

reduzir as correntes excitatórias produzidas por EROs, sugerindo que estes aumentam a liberação de glutamato a partir dos terminais pré-sinápticos por meio da ativação de canais TRPA1 e TRPV1 (NISHIO et al., 2013).

Os resultados apresentados neste trabalho também demonstram que a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP esta envolvida na antinocicepção causada pelo GE. Visto que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida (um inibidor de canais de potássio sensíveis ao ATP) foi capaz de prevenir parcialmente, mas significativamente a antinocicepção induzida pelo GE. Assim, o resultado apresentado aqui corrobora com os obtidos anteriores os quais demonstram que a glibenclamida tem capacidade de reverter o efeito do GE tanto em estudo “in vitro” quanto “in vivo” (PAULINO et al., 1999; SANTOS et al., 1999).

Os canais K_{ATP} estão amplamente presentes em neurônios periféricos e centrais, além de células gliais onde desempenham um papel importante na regulação da excitabilidade da membrana e liberação de neurotransmissores. Estudos investigando o papel deste canal em neuropatias indicam que ocorre uma redução da sua expressão em neurônios nociceptivos, e isto provavelmente contribui para a hiperexcitabilidade neuronal (KAWANO et al., 2009a; WU et al., 2011).

Entretanto ativadores destes canais como a cromacalina ou o diazóxido são capazes de reduzir a nocicepção em modelos animais de neuropatia (KAWANO et al., 2009a; WU et al., 2011). Neste sentido foi demonstrado que estes canais mantem suas propriedades biofísicas e farmacológicas intactas, fornecendo assim oportunidade terapêutica com a utilização de ativadores de K_{ATP} na dor neuropática (KAWANO et al., 2009b).

Em relação à propriedade de ativação de K_{ATP} , considerando sua importância sobre a manutenção do potencial de membrana e consequentemente seu controle sobre a excitabilidade neuronal é possível que os efeitos observados com o GE em nosso estudo estejam relacionados a abertura destes canais, e assim promovendo contrabalanço da excitabilidade neuronal, reduzindo desta forma a despolarização neuronal e consequentemente a sinalização nociceptiva (OCANA et al., 2004, WU et al., 2011).

Em conjunto, os resultados do presente estudo reforçam a ideia de que o GE possui potencial terapêutico para o controle da

dor aguda e crônica, em especial a dor neuropática. Em relação a este resultado somado aos diversos trabalhos, podemos sugerir que o GE tenha um efeito modulando a transmissão sináptica (ex. reduzindo liberação de glutamato), reduzindo a produção de citocinas e possivelmente controlando a excitabilidade neuronal por meio da abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- ❖ O galato de etila administrado sistemicamente por via oral levou uma redução do comportamento nociceptivo (hiperalgesia mecânica e térmica) induzida pela LPNI. Além de reduzir a concentração das citocinas pró-inflamatória IL-1 β , TNF- α e IL-6 na medula espinal;
- ❖ O galato de etila foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela administração i.t. de agonistas glutamatérgicos NMDA, AMPA e cainato, mas não teve este efeito sobre a nocicepção induzida pelo agonista glutamatérgico metabotrópico Trans-ACPD;
- ❖ O galato de etila administrado por via oral também foi capaz reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina (agonista TRPV1) e cinamaldeído (agonista TRPA1);
- ❖ O galato de etila administrado pela via oral foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela citocina pró-inflamatória IL-1 β , mas não teve efeito sobre a nocicepção induzida pelo TNF- α ;
- ❖ A administração prévia do bloqueador de canal de potássio sensível a ATP glibenclamida reverteu significativamente o efeito antinociceptivo do galato de etila, sugerindo que estes canais possuem um papel importante no seu mecanismo de ação;

Assim, os resultados apresentados nesta dissertação mostram pela primeira vez que o galato de etila, um composto fenólico encontrado em muitas espécies de plantas, foi eficaz em reduzir a dor de origem neuropática. Desta forma, este estudo agrega evidências científicas novas e fornece subsídios para a continuidade dos estudos pré-clínicos tanto farmacológicos quanto toxicológico, visando confirmar seu potencial terapêutico para o tratamento de dores crônicas.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar o efeito do galato de etila sobre a atividade do fator de transcrição nuclear-kappa B no modelo de LPNI;
- ✓ Avaliar o efeito do galato de etila sobre a expressão de outras proteínas envolvidas na dor crônica de origem neuropática (ex. COX, NOS-induzida, quimiocinas, entre outras);
- ✓ Avaliar o efeito antioxidante do galato de etila *ex vivo* sobre o estresse oxidativo em modelos de dor crônica de origem neuropática (ex. ligadura parcial do nervo isquiático, síndrome da dor complexa regional);
- ✓ Verificar a participação de outros canais de potássio no efeito antinociceptivo do GE;
- ✓ Confirmar através de estudos eletrofisiológicos o efeito do galato de etila sobre os canais de potássio sensíveis ao ATP.
- ✓ Avaliar os eventuais efeitos tóxicos promovida pela administração aguda ou prolongada do galato de etila em camundongos.

9 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, R.; MICHAELIS, M.; DEVOR, M. Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 19, p. 8589-96, out 1999.

ANDRADE, E. L. et al. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 511-20, mar 2008.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 9, n. 11, p. 660-9, nov 2013.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J. Neuroimmunol.**, v. 229, n. 1-2, p. 26-50, dez 2010.

BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 667-87, 1998.

BACKONJA, M. M.; STACEY, B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. **J. Pain**, v. 5, n. 9, p. 491-7, nov 2004.

BASBAUM, A. Specificity versus patterning theory: continuing the debate. [Pain Research Forum](#) 2011.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, out 2009.

BATISTA, P. A. et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **J. Pain**, v. 11, n. 11, p. 1222-9, nov 2010.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. **J Neurosci.**, v. 28, n. 52, p. 14062-73, dez 2008.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E. S. Glutamate receptors and pain. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 592-604, out 2006.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 453, n. 2-3, p. 203-8, out 2002.

BOXALL, S. J. et al. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport.**, v. 9, n. 6, p. 1201-3, abr 1998.

BRAMBILLA, A. et al. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 305, n. 1-3, p. 115-7, jun 1996.

CALDERON, A. I. et al. Evaluation of larvicidal and in vitro antiparasitic activities of plants in a biodiversity plot in the Altos de Campana National Park, Panama. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 7, p. 487-498, out 2006.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Med.**, v. 69, n. 11, p. 973-83, nov 2003.

CAMPBELL, J. N. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 89-94, jan 1988.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051-8, jun 1999.

CECHINEL FILHO, V. et al. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, n. 12, p. 1231-6, dez 1996.

CHEN, J. et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. **Pain**, v. 152, n. 5, p. 1165-72, maio 2011.

CHI, X. X.; JIANG, X.; NICOL, G. D. ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE2-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. **Brain Res.**, v. 1145, p. 28-40, maio 2007.

CLIFFORD, A. J. et al. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 64, n. 5, p. 748-56, nov 1996.

COETZEE, W. A. et al. Molecular diversity of K⁺ channels. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 868, p. 233-85, abr 1999.

CORDOVA, M. M. et al. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 495, n. 3, p. 173-7, maio 2011.

COULL, J. A. et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 938-42, ago 2003.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, out 2005.

CRAIG, A. D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 26, p. 1-30, 2003.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 521, p. 22-39, 2003.

DA SILVA, K. A. et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v. 152, n. 8, p. 1872-87, ago 2011.

DATTA DE, D. et al. IL1B induced Smad 7 negatively regulates gastrin expression. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e14775, 2011.

DE MOS, M. et al. Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I). **J. Pain**, v. 10, n. 11, p. 1161-9, nov 2009.

DE PAZ-CAMPOS, M. A. et al. Evidence for the Participation of ATP-sensitive Potassium Channels in the Antinociceptive Effect of Curcumin. **Korean J. Pain**, v. 25, n. 4, p. 221-7, out 2012.

DEL CAMINO, D. et al. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 45, p. 15165-74, nov 2010.

DHAKA, A.; VISWANATH, V.; PATAPOUTIAN, A. Trp ion channels and temperature sensation. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 29, p. 135-61, 2006.

DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; WAXMAN, S. G. Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. **Adv. Genet.**, v. 63, p. 85-110, 2008.

DJOUHRI, L. et al. Spinal nerve injury increases the percentage of cold-responsive DRG neurons. **Neuroreport**, v. 15, n. 3, p. 457-60, mar 2004.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, ago 1988.

FLATTERS, S. J.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 109, n. 1-2, p. 150-61, maio 2004.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, n. 1, p. 29-58, jan 2001.

GADOTTI, V. M. et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 102, n. 4, p. 549-54, out 2012.

GADOTTI, V. M. et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res.**, v. 1093, n. 1, p. 116-22, jun 2006.

GAO, M.; YAN, X.; WENG, H. R. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β activity with lithium prevents and attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 254, p. 301-11, dez 2013.

GAO, S. et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite in rat plasma. **Biomed. Chromatogr.**, v. 24, n. 5, p. 472-8, maio 2010.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **J. Neuroinflammation**, v. 8, p. 110, 2011.

GEORGE, A. et al. Serial determination of tumor necrosis factor- α content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. **Exp. Neurol**, v. 160, n. 1, p. 124-32, nov 1999.

GONZALEZ, C. et al. K(+) channels: function-structural overview. **Compr. Physiol.**, v. 2, n. 3, p. 2087-149, jul 2012.

GOTES, J. et al. Benefits of ethyl gallate versus norepinephrine in the treatment of cardiovascular collapse in *Pseudomonas aeruginosa* septic shock in dogs. **Crit. Care Med.**, v. 40, n. 2, p. 560-72, fev 2012.

GU, J. G. et al. Synaptic strengthening through activation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. **Nature**, v. 381, n. 6585, p. 793-6, jun 1996.

GUO, L. H.; SCHLUESENER, H. J. The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: the role of Toll-like receptors. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 64, n. 9, p. 1128-36, maio 2007.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 473-508, dez 2005.

HALL, G. C. et al. Epidemiology and treatment of neuropathic pain: the UK primary care perspective. **Pain**, v. 122, n. 1-2, p. 156-62, maio 2006.

HAWAS, U. W. Antioxidant activity of brocchlin carboxylic acid and its methyl ester from *Chrozophora brocchiana*. **Nat. Prod. Res.**, v. 21, n. 7, p. 632-40, jun 2007.

HERVERA, A. et al. Peripheral effects of morphine and expression of mu-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. **Mol. Pain**, v. 7, p. 25, 2011.

HONG, S.; WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 1, p. 618-27, jan 2005.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-76, ago 2007.

HWANG, S. J.; BURETTE, A.; VALTSCHANOFF, J. G. VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 460, n. 2, p. 255-65, maio 2003.

INAGAKI, N. et al. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. **Neuron**, v. 16, n. 5, p. 1011-7, maio 1996.

INAGAKI, N. et al. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 11, p. 5691-4, mar 1995.

INOUE, M. et al. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. **Nat. Med.**, v. 10, n. 7, p. 712-8, jul 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, set 2001.

KALAIVANI, T.; RAJASEKARAN, C.; MATHEW, L. Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. Ex. Delile subsp. indica (Benth.) Brenan. **J. Food Sci.**, v. 76, n. 6, p. T144-9, ago 2011.

KALLENBORN-GERHARDT, W. et al. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 30, p. 10136-45, jul 2012.

KATSURA, H. et al. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp. Neurol.**, v. 200, n. 1, p. 112-23, jul 2006.

KAWANO, T. et al. Suppressed Ca²⁺/CaM/CaMKII-dependent K(ATP) channel activity in primary afferent neurons mediates hyperalgesia after axotomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, n. 21, p. 8725-30, maio 2009a.

KAWANO, T. et al. ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. **Neuroscience**, v. 162, n. 2, p. 431-43, ago 2009b.

KAWASAKI, Y. et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. **Nat. Med.**, v. 14, n. 3, p. 331-6, mar 2008a.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 20, p. 5189-94, maio 2008b.

KIM, W. H. et al. Ethyl Gallate Induces Apoptosis of HL-60 Cells by Promoting the Expression of Caspases-8, -9, -3, Apoptosis-Inducing Factor and Endonuclease G. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 9, p. 11912-22, 2012.

KLEINSCHNITZ, C. et al. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and

NMDA receptor signaling. **J. Neuroimmunol.**, v. 149, n. 1-2, p. 77-83, abr 2004.

KOHNO, T. et al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 77-87, set 2005.

KOSTALOVA, D.; MISIKOVA, E.; GABOROVA, G. [Polyphenol compounds from *Hamamelis virginiana* L]. **Ceska. Slov. Farm.**, v. 50, n. 1, p. 51-3, jan 2001.

LAMOTTE, R. H.; SHIMADA, S. G.; SIKAND, P. Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. **Exp. Dermatol.**, v. 20, n. 10, p. 778-82, out 2011.

LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.**, v. 11, n. 2, p. 118-24, fev 1997.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nat. Methods**, v. 7, n. 6, p. 447-9, jun 2010.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J. Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, set 2009.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 597-652, dez 2001.

LI, P.; ZHUO, M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 695-8, jun 1998.

LIP, H. et al. Glyoxal and methylglyoxal: autoxidation from dihydroxyacetone and polyphenol cytoprotective antioxidant mechanisms. **Chem. Biol. Interact.**, v. 202, n. 1-3, p. 267-74, fev 2013.

LISS, B.; ROEPER, J. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, n. 2, p. 117-27, abr-jun 2001.

LOESER, J. D. Perspectives on pain. In: (Ed.). **Proceedings of the First World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics**. London: Macmillan, 1980. p.316–26.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, maio 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, jul 2008.

LOU, K. Q.; TANG, W. Z.; WANG, X. J. [Study on chemical constituents from flowers of *Ailanthus altissima*]. **Zhong Yao Cai**, v. 35, n. 10, p. 1605-7, out 2012.

LUMPKIN, E. A.; CATERINA, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 858-65, fev 2007.

MA, W.; BISBY, M. A. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. **Brain. Res.**, v. 797, n. 2, p. 243-54, jun 1998.

MA, W.; QUIRION, R. Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E from invading macrophages following nerve injury: an in vivo and in vitro study. **J. Neurochem.**, v. 93, n. 3, p. 664-73, maio 2005.

MACEDO-JUNIOR, S. J. et al. Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K⁺ channels, and voltage-gated Ca²⁺ channels in the antinociceptive effect of inosine. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 1, p. 51-8, mar 2013.

MALJEVIC, S.; LERCHE, H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. **J. Neurol.**, v. 260, n. 9, p. 2201-11, set 2013.

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

MALMBERG, A. B. et al. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 19, p. 7462-70, out 1997.

MAO, Y. F. et al. Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. **Brain Res.**, v. 1248, p. 68-75, jan 2009.

MARK, M. D.; HERLITZE, S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 19, p. 5830-6, out 2000.

MATZNER, O.; DEVOR, M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. **J. Neurophysiol.**, v. 72, n. 1, p. 349-59, jul 1994.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. **Neuroscience**, v. 226, p. 411-20, dez 2012.

MCMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, v. 13, n. 6, p. 199-201, jun 1990.

MEHLA, K. et al. Ethyl gallate attenuates acute lung injury through Nrf2 signaling. **Biochimie.**, v. 95, n. 12, p. 2404-14, dez 2013.

MELZACK, R.; CASEY, K. L. Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. **The skin senses**, p. 423-443, 1968.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 13, p. 1243-55, mar 2003.

MEOTTI, F. C. et al. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 567, n. 3, p. 198-205, jul 2007.

MEOTTI, F. C. et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 12, p. 1707-13, dez 2006.

MIKA, J. et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 716, n. 1-3, p. 106-19, set 2013.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan 1999.

MILSTEIN, M. L. et al. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 31, p. E2134-43, jul 2012.

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

MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D. Theories of pain: from specificity to gate control. **J. Neurophysiol.**, v. 109, n. 1, p. 5-12, jan 2013.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10, n. 4, p. 283-94, abr 2009.

MOORE, K. A. et al. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 15, p. 6724-31, ago 2002.

MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 10, n. 8, p. 601-20, ago 2011.

MUCHA, M. et al. Transcriptional control of KCNQ channel genes and the regulation of neuronal excitability. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 40, p. 13235-45, out 2010.

MURASE, T. et al. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 1412-20, jun 1999.

MURPHY, P. G. et al. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, n. 6, p. 1891-9, jun 2000.

NDENGELE, M. M. et al. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. **Shock**, v. 23, n. 2, p. 186-93, fev 2005.

NISHIO, N. et al. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. **Neuroscience**, v. 247, p. 201-12, set 2013.

NUCCI, C. Potencial terapeutico do extrato etanolico dos frutos da *Pterodon pubescens* Benth, no controle da dor aguda e cronica. 2014. 179 Dissertação de Mestrado, UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

NORTH, R. A. Twelfth Gaddum memorial lecture. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, n. 1, p. 13-28, set 1989.

OBATA, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 9, p. 2393-401, set 2005.

OCANA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, n. 1-3, p. 203-19, out 2004.

OCANA, M. et al. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 186, n. 2-3, p. 377-8, set 1990.

ORTIZ, M. I. Blockade of the antinociception induced by diclofenac, but not of indomethacin, by sulfonyleureas and biguanides. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 99, n. 1, p. 1-6, jul 2011.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 5, p. 2923-8, mar 2003.

PATEL, R. et al. Novel TRPM8 Antagonist Attenuates Cold Hypersensitivity after Peripheral Nerve Injury in Rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 349, n. 1, p. 47-55, abr 2014.

PAULINO, N. et al. The mechanisms underlying the relaxant effect of methyl and ethyl gallates in the guinea pig trachea in vitro: contribution of potassium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 360, n. 3, p. 331-6, set 1999.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, n. 1, p. 71-80, jan 2007.

PERTOVAARA, A.; KOIVISTO, A. TRPA1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 666, n. 1-3, p. 1-4, set 2011.

QIN, R. D. et al. [Phenolic acid derivatives from *Alchornea trewioides*]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 47, n. 7, p. 926-9, jul 2012.

QUINTANS, J. S. et al. Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models - A Systematic Review. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, nov 2013.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, n. 3, p. 839-45, set 2002.

ROSE, K. et al. Transcriptional repression of the M channel subunit Kv7.2 in chronic nerve injury. **Pain**, v. 152, n. 4, p. 742-54, abr 2011.

SACERDOTE, P. et al. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 8, n. 1, p. 202-11, mar 2013.

SAKURADA, T. et al. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, n. 2, p. 307-10, out 1990.

SAKURADA, T. et al. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, v. 29, n. 3, p. 271-8, set 1996.

SALEEM, A. et al. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, n. 3, p. 327-36, ago 2002.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 5, p. 951-66, set 2011.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381-9, ago 1997.

SANTOS, A. R. et al. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 379, n. 1, p. 7-17, ago 1999.

SCHEIDT, C. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 3, p. 340-7, set 2002.

SCHOLZ, J. et al. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 32, p. 7317-23, ago 2005.

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

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, nov 1990.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 8, p. 3052-60, abr 2002.

SHIBATA, H. et al. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 2, p. 549-55, fev 2005.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.**, v. 361, n. 1-3, p. 184-7, maio 2004.

SORKIN, L. S.; DOOM, C. M. Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 5, n. 2, p. 96-100, jun 2000.

SPICAROVA, D.; PALECEK, J. The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation. **Physiol. Res.**, v. 57 Suppl 3, p. S69-77, 2008.

STELLWAGEN, D. et al. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **J. Neurosci.**, v. 25, n. 12, p. 3219-28, mar 2005.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819-29, mar 2003.

STUCKY, C. L. et al. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Res. Rev.**, 60: 2–23, abr 2009.

SU, L. et al. Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain. **BMC Neurosci.**, v. 12, p. 120, 2011.

SULKOWSKI, G. et al. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.**, v. 261, n. 1-2, p. 67-76, ago 2013.

SUN, T. et al. Alleviation of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF- κ B. **Br. J. Anaesth.**, v. 97, n. 4, p. 553-8, out 2006.

SUN, W. et al. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. **Brain**, v. 135, n. Pt 2, p. 359-75, fev 2012.

TAL, M.; WALL, P. D.; DEVOR, M. Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transection in the rat. **Brain Res.**, v. 824, n. 2, p. 218-23, abr 1999.

TEGEDER, I. et al. Specific Inhibition of κ B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 7, p. 1637-45, fev 2004.

TREEDE, R. D. et al. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, n. 2-3, p. 105-11, fev 1999.

TREEDE, R. D.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. **J. Neurophysiol.**, v. 80, n. 3, p. 1082-93, set 1998.

TSANTOULAS, C. et al. Sensory neuron downregulation of the Kv9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 48, p. 17502-13, nov 2012.

TSUDA, M.; INOUE, K.; SALTER, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. **Trends Neurosci.**, v. 28, n. 2, p. 101-7, fev 2005.

URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 2-3, p. 211-20, ago 1988.

UTA, D. et al. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. **Eur. J. Neurosci.**, v. 31, n. 11, p. 1960-73, jun 2010.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, nov 2013.

VIRGILI, N. et al. Oral administration of the KATP channel opener diazoxide ameliorates disease progression in a murine model of multiple sclerosis. **J. Neuroinflammation**, v. 8, p. 149, 2011.

WADA, Y. et al. A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K(+) channels by G-protein betagamma-subunits. **EMBO J.**, v. 19, n. 18, p. 4915-25, set 2000.

WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 55, n. 8, p. 949-65, ago 2003.

WANG, X. L. et al. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. **J. Physiol.**, v. 579, n. Pt 3, p. 849-61, mar5 2007.

WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, n. 3, p. 869-78, jun 2004.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, ago 2007.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-64, jun 1999.

WU, J. et al. Evidence of Trolox and some gallates as synergistic protectors of erythrocytes against peroxy radicals. **Biochem. Cell Biol.**, v. 76, n. 4, p. 661-4, 1998.

WU, X. F. et al. Reopening of ATP-sensitive potassium channels reduces neuropathic pain and regulates astroglial gap junctions in the rat spinal cord. **Pain**, v. 152, n. 11, p. 2605-15, nov 2011.

XIE, W. R. et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. **Neuroscience**, v. 142, n. 3, p. 809-22, out 2006.

XING, H. et al. TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 50, p. 13680-90, dez 2007.

XU, Z.; LIU, X.; XU, G. [Chemical constituents of roots of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim) Trautv]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 20, n. 8, p. 484-6, 512, ago 1995.

YE, L. et al. IL-1beta and TNF-alpha induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. **J. Neurochem.**, v. 125, n. 6, p. 897-908, jun 2013.

YOUN, D. H.; GERBER, G.; SATHER, W. A. Ionotropic glutamate receptors and voltage-gated Ca(2)(+) channels in long-term potentiation of spinal dorsal horn synapses and pain hypersensitivity. **Neural Plast.**, v. 2013, p. 654257, ago 2013.

ZHANG, H. M.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 158, n. 2, p. 875-84, jan 2009.

ZHENG, G. M. et al. Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 433-436, set 2009.

ZHOU, H. Y. et al. N-methyl-D-aspartate receptor- and calpain-mediated proteolytic cleavage of K⁺-Cl⁻ cotransporter-2 impairs spinal chloride homeostasis in neuropathic pain. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 40, p. 33853-64, set 2012.

ZHUO, M.; WU, G.; WU, L. J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. **Mol. Brain.**, v. 4, p. 31, 2011.

ZHUO, M. L. et al. KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, n. 4, p. 751-64, abr 2005.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, out 2001.

ZURBORG, S. et al. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. **Nat. Neurosci.**, v. 10, n. 3, p. 277-9, mar 2007.