

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

Marina Machado Córdova

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA SEGURANÇA E DO
MECANISMO DE AÇÃO ANALGÉSICO DO
POLISSACARÍDEO GLUCOMANANA OBTIDO DO
LÍQUEN *Heterodermia obscurata*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociência.

Orientador: Professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis
2016

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

Córdova, Marina Machado
Avaliação pré-clínica da segurança e do mecanismo de ação
analgésico do polissacarídeo glucomanana obtido do líquen
Heterodermia obscurata. / Marina Machado Córdova ;
orientador, Adair Roberto Soares Santos - Florianópolis,
SC, 2016.
161 p.

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

Inclui referências

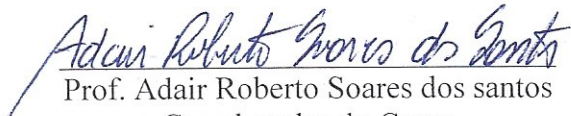
1. Neurociências. 2. Polissacarídeo Glucomanana . 3.
Antinocicepção. I. Santos, Adair Roberto Soares . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. III. Título.

MARINA MACHADO CORDOVA


“AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA SEGURANÇA E DO MECANISMO DE AÇÃO ANALGÉSICO DO POLISSACARÍDEO GLUCOMANANA OBTIDO DO LÍQUEN *HETERODERMIA OBSCURATA*”.

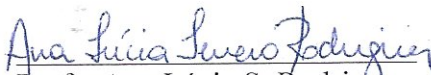
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

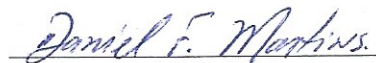
Florianópolis, 23 de fevereiro de 2016.



Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

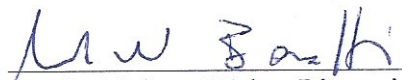

Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC


Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Prof. Daniel F. Martins
Membro da Banca Externo


Prof. Eduardo Luiz G. Moreira
Membro - UFSC


Prof. Guilherme L. Sasaki
Membro da Banca Externo


Prof. Maique Weber Biavatti
Membro – UFSC

Dedico esta tese aos meus pais e irmão,
vocês sempre foram minha maior motivação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vera e Nelton, e meu irmão Lucas, com certeza sem vocês mais essa etapa não seria vencida, obrigada pelo apoio incondicional. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pelo apoio e incentivo à pesquisa científica e por proporcionar todos os recursos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini (Departamento de Bioquímica – UFPR), pela realização do estudo químico e fornecimento do polissacarídeo GM usado neste trabalho.

A Profa. Dra. Sionara Eliasaro (Departamento de Botânica – UFPR), pela coleta e identificação do fungo liquenizado *H. obscurata*.

Ao Prof. Dr. Alex Rafacho e Prof. Dr. Everson Nunes (Departamento de Fisiologia – UFSC), por abrirem as portas do laboratório para a realização do western blotting, e por todo auxílio dado, aprendi muito com vocês e seus alunos.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Fisiologia – UFSC, pela colaboração e amizade.

Aos colegas e amigos do LANDI, nesses anos foram tantos e tão importantes que para não esquecer ninguém agradeço “geral” pelos momentos memoráveis, cafezinhos, longos experimentos, cervejinhas e por sempre tornarem as coisas mais fáceis e agradáveis.

Aos colegas e também amigos do Lidoc, agradeço a paciência e cordialidade em todas as vezes que compartilhamos o lab e por todos os momentos de descontração. Em especial à Kátia que sempre me salvou no blotting.

Aos amigos do coração que a vida em Floripa me proporcionou, Fran, Nêne-Josiel, Gaúcho, Tatilinha, Bibiana, Morgana, Igã, Deise, Stelinha, Ney, Rafa, Amandinha, Thais, Tatá, Dé, Natalia, Cris Baggio e família linda, vocês também fizeram isso acontecer!

Ao Nivaldo, secretário da PPG-Neurociências, por sempre nos auxiliar da melhor maneira possível.

A Dona Vilma e seu Carlos, por toda a preocupação, cuidado e carinho ao longo da pós-graduação.

A todos que, de algum modo, contribuíram com a realização deste trabalho.

Aos animais de laboratório utilizados, todo o meu agradecimento e respeito.

A UFSC pela estrutura oferecida. Também a CAPES, pela bolsa de doutorado concedida durante o desenvolvimento desta tese.

“Se enxerguei mais longe foi porque
me apoiei nos ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

Os produtos naturais são uma grande fonte de moléculas bioativas, entre elas destacam-se os polissacarídeos que apresentam efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios e analgésicos. O polissacarídeo glucomanana (GM) obtido do líquen *Heterodermia obscurata* já demonstrou ter efeito antinociceptivo (analgésico), indicando ser uma molécula interessante. Assim, o presente trabalho pretende avançar na caracterização do efeito antinociceptivo da GM, bem como na compreensão do seu mecanismo de ação neurobiológico e segurança em camundongos. Neste trabalho, foi confirmado que a administração sistêmica da GM (100 mg/kg, ip.) é capaz de reduzir a nocicepção espontânea de origem inflamatória induzida por formalina ou PGE₂. Ademais, a redução da nocicepção induzida por PGE₂ causada pela GM (92±15%) foi semelhante à produzida pela indometacina (93±12%), inibidora não seletiva da COX. Além disso, a administração periférica (local, intraplantar) da GM (10 µg/pata) também reduziu a nocicepção causada pela PGE₂ de maneira similar à indometacina e ao KT5720 (inibidor não seletivo da PKA). A GM (100 mg/kg) também reduziu significativamente a hiperalgesia térmica ao calor, mas não a alodinia mecânica causada pela injeção intraplantar de PGE₂ e CFA (Adjuvante Completo de Freund), bem como aquela causada pela incisão plantar (modelo de dor pós-operatória). Por outro lado, a GM (10 µg/pata) promoveu redução da nocicepção espontânea e hiperalgesia térmica ao calor induzida pela forskolina (FSK, ativadora da adenililciclase). Quando administrado periféricamente (intraplantar), a GM (10 µg/pata) também reduziu a nocicepção espontânea induzida por FSK, assim como o KT5720 (10 nmol/pata). Além disso, a GM (100 mg/kg) foi capaz de reduzir o aumento da fosforilação da PKA (p-PKA) induzida por FSK, na pata de camundongos. A nocicepção espontânea induzida pelo ativador de PKC, o 13-acetato12-miristato de forbol (PMA), foi completamente inibida pela GM (100 mg/kg). Quando avaliado frente à ativação de *termo*-receptores, a GM (30 e 100 mg/kg, ip.) reduziu a nocicepção espontânea induzida pela capsacina (agonista TRPV1), cinamaldeído (agonista TRPA1), mentol (agonista

TRPM8) e pela salina acidificada (agonista ASICs). No entanto, a administração periférica (local, intraplantar) da GM (30 µg/pata) reduziu (70±4%) somente a nocicepção causada pelo cinamaldeído. A nocicepção observada no modelo de PGE₂ foi completamente dependente das fibras aferentes TRPV1+. Ainda, a GM, na dose que promove importante efeito analgésico, não causou efeitos sedativos e tampouco alterou o peso corpóreo dos animais. Contudo, a administração prolongada (11 dias) promoveu aumento do peso do baço, mas não alterou o peso do coração, pulmões, fígado e rins. Ademais, a GM não promoveu alterações hematológicas e bioquímicas importantes. Em conjunto, os dados deste trabalho demonstram que a GM é capaz de reduzir a nocicepção (dor) aguda e persistente, principalmente a de origem inflamatória, por um mecanismo dependente da inibição da via de sinalização ativada por PGE₂ (AMPc/PKA) e dos canais TRPs, principalmente o TRPV1 e o TRPA1. Assim, a GM é uma molécula com potencialidade para o desenvolvimento de fármacos de interesse terapêutico no controle da dor.

Palavras-chave: Polissacarídeo, Glucomanana, Antinocicepção, Dor, PGE₂, TRPV1, TRPA1, PKA, TRPs.

ABSTRACT

Natural products are a wide source of bioactive molecules, which include the polysaccharides with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. It was already demonstrated that the polysaccharide Glucomannan (GM) obtained from the lichen *Heterodermia obscurata* has antinociceptive (analgesic) effect, making it an interesting molecule for further studies. Thus, the present work intends to advance in the characterization of GM antinociceptive effect, as well as in the comprehension of its neurobiological mechanism of action in mice. In this study, it was demonstrated that systemic administration of GM (100 mg/kg, ip.) is able to reduce spontaneous nociception of inflammatory origin induced by formalin or PGE₂. Besides, the reduction of PGE₂-induced nociception caused by GM (93±15%) was similar to that produced by indometacin (93±12%), a non-selective COX inhibitor. Peripheral (intraplantar) administration of GM (10 µg/paw) also reduced PGE₂-induced nociception similarly to indometacin and KT5720 (non-selective PKA inhibitor). GM (100 mg/kg, ip.) also reduced significantly the thermal hyperalgesia to heat, but not the mechanical allodynia induced by intraplantar injection of PGE₂ and CFA (Complete Freund's Adjuvant), as well as that caused by plantar incision (post operatory model of pain). On the other hand, GM (10 µg/paw) reduced both spontaneous nociception and thermal hyperalgesia to heat induced by forskolin (FSK, adenylyl cyclase activator). When peripherally administrated (intraplantar), GM (10 µg/paw) also reduced spontaneous nociception induced by FSK, as well as KT5720 (10 nmol/paw). Moreover, GM (100 mg/kg, ip) was able to reduce the increase on PKA phosphorylation (p-PKA) induced by FSK in mice paw. Spontaneous nociception induced by PKC activator phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was completely inhibited by GM (100 mg/kg, ip). When evaluated against thermal receptor activators, intraperitoneal administration of GM (30 and 100 mg/kg) reduced the spontaneous nociception induced by capsaicin (TRPV1 agonist), cinnamaldehyde (TRPA1 agonist), menthol (TRPM8 agonist) and acidified saline (ASICs agonist). However, peripheral (intraplantar) administration of GM (30 µg/paw) reduced only the cinnamaldehyde-induced nociception (70±4%). The nociception

observed in PGE₂ model was completely dependent on TRPV1+ afferent fibers. Furthermore, at the doses that promote antinociceptive effect, GM caused no sedative effect and did not alter mice body weight. However, daily administration (11 days) of GM promoted an increase in spleen weight, with no effect on the weight of heart, lungs, liver and kidneys. Also, GM did not promote any significant hematologic or biochemical alteration. Together, the data presented in this study demonstrate that GM is able to reduce acute and persistent nociception (pain), mainly of inflammatory origin, by a mechanism that is dependent on inhibition of signaling pathways activated by PGE₂ (cAMP/PKA) and TRP channels, mainly TRPV1 and TRPA1. Thus, GM is a molecule with great potential for further development of drugs with therapeutic interest for pain control.

Keywords: Polysaccharide, Glucomannan, Antinociception, Pain, PGE₂, TRPV1, TRPA1, PKA, TRPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia dos nociceptores e fibras aferentes primárias.....	33
Figura 2 - Eventos induzidos por lesão tecidual relacionados a nocicepção e dor.....	36
Figura 3 - Via de sinalização da PGE ₂ em neurônios sensoriais.....	40
Figura 4 - Possível relação entre ativação de canais TRPs, temperatura e as sensações percebidas.....	43
Figura 5 - Foto do fungo liquenizado <i>Heterodermia obscurata</i>	56
Figura 6 - Estrutura proposta para glucomanana obtida do líquen <i>H. obscurata</i>	64
Figura 7 - Esquema de administração da PGE ₂ e GM e das avaliações de dor espontânea, hiperalgesia térmica e alodinia mecânica.....	69
Figura 8 - Esquema de administração da FSK e GM e as avaliações de dor espontânea e hiperalgesia ao calor.....	72
Figura 9 - Esquema da ablação de fibras que expressam TRPV1, do envolvimento dessas fibras na nocicepção induzida por PGE ₂ e no efeito da GM.....	77
Figura 10 - Esquema de administração do CFA 80% e GM e as avaliações de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica.....	79
Figura 11 - Esquema de administração da GM, avaliação de efeitos inespecíficos e coleta de amostras.....	82
Figura 12 - Efeito sistêmico da GM na nocicepção espontânea induzida por formalina 2,5%.....	85
Figura 13 - Efeito sistêmico da GM na nocicepção espontânea induzida por PGE ₂	86
Figura 14 - Efeito sistêmico da GM na hiperalgesia térmica ao calor e alodinia mecânica induzidas por PGE ₂	87
Figura 15 - Efeito nociceptivo <i>per se</i> da administração local de GM.....	88
Figura 16 - Efeito local da aplicação de GM, inibidor de COX (indometacina) e inibidor não seletivo de PKA (KT5720) na nocicepção induzida pela PGE ₂	89

Figura 17 - Efeito sistêmico e periférico da GM na nocicepção induzida por FSK.....	90
Figura 18 - Efeito da administração periférica de GM na hiperalgesia ao calor induzida por FSK.....	91
Figura 19 - Efeito da GM no conteúdo de p- PKA ativada por FSK na pata e medula.....	93
Figura 20 - Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de PKC.....	94
Figura 21 - Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPV1.....	95
Figura 22 - Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPA1.....	96
Figura 23 - Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPM8.....	97
Figura 24 - Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais ASICs.....	98
Figura 25 - Avaliação da participação das fibras sensoriais que expressam TRPV1 na nocicepção induzida por PGE ₂ e no efeito antinociceptivo da GM.....	99
Figura 26 - Efeito da administração sistêmica de GM na hiperalgesia ao calor induzida por CFA.....	100
Figura 27 - Efeito da administração sistêmica de GM na alodinia mecânica induzida por CFA.....	101
Figura 28 - Efeito da GM na hiperalgesia ao calor induzida pela incisão plantar.....	102
Figura 29 - Avaliação do peso dos animais após administração sistêmica prolongada de GM.....	103
Figura 30 - Peso dos órgãos vitais após administração prolongada de GM.....	104
Figura 31 - Efeito da GM na potencialização da sedação induzida por cetamina.....	107
Figura 32 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da GM.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros bioquímicos avaliados no soro após aplicação diária da GM.....	105
Tabela 2 - Parâmetros hematológicos avaliados no sangue após aplicação diária da GM.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico
ACs – adenilil ciclases
AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais
ALT – alanina aminotransferase
AML – amilorida
AMPC – monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA – análise de variância
ASIC – canais iônicos sensíveis ao ácido
AST – aspartato aminotransferase
ATP – trifosfato de adenosina
BK – bradicinina
BSA – albumina sérica bovina
CAN – cânfora
CDME – corno dorsal da medula espinal
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA – Adjuvante Completo de Freund
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX – ciclooxigenase
CR3b – receptor para complemento
CREB – proteína de resposta ao AMPc
E.P.M. – erro padrão da média
FDA – Food and Drug Administration
FSK – forskolina
GDNF – fator neurotrófico derivado da glia
GM – glucomanana
GPCRs – receptores acoplados a proteína G
GRAS – aditivo alimentar geralmente seguro
GRD – gânglio da raiz dorsal
GT – gânglio trigeminal
HDL – lipoproteína de alta densidade
HTS – rastreamento de alto rendimento (*high-throughput screening*)
ip. – intraperitoneal
ipl. – intraplantar
it. – intratecal
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL – interleucina
IL-1 β – interleucina-1 beta

IL-6 – interleucina-6
IL-8 – interleucina-8
Indo – indometacina
KOH – hidróxido de potássio
KT5720–(9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[3,4-i][1,6]benzodiazepine-10-carboxy acid hexyl ester
LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LPS – lipopolissacarídeos
MTC – medicina tradicional chinesa
NGF – fator de crescimento do nervo
NMDA – N-metil-D-aspartato
OMS – Organização Mundial da Saúde
NO – óxido nítrico
PAG – substância cinzenta periaquedutal
PALS – bainha periarteriolar
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGE₁ – prostaglandina E₁
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGF₂ – prostaglandina F₂
PGG₂ – prostaglandina G₂
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaglandina I₂
PGs – prostaglandinas
PKA – proteína cinase A
PKC – proteína cinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLC – fosfolipase C
PMA – 13-acetato 12-miristato de forbol
RMN – ressonância magnética nuclear
ROS – espécies reativas de oxigênio
RTX – resiniferatoxina
RVM – bulbo rostroventromedial
SN – Sistema Nervoso
SNC – Sistema Nervoso Central
SP – substância P
TNF alfa – fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

trans-ACPD – ácido (\pm) -1-aminociclopentano-*trans*-1,3-dicarboxílico
TRP – Receptores de Potencial Transitório
TRPA – receptores de potencial transitório da subfamília A (*ankyrin*)
TRPC – receptores de potencial transitório canônico
TRPM – receptores de potencial transitório da subfamília melastatina
TRPML – receptores de potencial transitório da subfamília mucolipina
TRPP – receptores de potencial transitório da subfamília policistina
TRPV1 – receptores de potencial transitório vaniloide
TXA₂ – tromboxano A₂
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VR – vermelho de rutênio
WDR neuron – neurônio de amplo alcance dinâmico
 γ -GT - gama-glutamil transferase

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Protocolos de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	161
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	NOCICEPÇÃO E MECANISMOS DE SENSIBILIZAÇÃO	30
1.1.1	Mudanças adaptativas e mal adaptativas no limiar de dor	35
1.2	ALVOS MOLECULARES E TERAPÊUTICOS NA NOCICEPÇÃO.....	38
1.2.1	Receptores de Potencial Transitório (TRPs)	41
1.3	PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL E A BUSCA POR MOLÉCULAS BIOATIVAS	46
1.3.1	Metabólitos primários e secundários de produtos naturais	49
1.4	FUNGOS LIQUENIZADOS	50
1.5	POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM NATURAL	52
1.5.1	Bioatividade de glucomananas de origem natural	54
1.5.1.1	Glucomanana (GM) obtida do líquen <i>Heterodermia obscurata</i>	55
2	JUSTIFICATIVA	59
3	OBJETIVOS	61
3.1	OBJETIVO GERAL	61
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1	EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	63
4.2	ANIMAIS	64
4.2.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM E ESCOLHA DA DOSE.....	65
4.2.2	Nocicepção induzida por formalina	65
4.3	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DA PGE ₂ /PKA NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM	66
4.3.1	Nocicepção induzida por PGE₂.....	66
4.3.2	Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor	66
4.3.3	Avaliação da alodinia mecânica.....	67

4.3.4	Efeito periférico (local) da GM na nociceção induzida por PGE₂	68
4.3.5	Nociceção induzida por forskolina (FSK)	69
4.3.5.1	Efeito sistêmico da GM.....	69
4.3.5.2	Efeito periférico (local) da GM.....	70
4.3.6	Hiperalgesia ao calor induzida por FSK	70
4.3.7	Preparação de tecidos para ensaio de Western Blot	71
4.3.8	Análise do conteúdo de proteínas por Western Blotting na pata e medula	71
4.4	PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE C (PKC), RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP) E CANAIS IÔNICOS SENSÍVEIS AO ÁCIDO (ASIC) NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM	73
4.4.1	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de 13-acetato-12-miristato de forbol (PMA)	73
4.4.2	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina	73
4.4.3	4.5.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído	74
4.4.4	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de mentol	74
4.4.5	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de salina acidificada	75
4.5	PARTICIPAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+ NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM	75
4.5.1	Injeção intratecal de capsaicina	75
4.5.2	Placa quente	76
4.5.3	Nociceção induzida por PGE₂	76
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GM NO MODELO DE NOCICEÇÃO INFLAMATÓRIA PERSISTENTE INDUZIDA POR CFA	77
4.6.1	Adjuvante Completo de Freund (CFA)	77
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA	79
4.7.1	Incisão plantar e avaliação da hiperalgesia ao calor	79

4.8	AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS INESPECÍFICOS E TÓXICOS DA GM: GANHO/PERDA DE PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS VITAIS E COLETA DE SANGUE.....	80
4.8.1	Peso dos animais.....	81
4.8.2	Coleta de órgãos vitais e sangue	81
4.8.3	Avaliação do possível efeito sedativo.....	82
4.8.4	Drogas e Reagentes	83
4.8.5	Análise estatística.....	83
5	RESULTADOS	85
5.1	EFEITO DA GM NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA	85
5.2	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM NA NOCICEPÇÃO CAUSADA POR PGE ₂	86
5.2.1	Efeito da administração sistêmica GM	86
5.2.2	Efeito da administração sistêmica da GM na hiperalgesia térmica ao calor e alodínia mecânica induzidas por PGE₂.....	87
5.2.3	Efeito periférico (local) da GM na nocicepção induzida por PGE₂.....	88
5.3	PARTICIPAÇÃO DA PKA NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM.....	90
5.3.1	Efeito da GM na nocicepção induzida por FSK....	90
5.3.2	Efeito da GM na hiperalgesia ao calor induzida por FSK	91
5.3.3	Efeito da GM na fosforilação da PKA na pata e medula espinal dos animais	92
5.4	EFEITO DA GM NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE 13-ACETATO 12-MIRISTATO DE FORBOL (PMA).....	93
5.5	EFEITO DA GM NA ESPONTÂNEA INDUZIDA POR AGONISTAS DE CANAIS TRP	94
5.5.1	Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina	94
5.5.2	Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído	95
5.5.3	Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol.....	96

5.5.4	Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina acidificada.....	97
5.6	PARTICIPAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+	98
5.6.1	Avaliação do limiar térmico ao calor e efeito da GM na nocicepção espontânea induzida por PGE₂	98
5.7	EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA PERSISTENTE INDUZIDA POR CFA.....	99
5.7.1	Avaliação da hiperalgesia ao calor.....	99
5.7.2	Avaliação da alodinia mecânica	101
5.8	EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA INDUZIDA POR INCISÃO PLANTAR.....	101
5.8.1	Avaliação da hiperalgesia ao calor.....	101
5.9	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E POSSÍVEIS EFEITOS DELETÉRIOS DO TRATAMENTO COM O GM EM CAMUNDONGOS	102
5.9.1	Peso corporal	102
5.9.2	Peso dos órgãos vitais	103
5.9.3	Efeito da GM sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos	104
5.9.4	Sedação por cetamina	106
6	DISCUSSÃO.....	109
7	CONCLUSÃO	135
	REFERÊNCIAS.....	137

1 INTRODUÇÃO

A contínua interação entre os organismos vivos e o meio ambiente tem um papel importante na otimização e evolução das suas capacidades sensoriais. Ao longo dos anos, os animais desenvolveram mecanismos neurais sofisticados que detectam e discriminam mudanças ambientais. Desta maneira, adquiriram a capacidade de diferenciar a qualidade, localização, intensidade e características temporais de vários estímulos que atuam sobre a superfície do corpo e nos órgãos internos (TERMAN; BONICA, 2003). Esses estímulos, externos ou internos, são detectados e codificados por receptores sensoriais periféricos e todas as informações sobre os parâmetros do estímulo são transportadas na forma de impulso nervoso (potencial de ação) até o Sistema Nervoso Central (SNC). O processamento da sensação acontece em vários locais nos centros superiores e é interpretado pelo cérebro como sensações com características diferentes, que determinam as diferentes modalidades sensoriais, dentre elas as sensações somáticas de temperatura, tato ou dor (BELMONTE; VIANA, 2008). Em outras palavras, o sistema sensorial exibe vias específicas, desde a periferia até o SNC, com subpopulações de neurônios que geram a seletividade para cada forma particular de energia (estímulo) e posteriormente para a percepção (BELMONTE; VIANA, 2008).

A dor é uma entre várias sensações corporais que ocorrem após a estimulação da pele ou de tecidos subcutaneous e é classificada fisiologicamente como uma submodalidade do sistema somatossensorial. Um estímulo doloroso pode desencadear imediatamente um comportamento defensivo, protegendo o corpo antes de ocorrerem lesões graves. A dor também pode promover o aprendizado de comportamentos adaptativos, de modo a evitar situações que possam produzir uma lesão. Além disso, mesmo após a lesão, a dor tem papel de restringir os movimentos e manter posturas específicas, facilitando a recuperação (BASBAUM et al., 2009). Indivíduos que sofrem da doença autossômica de insensibilidade congênita à dor são incapazes de detectar estímulos dolorosos/nocivos, evidenciando que a dor é de fundamental importância para a sobrevivência. Esta evidência deriva do fato que a dor de um objeto afiado, o calor de uma chama ou até mesmo o desconforto

associado com lesões internas, como um osso quebrado, não são sentidas por estes indivíduos. Como resultado, esses indivíduos não exibem comportamentos adequados de proteção contra situações potencialmente nocivas, muitas das quais podem ser fatais (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Ainda, pacientes com perda da sensibilidade à dor devido a neuropatias hereditárias, muitas vezes, mantêm latente algumas infecções que em conjunto levam a automutilação, em especial de dedos e apresentam redução na expectativa de vida (AXELROD; HILZ, 2003; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Assim, a principal função fisiológica da experiência dolorosa é a de alertar para um perigo que pode ameaçar a integridade do organismo.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define o termo 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). Conforme a definição, dor é um conjunto complexo de aspectos emocionais e sensoriais envolvidos na percepção de um estímulo potencialmente nocivo. Envolve não apenas a transdução do estímulo mas também a integração cognitiva e emocional pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os eventos neurais envolvidos na codificação e processamento de estímulos nocivos são chamados de nocicepção. Assim, para que a sensação dolorosa aconteça, um estímulo nocivo tem que ser capaz de ativar receptores sensoriais periféricos específicos (nociceptores) e vias neurais nociceptivas que irão conduzir a informação até o SNC. De fato, em termos fisiológicos um evento só é considerado um estímulo se fizer interação com um receptor sensorial. Neste sentido, os estímulos nocivos são um subconjunto de eventos nocivos que podem ser detectados por nociceptores (LOESER; TREEDE, 2008).

É importante salientar que a dor resulta da ativação do componente sensorial e emocional em humanos. Estudos recentes demonstram que a dor sentida por mamíferos (ex. ratos e camundongos), envolve tanto o componente sensorial como o emocional, e podem ser observados através dos diferentes modelos experimentais de dor. Contudo, os modelos clássicos de investigação de dor permitem avaliar com relativa precisão e reprodutibilidade apenas o componente sensorial, a nocicepção (BARROT, 2012). Mas, quando comparada a outras modalidades sensoriais, uma das principais características da dor é o aspecto

emocional. A motivação, aspectos psicológicos, afetivos, culturais e conseqüentemente, o comportamento relacionado com esses sentimentos, ocorrem por uma interação entre várias estruturas centrais envolvidas na sensação de dor, imprimindo também o caráter subjetivo ao fenômeno (CORTELLI et al., 2013). Em um estudo de 2003, Craig concluiu que a dor é uma “emoção homeostática”. No entanto, a homeostase implica em manter um organismo e seus sistemas em estado dinamicamente estável, conceito que é difícil de conciliar com alguns aspectos da nocicepção e dor, como os aumentos acentuados na respiração, frequência cardíaca e pressão arterial. Tais alterações funcionais podem ser reações apropriadas quando o tecido é lesado, mas fogem do objetivo usual de homeostase (CRAIG, 2003; PERL, 2011).

A dor é um complexo fenômeno subjetivo que, mesmo com uma vasta literatura sobre o tema, ainda apresenta lacunas no entendimento dos seus processos básicos e patológicos. Contudo, atualmente pode-se classificar a dor segundo algumas características, como o seu mecanismo de origem e sua duração (LOESER; TREEDE, 2008; JULIUS; BASBAUM, 2001). Quanto a sua origem, pode ser classificada em: *Dor nociceptiva*, gerada por uma lesão que ativa diretamente os nociceptores em tecidos periféricos, tem o propósito biológico/homeostático de proteção e alerta; *Dor neuropática*, que surge como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, podendo apresentar alterações periféricas ou centrais; e *Dor inflamatória*, que está associada a uma inflamação ativa e pode ser classificada também como dor nociceptiva. Entretanto, na dor inflamatória crônica ocorrem alterações no sistema nociceptivo, como a sensibilização de nociceptores, o que a descaracteriza como dor nociceptiva. Ainda, vem-se considerando e discutindo o conceito de dor disfuncional, onde a sensação dolorosa ocorre mesmo sem haver qualquer tipo de lesão, alteração no sistema nervoso ou presença de inflamação (LOESER; TREEDE, 2008; JULIUS; BASBAUM, 2001). Utilizando o critério de duração, a dor é classificada em *aguda*, quando está relacionada temporalmente à doença ou lesão específica que gera a ativação direta dos nociceptores. Após a recuperação/cura ou retirada do estímulo nocivo, a dor desaparece. Contudo, a dor pode superar o tempo normal de cura, persistindo por meses e até anos, tornando-se *crônica*, passa a ser um estado de doença e perde seu

papel protetor (REN; DUBNER, 2010; JULIUS; BASBAUM, 2001; PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002).

Além da duração, diferenças entre a dor aguda e crônica acabam por enfatizar o fato de que a dor não é gerada por um sistema imutável, mas sim por uma complexa rede de moléculas e circuitos não-neuronais e neuronais com grande capacidade para plasticidade e manutenção dos estados dolorosos (BASBAUM et al., 2009). Neste sentido, eventos como a sensibilização de neurônios nociceptivos periféricos e centrais parecem estar associados à persistência da dor e precedem as alterações na percepção de estímulos periféricos, como observado na hiperalgesia (uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nociceptivo) e na alodinia (estímulos normalmente inócuos induzem dor) (SACHS et al., 2009; REN; DUBNER, 2010; JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor aguda e/ou crônica ainda representam um enorme problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 20% da população mundial adulta sofre de algum tipo de dor crônica. Associada a incidência da dor crônica está a falta adequada do seu tratamento, tendo em vista que os medicamentos disponíveis não são eficazes para todos os tipos de dor e a sua utilização contínua leva a vários efeitos indesejados que comprometem a adesão dos pacientes ao tratamento. Assim, o resultado final destes efeitos é que grande parcela de portadores de dor acabam apresentando várias disfunções físicas e emocionais que culmina em incapacidade transitória ou permanente. Desta maneira, a dor tem grande impacto na qualidade de vida e capacidade produtiva desses indivíduos (DOBKIN; BOOTHROYD, 2008; HANSEN et al., 2011).

1.1 NOCICEPÇÃO E MECANISMOS DE SENSIBILIZAÇÃO

A partir de experimentos fisiológicos conduzidos no início do século XX, Charles Sherrington evidenciou a existência de grupos de terminações nervosas, distribuídas pela pele, que eram ativadas por lesão tecidual. Também observou que um estímulo seria nocivo quando apresentasse intensidade e qualidade suficiente para gerar reflexo de retirada, respostas autonômicas e dor, processos que coletivamente chamou de “reação nociceptiva”. E definiu o aparato neural responsável por

detectar estímulos nocivos como “nervos nociceptivos” ou nociceptores e cunhou o termo nocicepção (WOOLF; MA, 2007). Neste sentido, durante os últimos 50 anos, várias provas incontestáveis demonstraram que receptores sensoriais, presentes em terminações de neurônios sensoriais periféricos, atuam como detectores de eventos prejudiciais aos tecidos. E, normalmente, a ativação dos receptores é o evento inicial para o processamento do estímulo nocivo e para a percepção da dor (PERL, 2011; 2007).

A nocicepção é considerada como o componente sensorial da dor e envolve a codificação e processamento do estímulo nocivo. Sua primeira etapa envolve a transdução e codificação de estímulos nocivos por receptores sensoriais específicos, chamados de nociceptores (LOESER; TREEDE, 2008). Estes receptores podem ser ativados por estímulos de origem química, mecânica e/ou térmica de alto limiar. E o seu principal efeito fisiológico é transduzir e codificar características como a localização, intensidade e padrão temporal do estímulo e convertê-lo em um sinal reconhecível para o Sistema Nervoso (SN). Ademais, eles são expressos na terminação periférica livre de grupos heterogêneos de neurônios nociceptivos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Assim como outros neurônios somatossensoriais, os neurônios nociceptivos periféricos são do tipo pseudounipolares e apresentam um único processo axonal que se projeta do corpo celular, dividindo-se em dois ramos. Um ramo periférico, que expressa os nociceptores e inerva o tecido alvo, e um ramo central. No SNC, o ramo do neurônio nociceptivo faz sinapse com neurônios de segunda ordem na medula espinal ou no subnúcleo caudal do trigêmeo, no tronco encefálico. Desta maneira a propagação de impulsos nervosos da periferia para o SNC segue um caminho axonal direto, reduzindo o risco de fracasso na condução (AMIR; DEVOR, 2003; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). O corpo celular dos neurônios nociceptivos periféricos podem estar no gânglio da raiz dorsal (GRD), para estímulos do corpo ou no gânglio trigeminal, para estímulos gerados na cabeça (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). São considerados neurônios excitatórios e utilizam o glutamato como principal neurotransmissor. Também expressam outros componentes, incluindo neuropeptídeos como a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês *CGRP*) e

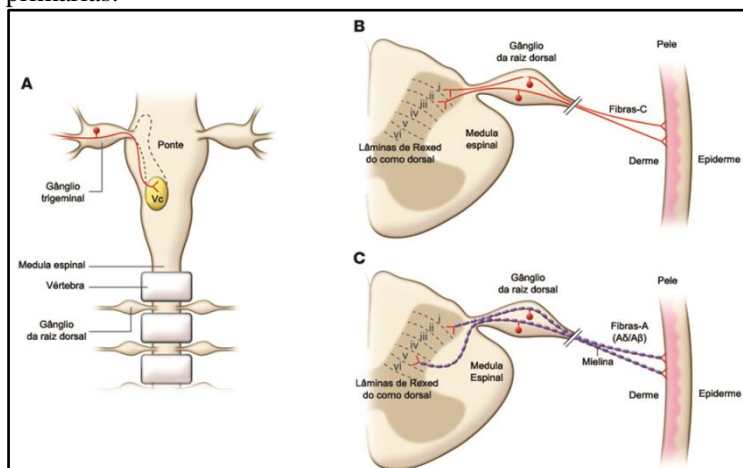
somatostatina que podem potencializar o sinal excitatório (BASBAUM et al., 2009).

As fibras aferentes primárias cutâneas que transmitem o impulso nervoso podem ser classificadas com base na sua sensibilidade a estímulos nocivos, seu diâmetro e velocidade de condução (MILLAN, 1999; BASBAUM et al, 2009). Estudos com humanos e não-humanos revelaram a existência de classes distintas de nociceptores ativados por estímulos nocivos como temperatura extrema ($> 40-45^{\circ}\text{C}$ ou $< 15^{\circ}\text{C}$), pressão intensa ou substâncias químicas. Neste sentido, neurônios que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos são chamados de polimodais (BASBAUM et al., 2009; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Já a velocidade com que o impulso será propagado tem relação direta com o diâmetro do axônio e se a fibra é mielinizada ou não. Com relação a esses aspectos, podemos classificar as fibras aferentes primárias em três tipos (MILLAN, 1999). As *fibras C* são neurônios sem mielina, de pequeno diâmetro ($0.4 - 1.2 \mu\text{m}$) e com condução lenta ($0,5 - 2,0 \text{ m/s}$). Proporcionalmente, cerca de 70% dos aferentes primários cutâneos são fibras C amplamente distribuídas pelo corpo, o que reduz a resolução da localização de estímulos. A maioria dos nociceptores são encontrados neste tipo de fibra, responsáveis por transmitir a dor “secundária/tardia”, além de estímulos inócuos. As *fibras A δ* apresentam calibre médio (de $2,0 - 6,0 \mu\text{m}$), são mielinizadas e com velocidade intermediária de condução ($12 - 30 \text{ m/s}$). Essas fibras correspondem a 10% das fibras cutâneas e tem distribuição mais localizada e transmitem a dor “rápida/inicial” e também as informações de estímulos mecânicos inócuos (MILLAN, 1999). As *fibras A β* possuem um grande calibre (maior que $10 \mu\text{m}$), são mielinizadas e com condução rápida ($3 - 100 \text{ m/s}$). Em circunstâncias normais, essas fibras só transmitem informação de estímulos inócuos, como um leve toque (MILLAN, 1999; BASBAUM, 2009). Assim, a propagação de estímulos nocivos é feita através de duas principais classes de aferentes nociceptivos, as fibras C e A δ .

O ramo central de aferentes que tem seu corpo celular no GRD chega através da raiz dorsal ao corno dorsal da medula espinal (CDME) (Figura 1). O CDME é um centro de transmissão altamente organizado em lâminas, que diferem quanto à sua anatomia e propriedades elétricas (BASBAUM; JESSELL, 2000). As fibras aferentes nociceptivas terminam predominantemente

nas lâminas marginais I e II, e na lâmina profunda V do CDME (Figura 1) (PERL, 2007). Já as fibras mielinizadas A δ projetam o ramo central principalmente para as lâminas I e V, enquanto as fibras C projetam-se mais superficialmente, para lâminas I e II. Em contrapartida, os aferentes primários de baixo limiar que respondem ao toque leve, fibras A β , chegam a lâminas mais profundas (III, IV e V) do CDME (Figura 1B e C) (MILLAN, 1999).

Figura 1 – Anatomia dos nociceptores e fibras aferentes primárias.



Legenda: Em (A) neurônios somatossensoriais estão localizados em gânglios periféricos (gânglio trigeminal e gânglios da raiz dorsal), próximos a coluna vertebral e medula espinal. Os neurônios aferentes projetam centralmente para o tronco encefálico (subnúcleo trigeminal caudal; Vc) e corno dorsal da medula espinal e periféricamente para a pele e outros órgãos. (B) A maioria dos nociceptores está presente em fibras sem mielina, com pequeno diâmetro (fibras C, vermelho). Seu ramo periférico inerva a pele (derme e/ou epiderme) e o ramo central faz sinapse nas lâminas superficiais I e II do corno dorsal. (C) Fibras A são mielinizadas e geralmente conduzem com velocidades mais altas (azul) e fazem projeção central principalmente nas lâminas I e V do corno dorsal.

Fonte: Adaptado de Dubin e Patapoutian, 2010.

O CDME funciona como uma estação de controle da transmissão nociceptiva, onde as fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de transmissão e interneurônios locais (PERL, 2007). Um tipo diferente e bastante estudado de neurônio espinal de alto limiar, conhecido como neurônio de amplo alcance dinâmico (*WDR neuron*), também recebe sinais de entrada a partir de neurônios somatossensoriais no CDME. Estes neurônios são amplamente distribuídos nas camadas mais profundas (lâminas V-VI) do corno dorsal. Esses neurônios espinais multimodais são pouco ativados por estímulos mecânicos inócuos. Contudo, estímulos mecânicos e térmicos nocivos de alta intensidade excitam fortemente os neurônios WDR (PERL, 2007).

A informação periférica nociceptiva ascende ao SNC através de neurônios espinais de transmissão, que se projetam para o bulbo, mesencéfalo e tálamo. Estas estruturas, por sua vez, emitem projeções para o córtex somatossensorial e córtex cingulado anterior, onde aspectos sensório-discriminativos e cognitivo-afetivos da dor, respectivamente, serão integrados à informação periférica (PERL, 2007; KENSHALO; NAFE, 1962). Desta maneira, a informação nociceptiva chega até áreas corticais por vias ascendentes, como a via espinotalâmica, em que o sinal nociceptivo é transmitido ao córtex somatossensorial através do tálamo, ocorrendo a percepção da localização e intensidade do estímulo nocivo. E a via espinoparabraquial, em que a informação é transmitida ao córtex insular e cingulado através da amígdala, contribuindo para o componente emocional da percepção da dor (BASBAUM et al., 2009). Essa transmissão ascendente também é responsável pela ativação de neurônios localizados no bulbo rostroventromedial (RVM, *rostral ventral medulla*) e na substância cinzenta periaquedutal (PAG) no mesencéfalo, estruturas centrais que estão relacionadas com os mecanismos descendentes de controle da dor (JULIUS; BASBAUM, 2001).

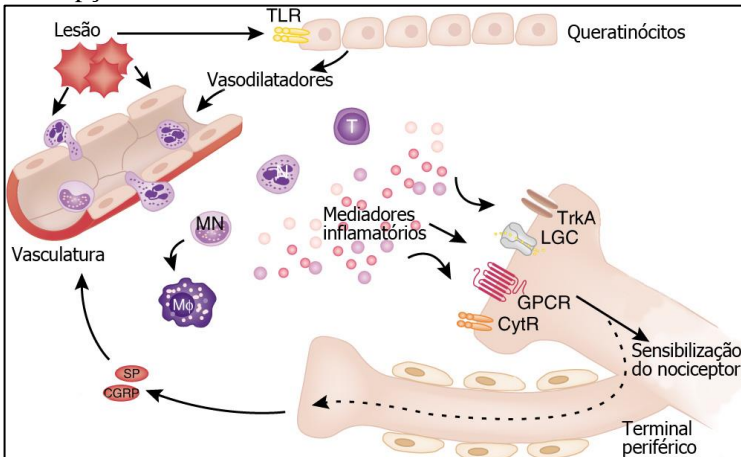
No CDME interneurônios inibitórios e excitatórios locais, bem como vias descendentes inibitórias e facilitadoras, modulam a transmissão de sinais nociceptivos, contribuindo para a priorização da percepção da dor em relação a outras necessidades comportamentais concorrentes e demandas homeostáticas (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

1.1.1 **Mudanças adaptativas e mal adaptativas no limiar de dor**

Comumente, alterações nas vias envolvidas na nocicepção levam à dor e até a alteração na sua percepção, como observado em hipersensibilidades (hiperalgesia e alodinia). Tais alterações podem ocorrer de tal forma que a dor supera a sua função fisiológica de atuar como um sistema de alerta (REN; DUBNER, 2010). Até certo ponto isto pode ser visto como uma extensão do processo de cicatrização normal, onde o dano tecidual ou neural provoca um aumento da sensibilidade a estímulos, na tentativa de promover proteção da área lesionada (REN; DUBNER, 2010).

O dano tecidual muitas vezes é acompanhado pela produção e/ou liberação de fatores endógenos que são liberados por células não-neuronais residentes e/ou que se infiltram na área da lesão (incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos) e promovem a ativação dos nociceptores (Figura 2) (REN; DUBNER, 2010; KIDD; URBAN, 2001).

Figura 2 – Eventos induzidos por lesão tecidual relacionados à nocicepção e dor.



Legenda: O dano tecidual inicia a liberação de mediadores que ativam receptores toll-like (do inglês *TLRs*) em queratinócitos e mastócitos (MC) próximo ao terminal nociceptivo. Vasodilatadores são liberados promovendo a adesão e transmigração das células imunitárias, como células T (T), neutrófilos (N), monócitos (MN) e recrutamento de macrófagos (MO). Estas células, uma vez ativadas, liberam mediadores inflamatórios que atuam sobre receptores expressos em nociceptores vizinhos, induzindo sensibilização periférica. A Substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) liberados pelo nociceptor promovem vasodilatação e extravasamento de células imunitárias. Alvos: receptores de citocina (CYTR), receptores acoplados à proteína G (*GPCR*), canais operados por ligantes (LGC) e receptor tirosina cinase de tipo 1 (TrkA).

Fonte: Adaptado de Ren e Dubner, 2010.

A maioria dos nociceptores ativadoS está presente em fibras C polimodais e quando estimulados, ocorre um extravasamento de plasma com moléculas bioativas (por exemplo, citocinas) para a região periférica que contém os nociceptores. Centralmente, essas fibras podem propagar impulsos antidromicamente, causando a liberação de substâncias algícas e pró-inflamatórias nas ramificações periféricas nociceptivas de áreas próximas à lesão, que incluem peptídeos como a substância P, CGRP e somatostatina, entre outros (MENSE et al., 2008; DUBIN; PATAPOTUIAN, 2010).

Esses fatores liberados no interstício são coletivamente chamados de "sopa inflamatória" e representam uma grande variedade de moléculas de sinalização, incluindo neurotransmissores, peptídeos (substância P, CGRP, bradicinina), eicosanóides e lipídeos relacionados (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides), neurotrofinas, citocinas e quimiocinas, bem como proteases extracelulares e prótons. Ademais, estas substâncias produzem vários efeitos autócrinos e parácrinos sobre células endoteliais, epiteliais e células imunes residentes (ex., células de Langerhans) ou sistêmicas (DUBIN; PATAPOUTUIAN, 2010; RICHARDSON; VASKO, 2002), e promovem vasodilatação arteriolar (através de CGRP) e/ou aumento da permeabilidade vascular com consequente aumento da migração de células e maior liberação de mediadores endógenos (DUBIN; PATAPOUTUIAN, 2010; RICHARDSON; VASKO, 2002). Notavelmente os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície capazes de reconhecer e responder a cada um destes agentes pró-inflamatórios ou álgicos. Tais interações promovem a excitabilidade dos aferentes primários, aumentando sua responsividade a estímulos, processo conhecido como sensibilização periférica (WOOLF; MA, 2007; LOESER; TREEDE, 2008).

O termo sensibilização pode ser usado tanto para redução quanto aumento no limiar de ativação em resposta a um estímulo supralimiar (LOESER; TREEDE, 2008). Por exemplo, após queimadura promovida pela exposição solar, ocorre sensibilização temporária da área afetada. Como resultado, estímulos normalmente inócuos, como o toque, são percebidos como doloroso (um fenômeno conhecido como alodinia) ou, estímulos nocivos provocam dor de maior intensidade (referido como hiperalgesia) (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Essas alterações na excitabilidade de neurônios nociceptivos também são frequentemente associadas à dor persistente (patológica), como em neuropatias, dor crônica inflamatória e artrite (PERL, 2007; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

1.2 ALVOS MOLECULARES E TERAPÊUTICOS NA NOCICEPÇÃO

O componente sensorial da dor, a nocicepção, envolve a ação de mediadores comuns ao processo inflamatório, principalmente em casos de dor persistente (BENNETT, 2000; JI; STRICHARTZ, 2004). Estudos pioneiros mostraram claramente o envolvimento de prostanóides na indução e manutenção da sensibilização e dor, em especial demonstraram que a administração subcutânea de prostaglandina E_1 (PGE_1) era capaz de causar acentuada hiperalgesia em humanos e ainda, que a prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaciclina I_2 (PGI_2) produziam os mesmos efeitos em ratos e cães (FERREIRA, 1972; ZEILHOFER, 2007). Desde então, foi postulado que as prostaglandinas (PGs) têm capacidade de sensibilizar nociceptores através dos receptores para prostanóides expressos na superfície de terminações periféricas. Progressivamente descobriu-se que esses mediadores também exercem seus efeitos pró-nociceptivos no SNC, principalmente na medula espinal (ZEILHOFER, 2007).

Os prostanóides são mediadores lipídicos formados a partir do ácido araquidônico (AA), que é um produto da hidrólise de fosfolipídios de membrana do retículo endoplasmático liberado por ação da fosfolipases A_2 (PLA_2) (ZEILHOFER, 2007; SAMAD; SAPIRSTEIN; WOOLF, 2002). A primeira reação da via de síntese de prostanóides ocorre pela ação de ciclooxigenases (COX; COX-1 e COX-2), que convertem o AA no metabólito prostaglandina G_2 (PGG_2) e em seguida em prostaglandina H_2 (PGH_2). A seguir, através da ação de sintases tecido-específicas (sintases de prostaglandinas, PG sintases) ocorre a metabolização da PGH_2 em isoformas de PGs biologicamente ativas que incluem PGD_2 , PGF_2 , PGE_2 , e PGI_2 e tromboxano A_2 (TXA_2), coletivamente conhecidas como prostanóides (SAMAD; SAPIRSTEIN; WOOLF, 2002; ZEILHOFER, 2007).

No final da década de 1970, Vane e colaboradores demonstraram que o efeito farmacológico da aspirina (ácido acetilsalicílico) era dependente da inibição da COX e esta importante descoberta foi reconhecida em 1982, através da concessão do Prêmio Nobel em Medicina. Atualmente, é reconhecido que a aspirina e outros anti-inflamatórios não

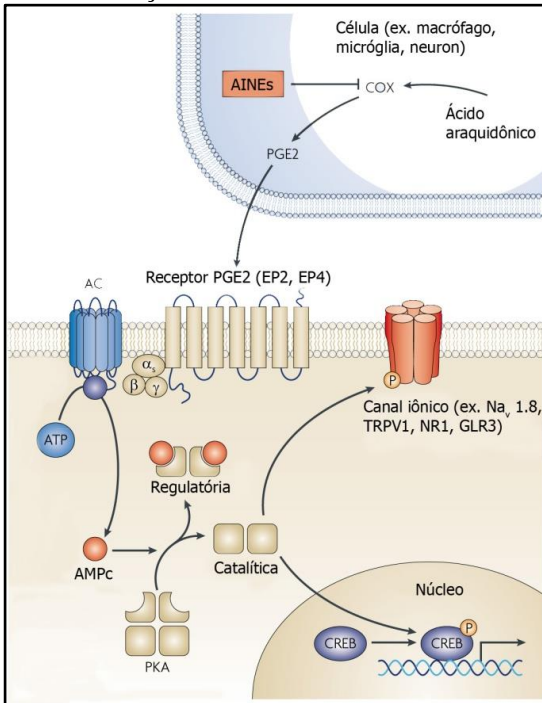
esteroidais (AINEs), utilizados como analgésicos e anti-inflamatórios, inibem a síntese de prostaglandinas através da inibição da COX-1 e 2 (SAMAD; SAPIRSTEIN; WOOLF, 2002). A COX-1 tem expressão geralmente constitutiva e é encontrada na maioria das células. Já a COX-2 tem baixa expressão, que aumenta de maneira acentuada após estimulação (lesão tecidual, inflamação) particularmente em células do sistema imune (TILLEY et al., 2001). Essas enzimas participam ativamente da sinalização envolvida no processamento da nocicepção, tanto periféricamente quanto em nível central, principalmente na medula espinal.

A PGE_2 é um mediador chave na sinalização da dor participando da sensibilização das vias nociceptivas periféricas e espinais, contribuindo para o surgimento de hipersensibilidades (MORIYAMA et al., 2005; FERREIRA, 1972; SACHS et al., 2009). A PGE_2 pode atuar em quatro alvos moleculares distintos, os receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (do inglês *GPCRs*) denominados de receptor prostanóide EP1, EP2, EP3 e EP4 (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Esses receptores são expressos em vários tecidos e células, incluindo neurônios sensoriais primários (KASSUYA et al., 2007; NARUMIYA, 2009). Os receptores EP2 e EP4 são acoplados a uma proteína G estimulatória (Gs) que ativa adenilil ciclases (ACs) e promove aumento intracelular da concentração de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Figura 3). Já a ativação do receptores EP1 induz o aumento da concentração intracelular de íons cálcio via proteína Gq e ativação da fosfolipase C (PLC), enquanto o receptor EP3 está ligado a uma proteína G inibitória (Gi), que reduz a concentração de AMPc por inibir a ACs (NARUMIYA, 2009). Diversos estudos claramente mostram o envolvimento dos receptores EP e suas vias de sinalização na dor e hiperalgesia induzida por PGE_2 (MORIYAMA et al., 2005; SACHS et al., 2009; SAMAD; SAPIRSTEIN; WOOLF, 2002). Ainda, Kassuya e colaboradores (2007) observaram que a nocicepção espontânea e a ativação da proteína cinase A (PKA) e C (PKC) induzida pela PGE_2 , foi significativamente reduzida por antagonistas dos receptores EP3 e EP4 (L-826266 e L-161982, respectivamente).

Classicamente, no local da lesão a síntese de PGE_2 e outros mediadores que estimulam a proteína Gs ativam ACs (PIERRE et al., 2009), as quais catalisam a conversão de trifosfato de adenosina (ATP) no segundo mensageiro AMPc. Em

mamíferos já foram identificadas nove isoformas de ACs ligadas à membrana e uma isoforma solúvel. Ademais, as ACs são amplamente expressa em todos os tecidos, incluindo SN (SEIFERT et al., 2012; PIERRE et al., 2009).

Figura 3 - Via de sinalização da PGE₂ em neurônios sensoriais.



Legenda: A estimulação de receptores EP2 e EP4 por PGE₂ em neurônios sensoriais centrais que estão acoplados a proteína Gs pode ativar adenilil ciclases (ACs) que catalisam a conversão de ATP em AMPc. O AMPc formado liga-se a subunidade reguladora da subunidade catalítica da PKA e aumenta excitabilidade neuronal durante a dor aguda e crônica, através da fosforilação dependente de PKA de canais iônicos (como Nav1.8, TRPV1 e NMDA, entre outros) em neurônios sensoriais periféricos e centrais. Também induz fosforilação da proteína de resposta ao AMPc (CREB), que medeia a expressão gênica em neurônios sensoriais centrais. Uma das classes mais importantes de analgésicos, os AINEs, atuam indiretamente pela inibição da síntese de AMPc através da inibição de ciclooxigenases (COX), que normalmente conduzem à síntese de PGs.

Fonte: Adaptado de Pierre et al., 2009.

De fato, agentes inibidores de ACs, que portanto, promovem a inibição da formação de AMPc, apresentam importante efeito analgésico em vários modelos de dor aguda e crônica em roedores (PIERRE et al., 2009). Salienta-se também que a resposta nociceptiva foi reduzida em camundongos *knockout* para a AC, confirmando o envolvimento de ACs no desenvolvimento de dor aguda e crônica (PIERRE et al., 2009). Ademais, foi demonstrado que a ativação de todas as etapas da cascata do segundo mensageiro AMPc são necessárias para a indução e manutenção da hiperalgesia em roedores (ALEY; LEVINE, 1999). Neste contexto, o aumento de AMPc em neurônios nociceptivos primários está associado com a ativação da proteína cinase A (PKA) *in vivo* e *in vitro* (SACHS et al., 2009) e também com a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂ (SACHS et al., 2009; MALMBERG et al., 1997; ALEY; LEVINE, 1999; CUNHA et al., 1999; KASSUYA et al., 2007).

Assim como a PKA, a PKC tem papel crucial no desenvolvimento de hiperalgesia e inflamação por prostaglandinas (ALEY; LEVINE, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que quando ativadas indiretamente por receptores de PGE₂ (via receptores EP/AC/AMPc), a PKA e a PKC promovem a fosforilação de receptores purinérgicos (P₂X₃) e receptores de potencial transitório (TRP), como TRPV1 (vanilóide 1) alterando o limiar de ativação desses receptores. Desta forma, a estimulação persistente de receptores e canais e conseqüentemente das vias de sinalização presentes em nociceptores, em especial da PKA e PKC, contribuem para o processo de sensibilização periférica e conseqüentemente o surgimento de hiperalgesia (MEVES, 2006).

1.2.1 Receptores de Potencial Transitório (TRPs)

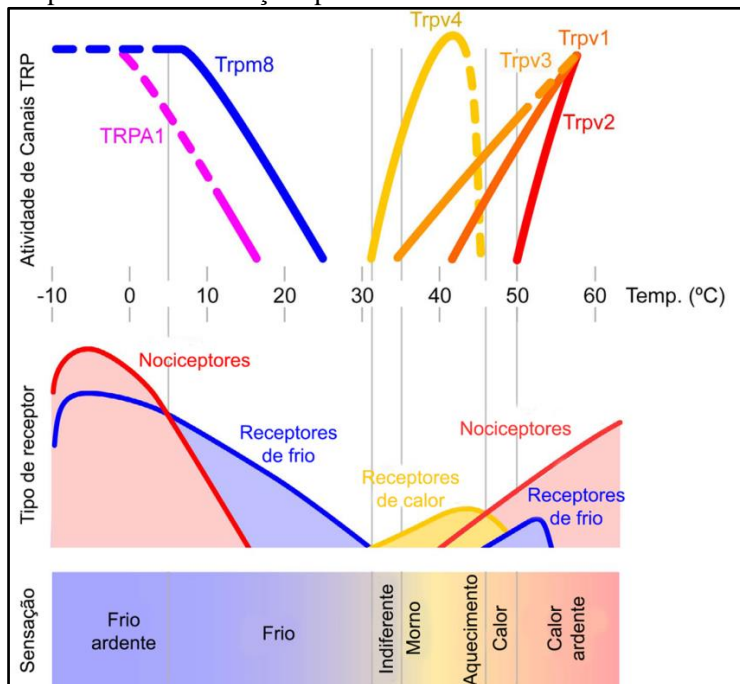
Os receptores de potencial transitório (*Transient Receptor Potential, TRPs*) pertencem a uma superfamília de 28 canais catiônicos com diferentes funções, participando de várias sensações sensoriais como a visão, olfato, audição e em algumas percepções somáticas como a de estímulos mecânicos, de temperatura e da dor (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007). Neste sentido, os canais TRP parecem estar envolvidos em diversos eventos além da ativação de neurônios, como a liberação de neurotransmissores, ações ao nível espinal e liberação de

mediadores inflamatórios (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007).

Os TRPs são agrupados, de acordo com a homologia na sequência de proteínas, em seis famílias principais: canal TRP canônico (TRPC), canal TRP vanilóide (TRPV), canal TRP da subfamília melastatina (TRPM), canal TRP da subfamília A (*ankyrin*; TRPA), TRP da subfamília policistina (TRPP) e canal TRP da subfamília mucolipina (TRPML) (MORAN et al., 2011). Notavelmente, apesar de a maioria dos integrantes da superfamília de TRPs compartilhar um baixo grau de similaridade estrutural (MORAN et al., 2011), vários membros de todas as subfamílias são ativados por produtos naturais (BANDELL et al., 2004; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Um exemplo clássico é o TRPV1, o primeiro canal TRP identificado (década de 90), ativado por capsaicina e resiniferatoxina (RTX) (STUCKY et al., 2009; CATERINA et al., 1997). Além de receptores para produtos naturais, os TRPs são importantes transdutores sensoriais, relacionados especialmente com a detecção da temperatura e da dor (Figura 4). De fato, os canais da família TRPV estão associados à percepção do calor, sendo TRPV1 e TRPV2 ativados por calor nocivo (na faixa de 43°C e 52°C, respectivamente), enquanto TRPV3 e TRPV4 são ativados por calor não nocivo (de 34 a 38°C e de 27°C a 34°C, respectivamente). Já os canais TRPA1 e TRPM8 estão associados à percepção do frio, sendo TRPA1 ativado por frio nocivo (abaixo de 17°C) enquanto TRPM8 está associado com a sensação “refrescante” ocasionada por temperaturas ao redor de 23 a 26°C (CALIXTO et al., 2005; MONTELL, 2005; CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007).

Os canais da subfamília TRP representam a maior parte dos transdutores/sensores moleculares que detectam estímulos nocivos, participando ativamente da nocicepção e percepção da dor (MICKLE; SHEPHERD; MOHAPATRA, 2015).

Figura 4 – Possível relação entre ativação de canais TRPs, temperatura e as sensações percebidas.



Legenda: Quadro superior: Representação esquemática do perfil de ativação termal de vários canais TRPs (quando expressos em um sistema recombinante) expressos em neurônios sensoriais e/ou células da pele. Quadro intermediário: Representação esquemática de impulsos nervosos em vários receptores sensoriais cutâneos durante a estimulação dos seus campos receptivos, indicados na escala termal. Quadro inferior: Qualidades das sensações evocadas em humanos por aplicação de diferentes temperaturas na pele.

Fonte: Adaptado de Belmonte e Viana, 2008.

Neste sentido, os canais TRPV1 e TRPA1 têm sido descritos como moduladores importantes na transdução de estímulos químicos, mecânicos e térmicos (MONTELL, 2005; STUCKY et al., 2009; MORAN et al., 2011) e na sensibilização de aferentes primários. Além disto, eles estão diretamente relacionados com os estados de hipersensibilidade mecânica e térmica presente nos processos dolorosos crônicos (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007; BASBAUM et al.,

2009; STUCKY et al., 2009). Corroborando com essa informação, estudos com roedores demonstraram que a ativação de canais TRPV1 é fundamental para a hiperalgesia térmica em condições inflamatórias (CATERINA et al., 1997; DAVIS et al., 2000). Além disso, um estudo com camundongos geneticamente modificados (*knockout*) para o TRPV1 mostrou que os animais que não expressavam canais TRPV1 foram significativamente menos sensíveis à estimulação aguda por calor nocivo (CHRISTOPH et al., 2008). Os canais TRPV1 são expressos nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, principalmente fibras C. São considerados canais iônicos não seletivos a cátions, embora tenham alta permeabilidade ao Ca^{2+} (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

Os canais TRPV1 são ativados por calor acima de 42°C , por prótons, por metabólitos do ácido araquidônico e capsaicina, entre outros. O ATP, a bradicinina, o glutamato, a histamina, a serotonina e os fatores neurotróficos como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) induzem sensibilização, reduzindo seu limiar de ativação (PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

Em estados inflamatórios ocorre a ativação direta desses canais e mediadores como bradicinina e PGE_2 aumentam a atividade da PLC e de proteína cinase, como PKA e a PKC. Essas cinases, por sua vez, levam à sensibilização de canais TRPV1 e ativação de canais TRPA1 (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007; AKOPIAN, 2011; PREMKUMAR; ABOOJ, 2013). Assim os canais TRPV1, os canais da subfamília TRPA1 são expressos em neurônios do GRD, gânglio GT e gânglios nodosos, em uma subpopulação específica principalmente de fibras C e A δ que co-expressam o TRPV1 (DIOGENES; AKOPIAN; HARGREAVES, 2007; STORY et al., 2003). Uma grande variedade de substâncias irritantes estimulam canais TRPA1, como isotiocianato de alila (proveniente do óleo de mostarda), alicina (proveniente do alho), cinamaldeído (proveniente da canela), tetrahydrocannabinol, bradicinina (via receptor B_2), produtos do estresse oxidativo como peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonenal, e ainda por prostaglandinas do tipo ciclopentenona, como a 15-deoxi-prostaglandina J_2 (15d-PG J_2) (STORY et al., 2003; BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; MORAN et al., 2011; PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

Atualmente os canais TRPA1 são considerados sensores que detectam frio nocivo, mas também são sensíveis à pressão mecânica intensa (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007). Eles são considerados transdutores polimodais não seletivos à cátiões e altamente permeáveis ao Ca^{2+} (LAING; DHAKA, 2015). Embora controverso em relação à sensibilidade normal ao frio, tem-se demonstrado o envolvimento dos canais TRPA1 na hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio em diversos modelos comportamentais de dor (OBATA et al., 2005; CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007). Ainda, a expressão de canais TRPA1 é induzida após lesão nervosa ou inflamatória, e o bloqueio desses canais resulta na diminuição da hiperalgesia ao frio (OBATA et al., 2005).

Ainda em relação à detecção do frio nocivo, estudos indicam que canais da subfamília TRPM8 desempenham um papel central e essencial na transdução e percepção de temperaturas frias (Figura 4). E também, a sensibilidade ao frio é intensificada em determinadas condições inflamatórias e de dor neuropática, resultando no desenvolvimento de alodinia (COLBURN et al., 2007; DHAKA et al., 2007). Entretanto, o papel fisiopatológico na hiperalgesia térmica ao frio e mecânica permanece indefinido (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007).

Uma vez que o processamento nociceptivo é complexo e envolve diversas vias, mediadas por diferentes substâncias, mensageiros, receptores e canais iônicos, potenciais alvos para intervenção terapêutica podem ocorrer em qualquer lugar em todo o sistema/via da dor (LAING; DHAKA, 2015). Os analgésicos são fármacos usados para tratar e prevenir a dor em diversas situações, como no pré e pós-operatório, em afecções dolorosas comuns (p. ex., cefaleia, trauma e queimaduras), em muitas emergências clínicas e cirúrgicas e em doenças terminais. A escolha e a via de administração dos analgésicos dependem da natureza e da duração da dor e costumam ser usados de maneira progressiva, iniciando com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) suplementados inicialmente por analgésicos opioides fracos (p. ex., codeína, dextropropoxifeno, tramadol) e depois por opioides fortes (p. ex., morfina, fentanila). A dor neuropática crônica costuma ser não responsiva aos opioides e é tratada com antidepressivos tricíclicos (p. ex., amitriptilina) ou

anticonvulsivantes (p. ex., carbamazepina, gabapentina) (RANG et al., 2011).

Contudo a administração de analgésicos frequentemente causa efeitos secundários deletérios. Um exemplo clássico são os analgésicos que atuam em receptores opioides, os quais suprimem a atividade de neurônios responsáveis por propagar a informação nociceptiva, mas também podem induzir euforia, dependência, sedação, constipação e depressão respiratória (LAING; DHAKA, 2015). Ainda se faz necessária a busca pela compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na origem da dor crônica, com o objetivo de encontrar tratamentos mais eficazes e com baixos efeitos colaterais. De fato, atualmente não existe tratamento satisfatório e nem medidas adequadas e específicas para o controle de muitos estados de dor crônica (WOOLF; MANNION; 1999; MENDELL; SAHENK, 2003).

1.3 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL E A BUSCA POR MOLÉCULAS BIOATIVAS

Os primeiros registros de produtos naturais utilizados para fins medicinais foram descritos na Mesopotâmia (2600 aC), e documentavam o uso de óleos de *Cupressus sempervirens* (Cipreste) e de espécies do gênero *Commiphora* (Mirra), que ainda são usadas atualmente para tratar a tosse, resfriados e inflamações. Os egípcios documentaram seus conhecimentos farmacêuticos no Papiro de Ebers (2900 aC), onde se encontra o registro de mais de 700 medicamentos à base de plantas que variam entre pílulas, infusões e pomadas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Existem muitos exemplos históricos de como os produtos naturais foram úteis não somente como produtos medicinais, mas também possibilitaram a descoberta de novos aspectos da fisiologia. Por exemplo, um digitalico obtido da planta popularmente conhecida como dedaleira (*Digitalis purpurea*) mostrou o papel da bomba de sódio-potássio-ATPase, enquanto a morfina extraída da papoula (*Papaver somniferum*) apontou o caminho pelo qual receptores são afetados por opioides endógenos. Substâncias como a muscarina, nicotina e tubocurarina também foram úteis por ajudarem a explorar os diferentes tipos de receptores para

acetilcolina (HARVEY, 2008; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Além da utilização empírica e relevância para o entendimento de aspectos fisiológicos, historicamente, moléculas encontradas em produtos naturais (plantas, microorganismos, fungos, animais) foram a principal fonte de preparações medicinais. Estima-se que até o desenvolvimento de técnicas mais refinadas para triagem/rastreio (*screening*) e a era pós genômica, cerca de 80% dos medicamentos continham produtos naturais ou foram inspirados em um composto ou molécula natural (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Informações sobre novos medicamentos levantadas entre o período de 1981 a 2007 indicaram que quase metade das drogas aprovadas antes de 1994 foram baseadas em produtos naturais (HARVEY, 2008; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012), de 2005 a 2007 foram aprovadas 13 drogas baseadas em produtos naturais, que incluem compostos de plantas (galantamina, huperzina), microorganismos (daptomicina) e animais (exenatida e ziconotida), e ainda, compostos sintéticos e semi-sintéticos (ex.: tigeciclina, caspofugina). Além disso, uma análise detalhada dos novos medicamentos aprovados pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) entre 1981 e 2010 revelou que 34% dos medicamentos foram baseados em pequenas moléculas de produtos naturais ou de derivados diretos de produtos naturais – incluindo as estatinas, drogas anticâncer de ligação a tubulina e imunossupressores (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

No entanto, o uso de produtos naturais diminuiu nas últimas duas décadas, em parte devido a preocupações com a diversidade biológica, tema discutido na Convenção das Nações Unidas, que visa regulamentar o acesso internacional para produtos naturais. Isso também se deve à informação contraditória de que a busca por novos medicamentos utilizando a abordagem de rastreio de alto rendimento (*high-throughput screenin*, *HTS*) não seria possível com produtos naturais. Aliado a esses fatores estão dificuldades associadas ao isolamento e síntese de compostos de origem natural (HARVEY; EDRADA-EBEL, QUI, 2015). Contudo, mesmo com a redução na utilização de produtos naturais pelas grandes empresas farmacêuticas, a busca por moléculas com atividade biológica ainda se faz necessária e existem muitas substâncias de origem natural sendo estudadas e mostrando perfil promissor para o desenvolvimento de novas

drogas. Como descrito por Harvey, mais de 100 novos produtos até 2008 estiveram em desenvolvimento clínico, especialmente agentes anti-câncer e antimicrobianos, entre outros (HARVEY, 2008).

No Brasil, o registro de novos medicamentos biológicos e fitoterápicos segue critérios análogos aos adotados para os medicamentos novos sintéticos e semi-sintéticos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que inclui: análise farmacotécnica, análise de eficácia e análise de segurança. A análise farmacotécnica inclui a verificação de todas as etapas da fabricação do medicamento desde aquisição dos materiais, produção, controle de qualidade, liberação, estocagem, expedição de produtos terminados e os controles relacionados. As avaliações de eficácia e segurança são feitas por meio da análise de estudos pré-clínicos (ou não-clínicos) e clínicos. Na fase pré-clínica devem ser realizados ensaios para se conhecer o mecanismo de ação de uma nova molécula, determinar sua segurança e as doses seguras para o início dos testes em seres humanos. Os dados de segurança pré-clínicos podem ser obtidos a partir de modelos *In-silico* (simulação computacional), sistemas *In-vitro* (cultura de células), ensaios *Ex-vivo* (e.g. isolamento de um órgão) e modelos animais apropriados. Para a condução das pesquisas clínicas – ou ensaios clínicos - primeiramente são necessárias aprovações regulatórias, tanto éticas como sanitárias. Os ensaios clínicos são os estudos do novo medicamento realizados em seres humanos e basicamente são subdivididos em fases I, II, III e, eventualmente, IV, nos casos de medicamentos já registrados em outros países para os quais dados de farmacovigilância pós-mercado já são disponíveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

Uma parte considerável de produtos naturais exibe uma grande variedade de farmacóforos (moléculas com átomos ou grupos químicos num arranjo espacial conhecido ou previsto, responsável pela atividade biológica específica) e apresentam um elevado grau de estereoquímica (organização espacial dos átomos nas moléculas). Estas propriedades contribuem para as atividades biológicas relacionadas a produtos naturais, como a interação de proteína-proteína (HARVEY; EDARAD-EBEL; QUINN, 2015). Quando comparados a compostos sintéticos, os produtos naturais exibem vantagem por serem metabólitos naturais. Assim, além de ativos biologicamente, provavelmente também são substratos

para sistemas de transportadores que permitem sua ação intracelular (HARVEY; EDARAD-EBEL; QUINN, 2015).

Muitos recursos relacionados a produtos de origem natural ainda podem ser explorados considerando que existem cerca de 200 mil metabólitos secundários de plantas registrados no Dicionário de Produtos Naturais, incluindo 170.000 estruturas únicas. Ainda assim, é provável que a grande maioria das espécies de plantas, assim como outros produtos naturais, não tenham sido sistematicamente investigados. Neste sentido, os microrganismos demonstraram uma magnitude de biodiversidade que supera os eucariotos e somente menos de 1% da comunidade microbiótica está sendo estudada.

Ademais, os medicamentos tradicionais, à base de plantas e produtos de origem natural, que estão em uso por diferentes culturas ainda precisam ser mais bem estudados e explorados (HARVEY; EDARAD-EBEL; QUINN, 2015; HARVEY, 2008).

1.3.1 **Metabólitos primários e secundários de produtos naturais**

A biossíntese e degradação de proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, essenciais para todos os organismos vivos, é conhecido como o metabolismo primário e cada um dos intermediários destas vias metabólicas são chamados de "metabolitos primários" (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Já as características de individualidade de uma espécie estão associadas à biossíntese de metabólitos secundários, compostos frequentemente encontrados exclusivamente em um organismo, oriundos do metabolismo secundário (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os metabolitos secundários geralmente não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo e são produzidos, como resultado da adaptação ao ambiente ou para agir como um possível mecanismo de defesa contra predadores, ajudando na sobrevivência do organismo (DEWICK, 2002; COLEGATE; MOLYNEUX, 2008). A biossíntese de metabolitos secundários deriva dos processos fundamentais da fotossíntese, glicólise e o ciclo de Krebs, para se obter intermediários biossintéticos que, em última instância,

resultam na formação de metabólitos secundários (DEWICK, 2002; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

1.4 FUNGOS LIQUENIZADOS

A utilização de fungos liquenizados (líquens) data das primeiras civilizações Chinesas e Egípcias, onde servia como matéria prima para perfumes, cosméticos e para a medicina (PURVIS, 2000; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Ao longo dos anos, o uso medicinal de formulações contendo líquens vem sendo descrito, como por exemplo, o líquen *Usnea dillenius ex Adanson*. Tradicionalmente foi usado para curar doenças do couro cabeludo e ainda é vendido em farmácias como ingrediente de xampus anti-caspa (PURVIS, 2000; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). O líquen *Parmelia omphalodes* (Linnaeus) Acharius, abundante nas Ilhas Britânicas, além de ser usado como corante era tradicionalmente borrifado sobre as meias no começo de uma viagem para prevenir a inflamação nos pés (CAMERON, 1990) e na Irlanda foi utilizada na cura de feridas, queimaduras e cortes (ALLEN; HATFIELD, 2004; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Outro exemplo são as espécies *Lethariella cashmeriana* e *L. sernanderi*, utilizadas na medicina tradicional tibetana e chinesa no preparo de chás medicinais, possuindo a propriedade de reduzir a pressão arterial e a inflamação (GORIN et al., 1993). Na medicina popular, a espécie *Cetraria islandica* é descrita como medicamento para a tuberculose pulmonar e irritação na garganta, *Usnea barbata* no tratamento de doenças da pele e *U. longíssima* como expectorante (GORIN et al., 1993).

Líquens são organismos simbióticos de crescimento lento, compostos por um fungo e um ou mais parceiros fotossintéticos, que pode ser uma alga verde ou uma cianobactéria (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001; NASH III, 1996). Segundo Honenegger (1996), como organismos heterótrofos, os líquens desenvolveram várias estratégias nutricionais para adquirir carbono fixado, sendo uma delas a liquenização, que consiste da aquisição do carbono fixado de uma população de algas verdes e/ou cianobactérias (HONEGGER, 1996). A simbiose é benéfica para ambos os organismos e contribui para a sobrevivência em ambientes com condições variadas e adversas. Com essas características, os líquens possuem

distribuição cosmopolita, sendo encontrados desde os trópicos até as regiões polares, onde frequentemente é a vegetação predominante. Eles são observados em todos os tipos de substratos, climas, altitudes e latitudes (GORIN et al., 1993; OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001). Somente um terço das 13.500 espécies de líquens descritas até o ano de 2000 foram investigadas quanto ao conteúdo de compostos de baixo peso molecular. Entretanto, obteve-se 200 produtos diferentes de metabólitos secundários, muitos destes apresentando atividade biológica (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

Os líquens são constituídos por produtos do metabolismo do fungo (metabólitos secundários), como ácidos alifáticos, *meta*- e *para*-depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácido úsnico, terpenos e derivados do ácido pulvínico (correspondendo de 0,1-10% em relação ao peso seco do talo) (GORIN et al., 1993). A parede celular de fungos é composta por carboidratos que podem ser divididos em carboidratos de baixa (monossacarídeos, poliois e oligossacarídeos) ou alta massa molecular (polissacarídeos) (GORIN et al., 1993). Em torno de 75% dos carboidratos encontrados em líquens são polissacarídeos, principalmente glucanas, galactomananas e galactoglucomananas. Contudo, a composição da parede pode variar marcadamente entre as espécies de fungos (CARBONERO, 2005; KARUNARATNE; JAYALAL; KARUNARATNE, 2012). Além disso, nas últimas décadas vem se descobrindo alguns heteropolissacarídeos complexos adicionais encontrados em líquens, como ramnogalactofuranana (OLAFSDOTTIR, 1999), galactomanoglucana (CARBONERO et al., 2002b), glucomanana (PEREIRA, 2010) e tamnolana (CARBONERO et al., 2005). Ainda, estudos realizados por Cordeiro e colaboradores (2005), revelaram que a alga *Trebouxia* sp, como parceiro simbiótico, também contém alguns carboidratos como o heteropolissacarídeo β -galactofuranana (CORDEIRO et al., 2005).

Os polissacarídeos de líquens também podem ser usados como uma ferramenta taxonômica adicional à classificação geralmente baseada na morfologia do organismo. Os heteropolissacarídeos e suas estruturas químicas são únicos em determinados grupos de líquens, permitindo diferenciar as espécies (KARUNARATNE; JAYALAL; KARUNARATNE, 2012). Muitos líquens são conhecidos por exibir propriedades

imunomoduladoras, potentes efeitos antibióticos, antitumorais e antiviral, bem como propriedades antioxidantes. Salienta-se que muitos destes efeitos são atribuídos à presença de produtos naturais, como metabólitos secundários (MALHOTRA et al., 2008; BEHERA et al., 2007). Por outro lado, apesar do vasto uso do líquens na medicina popular, ainda hoje, não existe nenhum medicamento oficial aprovado no mercado (MÜLLER, 2000; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Apesar de ser utilizados para fins ecológicos, medicinais e outros fins econômicos há mais de 100 anos, os líquens possuem efeitos benéficos que têm sido correlacionados com metabólitos secundários e, até certo ponto, com o conteúdo de polissacarídeo. Entre os líquens identificados até o momento, somente em 100 espécies já foi estudado a composição e os polissacarídeos (KARUNARATNE; JAYALAL; KARUNARATNE, 2012; CORDEIRO et al., 2005). Todos os líquens investigados produzem considerável quantidade de polissacarídeos, podendo chegar em até 57% da biomassa do talo liquênico (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

1.5 POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM NATURAL

A primeira fração com um polissacarídeo isolado de um líquen foi uma mistura de liquenana e isoliquenana isoladas por Berzelius em 1883, a partir do *Cetraria islandica*. Tal espécie que inclusive foi usada na medicina tradicional desde tempos antigos para o tratamento de várias doenças (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001). Nas últimas décadas, os polissacarídeos isolados a partir de fontes naturais (cogumelos, algas, líquens e plantas superiores) tem atraído atenção da área biomédica pelo seu amplo espectro de propriedades terapêuticas e toxicidade relativamente baixa (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Ademais, muitos polissacarídeos derivados de plantas superiores exibem baixa toxicidade e boa segurança, apresentando vantagens sobre compostos sintéticos e polissacarídeos imunomoduladores obtidos de bactérias (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Vários estudos demonstraram que os polissacarídeos derivados de plantas e cogumelos exibem propriedades terapêuticas, incluindo imunestimulante, anti-tumoral, de cicatrização de feridas, hematopoiético, radioprotetora, gastroprotetora anti-ulcera, anti-inflamatória, antinociceptiva,

hipoglicêmica e antiviral, entre outras (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDDOTTIR, 2001; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; BAGGIO et al., 2010). O mecanismo básico proposto para os principais efeitos terapêuticos creditados aos polissacarídeos de origem natural parece estar associado, principalmente, à estimulação de macrófagos e também à modulação do sistema de complemento (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Estes compostos têm a capacidade de estimular a função de macrófagos e sua atividade citotóxica contra células tumorais e microrganismos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) e a secreção de citocinas e quimiocinas como TNF- α e várias interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8) (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). A bioatividade de polissacarídeos de plantas parece envolver a participação de receptores do tipo CD4, de alta afinidade para lipopolissacarídeos de microrganismos (sigla do inglês *LPS*) e o receptor para complemento (CR3b), o qual reconhece partículas opsonizadas e β -glucanas, entre outros. Os receptores CR3 possuem especificidade para polissacarídeos contendo manose ou *N*-acetil-*D*-glucosamina mais glucose (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Assim como os polissacarídeos derivados de plantas, os obtidos de cogumelos e de líquens tem ação imunomoduladora, levando ao aumento ou ativação da resposta de defesa do organismo. Como exemplo, as β -glucanas estimulam uma vasta gama de respostas imunitárias, tais como a secreção de citocinas, geração de ROS, geração de NO e liberação de metabólitos do ácido araquidônico (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Aparentemente, polissacarídeos de fontes naturais se ligam em receptores de superfície comuns e por isso induzem respostas semelhantes em macrófagos. Desta maneira, pode-se pensar que uma estrutura principal (primordial), evolutivamente conservada nos polissacarídeos pode ser compartilhada entre diversos grupos destes organismos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). A atividade funcional dos polissacarídeos depende do peso molecular, grau de ramificações, solubilidade na água, estrutura e configuração (BOHN; BEMILLER, 1995; KARUNARATNE; JAYALAL; KARUNARATNE, 2012).

1.5.1 Bioatividade de glucomananas de origem natural

As glucomananas extraídas de produtos naturais possuem características funcionais, nutricionais e fisiológicas bastante interessantes e promissoras. Entre os papéis nutricionais podem ser destacados: fonte de fibra dietética; aplicações para a perda de peso/saciedade; ação pré-biótica, restringindo o crescimento de patógenos no intestino; controle do colesterol e da absorção de glucose (TESTER; AL-GHAZZEWI, 2015). Também possuem um papel relevante na medicina tradicional oriental (CHUA et al., 2010; AKESOWAN, 2002). Um exemplo bem relatado na literatura é a utilização da glucomanana “*konjac*”, extraída do *Amorphophallus konjac* que tem como características principais uma alta viscosidade e gelatinização, que contribui para seu uso pela indústria de alimentos. É fonte para espessante de xarope, geléia, película comestível (*edible film*) e macarrão (VÁZQUEZ-VELASCO et al., 2015; CHUA et al., 2010). Na medicina tradicional chinesa (MTC), um gel preparado a partir da farinha de *A. konjac* foi usado para a desintoxicação e supressão de tumores. E por mais de 2000 anos tem sido consumida pelos povos indígenas da China para o tratamento de asma, tosse, hérnia, dor no peito, queimaduras, bem como alterações hematológicas e de pele. Ainda, estudos clínicos demonstraram que a suplementação da dieta com uma farinha de glucomanana “*konjac*” reduziu significativamente o colesterol plasmático, induziu melhora do metabolismo de carboidratos, da movimentação intestinal e da microbiota do cólon (CHUA et al., 2010).

Embora a fontes de polissacarídeos variem bastante, apenas a glucomanana (*konjac*) extraída de *Amorphophallus konjac* já foi estudada largamente e seu consumo aprovado. Foi considerado como um aditivo alimentar geralmente seguro (do inglês *GRAS*) pela “FDA” nos EUA, pela Health Canada, no Canadá e também na União Europeia (TESTER; AL-GHAZZEWI, 2015). Na Indonésia, tubérculos da planta conhecida localmente como “*porang*” (*Amorphophallus oncophyllus*) exibem uma grande quantidade de glucomanana. A planta participa da economia local, apesar do baixo valor, sendo exportada para a China e Japão. Adicionada como suplemento na dieta de ratos, a glucomanana “*porang*” mostrou ação antioxidante e inibiu o crescimento de *Escherichia coli*

(VÁZQUEZ-VELASCO et al., 2015). Quando comparada à glucomanana “konjac”, mostrou ser relativamente mais solúvel e apresentou maior grau de acetilação, já a viscosidade foi menor (HARMAYANI; APRILIA; MARSOONO, 2014). Por outro lado, é importante salientar que os efeitos biológicos dependem das características e diferenças dos polissacarídeos.

Os polissacarídeos glucomananas, possuem um peso molecular que varia naturalmente de 200.000 para 2.000.000 Daltons e podem ser hidrolisados em moléculas de baixo peso molecular por ácidos ou enzimas, como celulasas ou mananases. A hidrólise ácida tende a ser aleatória, enquanto as enzimas são focadas em monossacarídeos específicos (TESTER; AL-GHAZZEWI, 2015). As mananases (β -mananases) hidrolisam qualquer resíduo de manose com ligação β -(1-4), enquanto celulasas (β -glucanases) hidrolisam resíduos de glucose com ligação β -(1-4). Assim, os hidrolisados formados a partir da ação destas enzimas possuem a capacidade de funcionar como fonte prebiótica (carbono) para as bactérias probióticas, contribuindo para alguns dos seus efeitos benéficos (TESTER; AL-GHAZZEWI, 2015). Atualmente já se tem conhecimento que as glucomananas são formadas por unidades de manose e glucose que podem ser reconhecidas por receptores de diferentes células. Por exemplo, a interação com o receptor de manose de macrófagos (MMR ou CD206) (MATTHIJSSEN et al., 2009; TAYLOR; DRICKAMER, 1993), ou entre β -glucanas e o receptor dectina-1 (GOODRIDGE et al., 2011).

De maneira interessante, os polissacarídeos são fáceis de conjugar com outras moléculas, fornecendo muitas possibilidades para modificação. Atualmente, tecnologias para definir as propriedades químicas por modificação, bem como para controlar com precisão o tamanho das moléculas estão em alta (WANG et al., 2015b).

1.5.1.1 Glucomanana (GM) obtida do líquen *Heterodermia obscurata*

Entre os estudos de polissacarídeos obtidos a partir de líquens é importante ressaltar os resultados obtidos no trabalho publicado pelo grupo do Prof. Marcello Iacomini (PEREIRA et al., 2010). Através de sucessivas extrações alcalinas do líquen *Heterodermia obscurata* obteve-se uma fração altamente

ramificada de uma glucomanana não usual (GM). Além disso, o polissacarídeo GM administrado sistemicamente (via intraperitoneal, ip.) em camundongos, demonstrou acentuado efeito antinociceptivo, inibindo contorções abdominais induzidas por ácido acético. Ainda, foi possível observar um efeito anti-inflamatório, com a redução da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos camundongos (PEREIRA et al., 2010).

O fungo *Heterodermia obscurata* (figura 5) pertence à classe dos Ascomycetos, ordem Lecanorales, subordem Lecanorineae, família Physciaceae (TEHLER, 1996). Apresenta morfologia do talo do tipo folioso e faz simbiose com a alga verde *Trebouxia* sp., o fotobionte.

Figura 5 - Foto do fungo liquenizado *Heterodermia obscurata*.



Legenda: O líquen *Heterodermia obscurata* foi coletado em troncos de árvores na cidade de Curitiba-Pr, pela Profa. Sionara Eliasaro do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).
Fonte: Pereira, 2007.

Organismos do gênero *Heterodermia* têm distribuição tropical e subtropical, crescem em troncos de árvores e rochas, em local de maior umidade (NASH et al., 2001). Este gênero consiste de aproximadamente 80 espécies, sendo que 42 destas

são descritas no Brasil. Somente no estado do Paraná são encontradas seis delas (MARCELLI, 2006).

Além da glucomanana GM, foram encontrados também metabólitos secundários no córtex do *H. obscurata*, como atranorina e cloroatranorina. Na zona de medula estão presentes atranorina, zeroína, um terpeno não identificado e um pigmento marrom oxidado (NASH et al, 2001). Um polissacarídeo com estrutura similar à encontrada no estudo de Pereira et al. 2010, uma glucomanana altamente ramificada e não usual, foi descrita no estudo com o líquen *Tornabenia intricata* (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992). Apesar das semelhanças e de pertencerem à mesma família, os polissacarídeos apresentaram algumas diferenças na sua estrutura. A glucomanana de *T. intricata* possui menor percentual de glucose (*T. intricata*: 7% e *H. obscurata*: 18,3%), além de unidades de Manp 2,4-di-*O*-substituídas (14%), as quais não foram observadas em *H. obscurata*. (TEIXEIRA; IACOMINI; GORIN, 1992).

A glucomanana (GM) obtida do líquen *H. obscurata* apresentou uma cadeia principal composta por unidades de α -*D*-Manp ligadas-(1→6), sendo a maioria substituída em *O*-2, por unidades terminais não redutoras de α -*D*-Glc p, α -*D*-Manp e, possivelmente, por cadeias laterais constituídas por unidades de α -*D*-Manp 4-*O*-substituídas. A glucomanana encontrada é um polissacarídeo típico da família *Physciaceae*, desta forma, os dados obtidos com a GM também reforçam a utilização de polissacarídeos como uma ferramenta adicional para os estudos de quimiotaxonomia (PEREIRA et al., 2010). Recentemente, demonstrou-se que a GM tem um importante efeito antinociceptivo em modelos comportamentais de dor aguda e crônica. A administração sistêmica de GM reduziu a alodinia mecânica e os níveis de interleucina 1 β (IL-1 β) na medula espinal e nervo isquiático, no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático. Além disso, a administração sistêmica com GM reduziu a nocicepção induzida por injeção intraplantar (ipl.) de glutamato e por injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos N-metil-*D*-ácido aspártico (NMDA) e ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (*trans*-ACPD). Também reduziu o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intratecal de TNF- α e IL-1 β (CÓRDOVA et al., 2013). Assim, estes dados demonstram que a GM possui importante efeito antinociceptivo em modelos animais de dor aguda e

crônica, sendo sua ação analgésica dependente da inibição de citocinas pró-inflamatórias e da sinalização glutamatérgica.

De fato, alguns estudos têm demonstrado que polissacarídeos de origem natural possuem efeito analgésico e anti-inflamatório em modelos de nocicepção aguda e crônica (PEREIRA et al., 2010; BAGGIO et al., 2010; SMIDERLE et al., 2008a,b).

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo das últimas décadas, o estudo dos mecanismos envolvidos na nocicepção e a determinação de alvos para terapias específicas contra a dor tornaram-se prioridade nas organizações relacionadas à saúde, bem como das indústrias farmacêuticas (LUO, 2004). A terapia convencional para o controle da dor, principalmente no que diz respeito ao controle dos processos crônicos, se baseia no uso de analgésicos opióides, anti-inflamatórios não-esteroidais, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, sendo que uma grande parcela dos pacientes portadores de dor crônica é refratária a qualquer tratamento. Esses medicamentos possuem, ainda, efeitos colaterais indesejáveis, o que oferece obstáculos à utilização dos mesmos na terapêutica (ATTAL et al., 2010).

Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas que sejam eficazes e seguras é incessante. E, atualmente, vai além do uso de medicamentos, procurando em terapias integrativas e complementares um aliado ao combate a dor por exemplo, os produtos naturais. No entanto, os medicamentos continuam a ser a principal ferramenta usada no controle dos estados dolorosos, e os produtos obtidos de fontes naturais representam uma enorme fonte de substâncias para a pesquisa de novos produtos analgésicos.

Neste sentido, metabólitos primários e secundários de produtos naturais são importantes moléculas bioativas, com diversos efeitos benéficos. Os polissacarídeos (metabólitos primários) de origem natural apresentam interessantes efeitos biológicos, desde ação imunomoduladora, antinociceptiva e anti-inflamatória, entre outras. Aliado a ação biológica benéfica, os polissacarídeos exibem baixa toxicidade e apresentam características que permitem modificações estruturais, visando potencializar o efeito terapêutico. Diante disso, a glucomanana obtida do líquen *H. obscurata* já apresentou potencial analgésico em modelos de dor aguda e crônica e pode representar uma estratégia farmacológica interessante para o alívio da dor, sendo pertinente o desenvolvimento de pesquisas que visem investigar esse possível efeito e seu mecanismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo e a segurança do uso da glucomanana GM obtida do líquen *Heterodermia obscurata* em modelos experimentais de dor aguda e crônica em camundongos, bem como o seu possível mecanismo de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da GM na nocicepção espontânea, hiperalgisia térmica e alodinia mecânica;

Investigar a participação da sinalização mediada por PGE₂ no efeito analgésico da GM;

Avaliar o efeito da GM na nocicepção mediada pela ativação das vias dependentes de PKA e PKC;

Avaliar o efeito da GM na nocicepção espontânea causada por agonistas de canais TRPs;

Investigar o envolvimento de fibras TRPV1+ no efeito antinociceptivo da GM;

Avaliar o efeito antinociceptivo e o decurso temporal da ação analgésica da GM na inflamação persistente e dor pós-operatória;

Verificar a segurança da administração diária da GM, por meio de indicadores como ganho de peso corporal, peso de órgãos vitais, parâmetros hematológicos e bioquímicos e também efeitos inespecíficos como sedação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

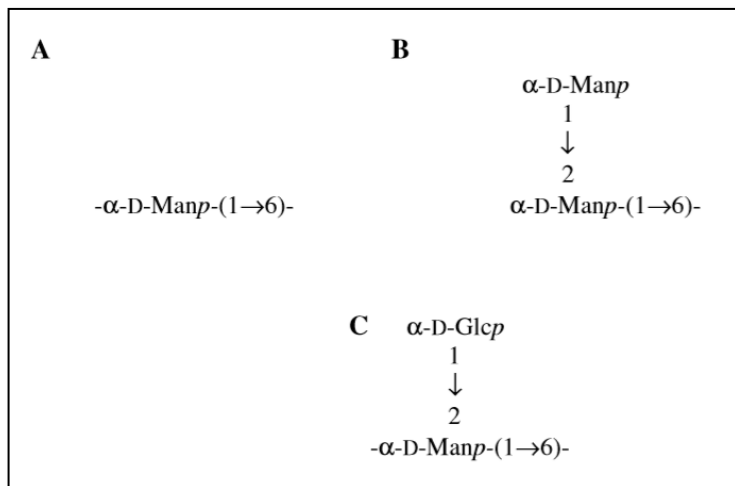
O polissacarídeo GM foi extraído e caracterizado estruturalmente no laboratório do prof. Dr. Marcello Iacomini, UFPR, Curitiba, como descrito anteriormente (PEREIRA et al., 2010). O talo seco do líquen *Heterodermia obscurata* foi triturado e submetido à maceração com acetona (2 x), gerando uma fração solúvel (extrato acetônico) e o resíduo. O resíduo foi posteriormente macerado com etanol (2 x), originando o extrato etanólico, constituído de carboidratos de baixa massa molar. Após, os extratos obtidos foram então submetidos a sucessivas macerações em solução aquosa e alcalina (solução aquosa de hidróxido de potássio, KOH a 2% e 10%) com a finalidade de extrair os polissacarídeos. Os polissacarídeos presentes na fração aquosa e/ou alcalina foram recuperados por precipitação com etanol e posteriormente dialisados contra água corrente.

As frações brutas obtidas a partir da maceração aquosa (W) e alcalina (K2 e K10) foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento suave (4 °C) (GORIN; IACOMINI, 1984), gerando as frações solúveis SW, SK2 e SK10 e polissacarídeos insolúveis (JONES; STOODLEY, 1965). Os sobrenadantes obtidos das frações após o processo de gelo/degelo foram submetidas à purificação por precipitação com solução de Fehling (2 x), resultando no precipitado e sobrenadante de Fehling. Os precipitados de Fehlings (PFW, PFK2 e PFK10) obtidos a partir das extrações aquosa e alcalina (KOH a 2% e 10% com boroidreto de sódio; NaBH₄) de *H. obscurata* mostraram-se similares e a fração PFK2 apresentou maior rendimento, sendo esta fração caracterizada quimicamente através de análises complementares. Assim, a fração PFK2 foi caracterizada como uma glucomanana (GM) altamente ramificada através da sua caracterização estrutural com base na composição de monossacarídeos, metilação, hidrólise parcial ácida e análise por espectroscopia de RMN (PEREIRA et al., 2010).

A glucomanana encontrada (Figura 6) possui uma cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas-(1→6),

sendo a maioria substituídas em *O*-2, principalmente, por unidades terminais não redutoras de α -D-Glcp, α -D-Manp e, possivelmente, por cadeias laterais constituídas por unidades de α -D-Manp 4-*O*-substituídas, apresentando peso molecular de $17,2 \times 10^3$ g/mol (PEREIRA et al., 2010).

Figura 6 - Estrutura proposta para glucomanana obtida do líquen *H. obscurata*.



Legenda: A GM é uma glucomanana altamente ramificada com cadeia principal composta por unidades de α -D-Manp ligadas-(1→6) (A), sendo a maioria substituídas em *O*-2 por unidades terminais não redutoras de α -D-Glcp (C), α -D-Manp (B).

Fonte: Pereira, 2007.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 638 camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*), com aproximadamente dois meses de idade e pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis, SC. Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB, em câmaras isoladas contendo no máximo 6 animais por caixa (12x30x18 cm), com ventilação, sob

condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60% - 80%) em ciclos de 12 horas claro-escuro (6 às 18 horas), além de livre acesso a água e ração (Bio Base Alimentação animal). Para a realização dos estudos comportamentais, os camundongos foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para ambientação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolos PP00682 e PP00745, Anexo 1) e os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2.1 **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM E ESCOLHA DA DOSE**

4.2.2 **Nociceção induzida por formalina**

O modelo da formalina permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: a de origem neurogênica, decorrente da estimulação direta das fibras nociceptivas e a de origem inflamatória, caracterizada principalmente pela liberação de mediadores inflamatórios e sensibilização central (MCNAMARA et al., 2007; BARROT, 2012; TONUSSI; FERREIRA, 1994; ORTIZ et al., 2008).

Assim, o modelo da formalina foi escolhido para avaliar o efeito antinociceptivo da GM bem como determinar a melhor dose a ser usada nos próximos experimentos. Inicialmente, os animais foram tratados pela via intraperitoneal (ip.) com a GM (10-100 mg/kg) ou salina (C: salina, 10 mL/kg). Trinta minutos depois, 20 μL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetada via ipl. na superfície ventral da pata posterior direita do animal. Imediatamente após, os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes (13x13x9 cm) e foi cronometrado o tempo que eles permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina de 0-5 min (fase neurogênica ou primeira fase) e de 15-30 min (fase inflamatória ou segunda fase), sendo esse tempo considerado como indicativo

de nocicepção. A metodologia utilizada foi essencialmente à mesma descrita por Santos e Calixto (1997).

4.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DA PGE₂/PKA NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM

4.3.1 **Nocicepção induzida por PGE₂**

A nocicepção causada pela formalina depende da liberação de vários mediadores álgicos endógenos, entre eles a prostaglandina E₂ (KAWABATA, 2011). Para avaliar o possível envolvimento da PGE₂ no efeito antinociceptivo da GM, os camundongos foram submetidos a um teste de nocicepção induzida por este algogênico, como descrito anteriormente (KASSUYA et al., 2007). Para isto, os animais foram tratados com solução salina (C; 10 mL/kg, ip.), GM (100 mg/kg, ip.) ou indometacina (Indo: 10 mg/kg, ip., utilizada como controle positivo) 30 min antes da injeção ipl. de 20 µL de PGE₂ (3 nmol/pata) na superfície ventral da pata traseira direita. Imediatamente após, os camundongos foram colocados individualmente em câmaras acrílicas transparentes (13x13x9 cm) e o tempo que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi cronometrado pelo período de 15 min e considerado como indicativo de resposta nociceptiva (tempo de reação).

Em outro grupo controle experimental os animais receberam somente uma injeção ipl. de solução salina (S; NaCl 0,9 %/20 µL) e foram avaliados como descrito anteriormente.

4.3.2 **Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor**

A latência de retirada da pata ao estímulo de calor radiante foi avaliada como previamente descrito (HARGREAVES et al., 1988), com pequenas modificações. Os animais foram colocados em caixas de acrílico sobre uma superfície de vidro, por um período de 1,5 – 2 h antes para habituação ao aparato. O feixe de luz infravermelha (intensidade: 40 I; aparelho Ugo Basile plantar Stoelting, Wood Dale, IL) foi aplicado perpendicularmente à superfície ventral da pata traseira direita por um período de até 20 segundos (tempo de corte; de

modo a evitar um possível dano tecidual), ou até o animal retirar a pata do feixe de luz. O teste foi repetido três vezes com um intervalo de 5 minutos entre cada estimulação. O limiar térmico dos animais foi verificado 24 h antes da injeção dos algogênicos, sendo considerados como resposta basal e representados nos gráficos como B.

Para indução da hiperalgesia, os animais receberam uma injeção ipl. de PGE₂ (0,85 nmol/pata) em um volume de 20 µL na superfície ventral da pata posterior direita (KASSUYA et al., 2007). Trinta minutos antes, os animais foram tratados com GM (100 mg/kg, ip.) ou salina (C; 10 mL/kg, ip.) e então foi avaliado o decurso temporal de ação da GM nos tempos de 60, 90, 150 e 210 min (Figura 7).

4.3.3 Avaliação da alodinia mecânica

Para avaliar a alodinia mecânica os animais foram ambientados durante 1 h em caixas de acrílico (9x7x11 cm) numa plataforma elevada de malha de arame a fim de acessar a superfície ventral da pata para aplicação dos estímulos. Foram utilizados oito filamentos de von Frey (força de 0,02 a 4,0 g), aplicados perpendicularmente em ordem crescente ou decrescente (começando com filamento 0,4 g) no centro de superfície plantar da pata direita, por um período máximo de cinco segundos, ou até uma resposta positiva (retirada da pata). Na ausência de resposta, filamentos de força crescente foram aplicados consecutivamente. Assim, a resposta foi caracterizada como a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas) conforme o método de *up-down* de Dixon, adaptado por Chaplan e colaboradores (1994). O limiar mecânico dos animais foi verificado 24 h antes da injeção dos algogênicos, sendo considerado como resposta basal e representado nos gráficos como B.

A alodinia mecânica foi induzida conforme metodologia descrita por Kassuya e colaboradores (2007). Os animais receberam uma injeção ipl. de PGE₂ (0,10 nmol/pata) em um volume de 20 µL na superfície ventral da pata posterior direita. Trinta minutos antes, os animais foram tratados com GM (100 mg/kg, ip.) ou salina (C; 10 mL/kg, ip.) e então foi avaliado o

decurso temporal de ação da GM nos tempos de 45, 60 e 120 min (Figura 7).

4.3.4 **Efeito periférico (local) da GM na nocicepção induzida por PGE₂**

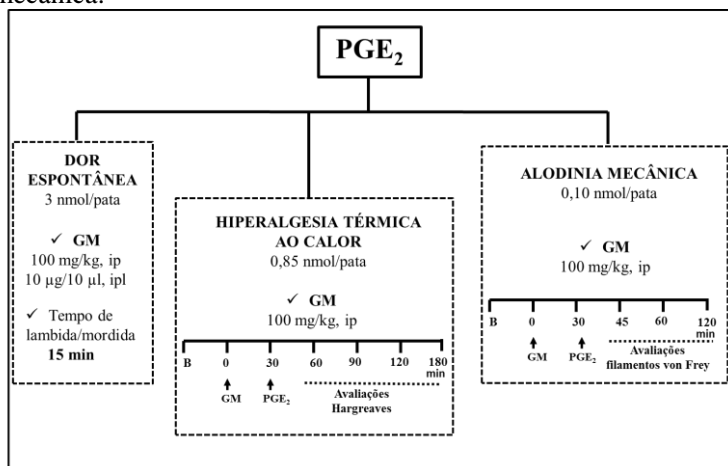
Inicialmente, foi avaliado se a GM poderia exercer um possível efeito *per se* quando administrada periféricamente (local). Para isso, os animais receberam uma injeção ipl. de 10 µL de GM (1-300 µg/pata) ou salina (S: NaCl 0,9%/pata) e imediatamente após foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com GM ou salina por 30 min, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

Em outro experimento, foi avaliado se a administração periférica da GM era capaz de reduzir a nocicepção induzida por PGE₂. Para isto, os animais receberam injeção ipl. de 10 µL de solução salina (C: NaCl 0,9%/pata), GM (10 µg/pata), indometacina (Indo: 1 µg/pata) ou KT5720 (10 nmol/pata; inibidor de PKA) e 5 min depois, receberam outra injeção ipl. de 20 µL de PGE₂ (3 nmol/pata) na mesma pata.

Um grupo de animais controle recebeu duas injeções ipl. de solução salina (S: NaCl 0,9%/pata), a primeira injeção de 10 µL e 5 minutos após, a segunda injeção ipl. de 20 µL e foram avaliadas como descrito anteriormente.

Imediatamente após a injeção de PGE₂ a resposta nociceptiva foi avaliada durante 15 min, sendo contabilizado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada (tempo de reação).

Figura 7 – Esquema de administração da PGE₂ e GM e das avaliações de dor espontânea, hiperalgesia térmica e alodinia mecânica.



Legenda: A dor espontânea foi induzida por uma injeção ipl. de PGE₂ (3 nmol/pata) e avaliada durante 15 min, sendo contabilizado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Os animais receberam GM sistêmico (100 mg/kg, ip.) ou local (10 µg/pata), 30 ou 5 minutos antes da injeção de PGE₂, respectivamente. A hiperalgesia térmica ao calor foi induzida com uma injeção ipl. PGE₂ (0,85 nmol/pata), trinta minutos após a administração sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.) e foi avaliada pelo método de Hargreaves nos tempos 60, 90, 120 e 180 minutos após a GM. Para indução da alodinia mecânica a PGE₂ (0,1 nmol/pata) foi injetada trinta minutos depois da administração sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.) e foi avaliada utilizando monofilamentos de von Frey (método *up-down*), nos tempos 45, 60 e 120 minutos após a GM.

4.3.5 Nociceção induzida por forskolina (FSK)

4.3.5.1 Efeito sistêmico da GM

Nesta etapa experimental, foi investigado o possível efeito sistêmico da GM na via de sinalização da PGE₂/PKA através da nociceção induzida pelo ativador de ACs, a forskolina (FSK). Para isto, os animais foram tratados com solução salina (C; 10 mL/kg, ip.) ou GM (100 mg/kg, ip.) 30 min antes da injeção ipl. de FSK (50 nmol/pata). A concentração de forskolina

utilizada foi baseada em experimentos anteriores do nosso laboratório (dados não mostrados). Outro grupo de animais recebeu apenas injeção ipl. de 20 μ L de solução salina (S: NaCl 0,9 %/pata).

Imediatamente após a injeção ipl. de forskolina, os animais foram colocados em câmaras acrílicas transparentes individuais (13x13x9 cm) e foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada por 10 min, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

Ao final do período de observação os animais foram eutanasiados por decapitação e rapidamente foi removida a medula espinal (região lombar) e a pele da superfície plantar da pata injetada para posterior avaliação da fosforilação da PKA por western blot.

4.3.5.2 Efeito periférico (local) da GM

Em outro experimento foi avaliado se a administração periférica da GM promove redução da nocicepção induzida pelo forskolina (FSK). Para isto, os animais receberam injeção ipl. de 10 μ L de solução salina (C; NaCl 0,9%/pata), GM (10 μ g/pata) ou KT5720 (10 nmol/pata, inibidor de PKA) e 5 minutos depois, outra injeção ipl. de 20 μ L de FSK (50 nmol/pata). Neste experimento um grupo de animais controle (S) recebeu duas injeções ipl. de solução salina (0,9%), sendo a primeira injeção de 10 μ L e 5 minutos após a segunda de 20 μ L por pata e foram avaliadas como descrito no item anterior.

Após injeção a ultima injeção ipl., os animais foram colocados em câmaras acrílicas transparentes individuais (13x13x9 cm) e foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada por 10 min, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

4.3.6 Híperalgesia ao calor induzida por FSK

A híperalgesia ao calor foi induzida pela injeção ipl. de 20 μ L de FSK (10 nmol/pata) na pata direita dos animais, de acordo com a metodologia adaptada de Nascimento et al. (2010). A avaliação da híperalgesia térmica ao calor foi realizada

conforme descrito no item 4.3.2, pelo método de Hargreaves (HARGREAVES et al., 1988).

A fim de avaliar o efeito da GM neste modelo e confirmar os dados anteriores, mostrando a via AC/PKA no efeito da GM no modelo de PGE₂, os animais receberam uma injeção ipl. de 10 µL de GM (10 µg/pata) cinco minutos antes da aplicação ipl. de FSK. O decurso temporal de ação da GM foi avaliado nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos após sua aplicação local (Figura 8).

4.3.7 Preparação de tecidos para ensaio de Western Blot

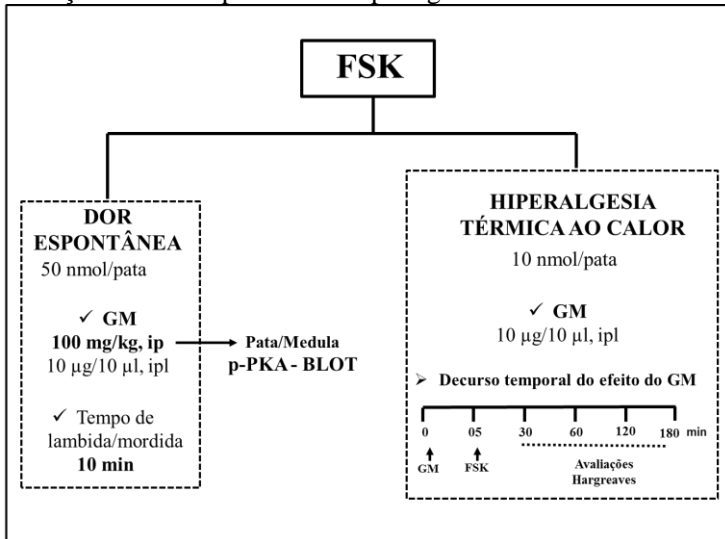
As amostras de tecido (pata e medula espinal) foram homogeneizadas individualmente em tampão de lise (CLB, Cell Signaling Technology) e centrifugadas a 14.000 RPM durante 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e o teor de proteína foi determinado pelo método colorimétrico (reagente de Bradford, Bio-RadLaboratories) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras de proteína foram estabilizadas pela adição de 20% de tampão de amostra (300 mM Tris, contendo 10% de SDS, 25% de mercaptoetanol, 50% de glicerol e 0,2 % de azul de bromofenol) e fervidas (100°C) durante 5 minutos. Uma vez estabilizadas, as amostras foram mantidas a -80 °C até a sua utilização.

4.3.8 Análise do conteúdo de proteínas por Western Blotting na pata e medula

A fim de avaliar o efeito da GM na ativação da PKA induzida por FSK foi feita a análise de Western blot para PKA ativada/fosforilada (p-PKA) na pata e medula. Para realizar o ensaio de transferência de western, cada amostra foi utilizada em um volume que continha 40 µg de proteínas, as quais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida, as proteínas separadas no gel foram transferidas também por eletroforese para membranas de nitrocelulose, que foram incubadas durante duas horas com solução de bloqueio (TBS-T contendo 3% de albumina sérica bovina, BSA) para bloquear os sítios de ligação de anticorpos não específicos. Após, as membranas foram lavadas com TBS-T, e incubadas durante a noite sob agitação e refrigeração com anticorpo primário para

subunidades catalíticas fosforiladas de PKA (anti-p-PKA/cat, Santa Cruz Biotechnology), ou com o anticorpo primário para α -actina (Santa Cruz Biotechnology), utilizado como controle, ambos diluídos 1:1000 em solução de TBS-T contendo 1,5 % de BSA. Após incubação, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T e, em seguida, incubou-se durante duas horas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase específico. A visualização das bandas imunorreativas foi feita usando quimiluminescência (ECL) em filme radiográfico.

Figura 8 – Esquema de administração da FSK e GM e as avaliações de dor espontânea e hiperalgesia ao calor.



Legenda: A dor espontânea foi induzida por injeção ipl. de FSK (50 nmol/pata) e avaliada durante 10 min, sendo contabilizado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Para avaliar o efeito da GM, os animais receberam GM sistêmico (100 mg/kg, ip.) ou local (10 µg/pata) 30 e 5 minutos antes da injeção de FSK, respectivamente. A hiperalgesia térmica ao calor foi induzida com uma injeção ipl. de FSK (10 nmol/pata), cinco minutos após a administração local de GM (10 µg/pata) e foi avaliada pelo método de Hargreaves nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos após a GM.

4.4 PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE C (PKC), RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP) E CANAIS IÔNICOS SENSÍVEIS AO ÁCIDO (ASIC) NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM

4.4.1 **Nociceção induzida pela injeção intraplantar de 13-acetato-12-miristato de forbol (PMA)**

Para avaliar o possível efeito da GM sobre a inibição da ativação da proteína quinase C (PKC), utilizou-se o modelo de nociceção induzida pela injeção ipl. de PMA (ativador de PKC) (FERREIRA et al., 2005). Primeiramente os animais foram tratados com salina (C: salina, 10 mL/kg, ip.) ou GM (100 mg/kg, ip.) e trinta minutos após foi injetado ipl. 20 µL de PMA ipl. (50 µg/pata). Imediatamente após, os animais foram colocados em acrílicos individuais e foi cronometrado o tempo de lambida e mordida da pata injetada no período de 15 a 45 minutos, sendo considerado como indicativo de resposta nociceptiva (tempo de reação).

4.4.2 **Nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina**

Para investigar se a antinociceção da GM depende da inibição da ativação dos canais TRPV1, utilizou-se o modelo de nociceção induzida pela injeção de capsaicina (agonista de receptor TRPV1). Para isto, os animais foram tratados com solução salina (C; 10 mL/kg, ip.), GM (3-100 mg/kg, ip) ou vermelho de rutênio (VR; antagonista TRP não seletivo, 3 mg/kg, ip.), 30 min antes da injeção ipl. de 20 µL de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior direita. Imediatamente após, foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante 5 min, sendo este tempo considerado como índice de nociceção (tempo de reação) (SANTOS; CALIXTO, 1997).

Em outra série de experimento, foi investigado o efeito periférico (local) da GM na nociceção causada pela capsaicina. Nesta etapa, foi administrado 10 µL de GM (1-30 µg/pata) ou solução salina (S; NaCl 0,9 %/pata) cinco minutos antes da injeção de 20 µL de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi cronometrado o tempo que o

animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante 5 min, sendo este tempo considerado como índice de nociceção (tempo de reação) determinada como descrito acima.

4.4.3 4.5.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

Com o objetivo de avaliar o envolvimento dos canais TRPA1 na antinociceção promovida pela GM há, utilizou-se o modelo de nociceção induzida pela injeção de cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1). Para isto, os animais foram tratados com solução salina (10 mL/kg, ip.), GM (3-100 mg/kg, ip.) ou cânfora (CAN, antagonista TRPA1; 7,6 mg/kg, sc.), 30 min antes da injeção ipl. de 20 µL da solução de cinamaldeído (10 nmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como índice de nociceção (ANDRADE et al., 2008). Além disto, foi também investigado o efeito periférico da GM em outro grupo experimental, através da administração de 10 µL de GM (3- 30 µg/pata) ou solução salina (S; NaCl 0,9%/pata) na pata posterior direita dos animais, cinco minutos antes da injeção de 20 µL de cinamaldeído (10 nmol/pata). Imediatamente após, a resposta nociceptiva (tempo de reação) foi avaliada como mencionado acima.

4.4.4 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de mentol

A fim de avaliar se a antinociceção da GM depende da inibição dos canais TRPM8, utilizou-se o modelo de nociceção induzida pela injeção de mentol (agonista de receptor TRPM8), conforme descrito por Baggio e colaboradores (2012). Os animais foram tratados com solução salina (V; 10 mL/kg, ip.) ou GM (1-10 mg/kg, ip.), 30 min antes da injeção ipl. de 20 µL da solução de mentol (1,2 µmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com mentol foi cronometrado por um período de 20 min e considerado como resposta nociceptiva (tempo de reação).

Em outra série de experimento, foi investigado o efeito periférico (local) da GM na nociceção induzida pela injeção de

mentol. Para isto, os animais receberam 10 μL de GM (1-30 $\mu\text{g/pata}$, ipl.) ou solução salina (S; NaCl 0,9%/pata) na pata posterior direita 5 minutos antes da injeção ipl. de 20 μL de mentol (1,2 $\mu\text{mol/pata}$). Imediatamente após, a resposta nociceptiva (tempo de reação) foi avaliada conforme descrito acima.

4.4.5 **Nociceção induzida pela injeção intraplantar de salina acidificada**

Para induzir a nociceção espontânea, foi aplicado 20 μL de uma solução de salina acidificada (ativador de receptor TRPV1 e ASIC) na pata posterior direita dos animais. Para avaliar se no efeito antinociceptivo da GM ocorre a participação dos canais ASIC, foram realizados experimentos de nociceção induzida pela injeção de salina acidificada (ácido acético 2%, pH 5,0/pata). A fim de avaliar o efeito da GM, os animais foram tratados com salina (C; 10 mL/kg, ip.), GM (0,1-10 mg/kg, ip.) ou amilorida (AML, 100 mg/kg, ip.), 30 min antes da injeção ipl. de 20 μL da solução de salina ácida (ácido acético 2%, pH 5,0/pata) na pata posterior direita. Imediatamente após, a resposta nociceptiva (tempo de reação) foi avaliada como mencionado anteriormente (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010).

Em outro grupo experimental, a GM (1-30 $\mu\text{g/pata}$) foi aplicado intraplantarmente num volume de 10 μL na pata posterior direita, cinco minutos antes da injeção de 20 μL de salina ácida (ácido acético 2%, pH 5,0/pata), imediatamente após, a resposta nociceptiva foi determinada como mencionado acima.

4.5 PARTICIPAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+ NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM

4.5.1 **Injeção intratecal de capsaicina**

A ablação dos terminais centrais de neurônios aferentes que expressam TRPV1 foi realizada em camundongos *Swiss* adultos (dois meses de idade), conforme descrito por Cavanaugh e colaboradores (2009). Os animais foram anestesiados com 1,5 – 2% de isoflurano e em seguida foi feita a uma injeção intratecal (it.), no nível da região lombar, de 5 μL de capsaicina (10 $\mu\text{g/sítio}$) ou veículo (V; Salina+10% de etanol 10% de Tween 80)

com uma agulha calibre 30 acoplada a uma seringa Hamilton (HYLDEN; WILCOX, 1980).

Neste modelo, os terminais centrais TRPV1 positivos são destruídos em 24 horas após a injeção it. de capsaicina e a insensibilidade ao calor (característica que confirma que a ablação foi bem sucedida) pode durar por até oito semanas.

4.5.2 Placa quente

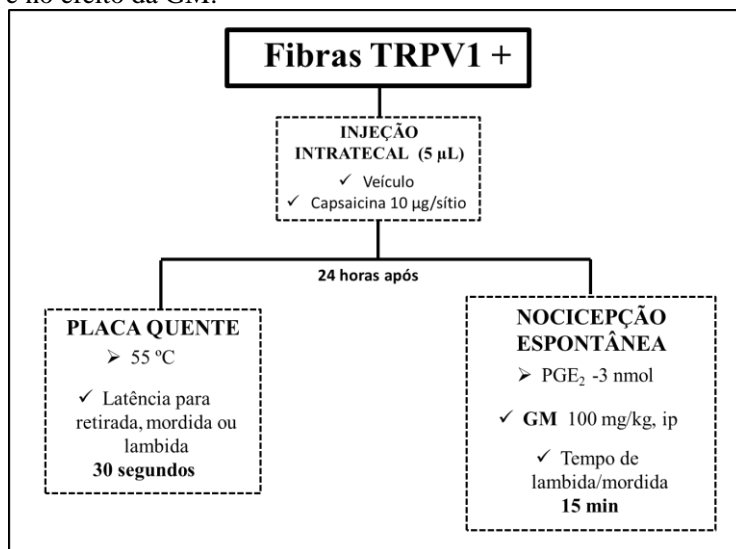
Para a confirmação da destruição dos terminais centrais TRPV1 positivos, os animais foram aclimatados ao aparato de teste (Placa quente) por dois dias consecutivos. O teste foi realizado 24 horas após a injeção intratecal de capsaicina ou veículo e consistiu em expor os camundongos à placa quente a uma temperatura de 55 °C por um período de 30 segundos (tempo de corte). Foi considerada como resposta positiva a retirada, sacudida ou mordida de qualquer uma das patas posteriores durante o período avaliado.

4.5.3 Nocicepção induzida por PGE₂

Constatada a ablação, foi avaliado o envolvimento das fibras que expressam TRPV1 na nocicepção induzida por PGE₂ e no efeito da GM.

Para tal, os camundongos foram submetidos ao teste de nocicepção aguda induzida por PGE₂, como descrito anteriormente (KASSUYA et al., 2007). Um grupo de animais recebeu solução salina (C; 10 mL/kg, ip.) ou GM (100 mg/kg, ip.) 30 min antes de receber uma injeção ipl. de 20 µL de PGE₂ (3 nmol/pata) na superfície plantar da pata traseira direita. Imediatamente após, os camundongos foram colocados individualmente em câmaras acrílicas transparentes (13x13x9 cm) e o tempo que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi cronometrado pelo período de 15 min e considerado indicativo de resposta nociceptiva (tempo de reação).

Figura 9 – Esquema da ablação de fibras que expressam TRPV1, do envolvimento dessas fibras na nocicepção induzida por PGE₂ e no efeito da GM.



Legenda: A destruição dos terminais centrais de fibras que expressam TRPV1 foi realizada com a injeção intratecal de 5 µL de capsaicina (10 µg/sítio) ou veículo (Salina+10% etanol+10% Tween 80). A ablação foi confirmada 24 horas após, observando-se a latência para retirada da pata no teste da placa quente na temperatura de 55 °C, durante 30 segundos. Em seguida foi avaliada a participação das fibras TRPV1+ na nocicepção induzida por PGE₂. A dor espontânea foi induzida por uma injeção ipl. de 20 µL de PGE₂ (3 nmol/pata) e o tempo de reação (mordida ou lambida da pata injetada) foi avaliado durante 15 min. Para avaliar se o efeito da GM neste modelo, os animais receberam GM sistêmico (100 mg/kg, ip.) ou solução salina (10 mL/kg, ip.) 30 antes da injeção de PGE₂.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GM NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA PERSISTENTE INDUZIDA POR CFA

4.6.1 Adjuvante Completo de Freund (CFA)

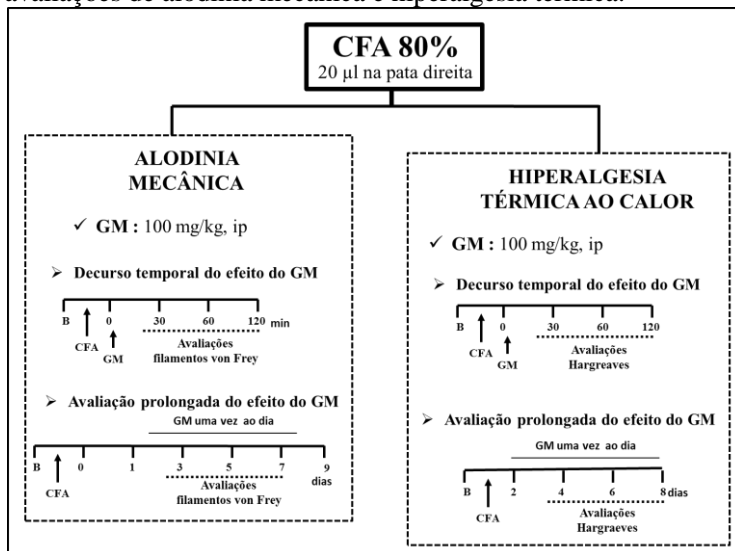
Para induzir o modelo de dor inflamatória persistente os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (1-2% em 100% de O₂) e receberam uma injeção ipl. de 20 µL de Adjuvante

Completo de Freund (suspensão autoclavada de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo mineral) diluído a 80% e outro grupo recebeu injeção ipl. de veículo (V; solução de salina 0,9% +1% de Tween 80) conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2001), com pequenas modificações.

Após 24 e 48 horas da injeção de CFA, foi avaliado o limiar térmico ao calor e mecânico, respectivamente (como descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3). Constatada a hiperalgesia e alodinia, foi avaliado o decurso temporal de ação da GM. Para isso, os animais receberam GM (100 mg/kg, ip.) ou solução salina (controle, C; 10 mL/kg, ip.) trinta minutos antes das avaliações de hiperalgesia térmica o calor e alodinia mecânica (itens 4.3.2 e 4.3.3) (Figura 10).

Foi avaliado também o efeito da administração prolongada de GM em testes realizados em dias alternados após a injeção ipl. de CFA (dia ímpar avaliada a alodinia mecânica, dia par avaliada a hiperalgesia térmica). As avaliações diárias foram realizadas sempre 60 minutos após administração de GM, o tempo escolhido a partir dos resultados obtidos no decurso temporal.

Figura 10 - Esquema de administração do CFA 80% e GM e as avaliações de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica.



Legenda: Para a indução da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao calor foi usado CFA 80%, injetado ipl. na pata direita dos animais. As avaliações da alodinia mecânica foram feitas com monofilamentos de von Frey *ipsilateral* a injeção, iniciando 24h após o CFA. Verificada a alodinia (tempo 0), foi então realizado o decurso temporal de efeito da GM (100 mg/kg, ip.), 30, 60 e 120 minutos após sua administração. As avaliações diárias foram feitas no 1º, 3º, 5º e 7º dias após o CFA ipl., sempre 60 minutos após a aplicação sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.). Para avaliar a hiperalgesia térmica ao calor induzida por CFA 80% foi utilizado o método de Hargreaves, iniciando 48h após o CFA. Foi realizado o decurso temporal de efeito da GM (100 mg/kg, ip.), 30, 60 e 120 minutos após sua administração. As avaliações diárias foram feitas no 2º, 4º, 6º e 8º dias após o CFA ipl., sempre 60 minutos após a aplicação sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.).

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

4.7.1 Incisão plantar e avaliação da hiperalgesia ao calor

O modelo de dor pós-operatória induzida por incisão plantar foi realizado conforme descrito por Pogatzki e Raja (2003), com pequenas modificações. Inicialmente os

camundongos foram anestesiados com 1,5-2% de isoflurano e após preparação anti-séptica da pata posterior direita, uma incisão longitudinal de 5 mm foi feita através pele e fáscia da superfície plantar com lâmina de bisturi número 10. A incisão teve início a 2 mm do calcanhar e estendeu-se até os dedos. O músculo subjacente foi elevado com uma pinça curva, deixando sua origem e inserção intactas. Em seguida, a pele foi suturada com fio de nylon 7.0 e animal foi observado até sua recuperação da anestesia.

Dois grupos de animais controle passaram pelo mesmo procedimento, mas não tiveram a incisão feita na pata e foram chamados de grupo Sham. Assim, o experimento teve quatro grupos: i) Sham + Salina ip., ii) Sham + GM ip., iii) Operados + Salina ip. e iv) Operados + GM ip. Desta forma avaliamos o efeito da GM frente à nocicepção pós-incisão e também um possível efeito *per se*.

A hiperalgesia térmica ao calor foi avaliada neste modelo 48h após o procedimento cirúrgico, conforme metodologia descrita no item 4.3.2. Para avaliar o efeito da GM, foi realizado um decurso temporal de ação nos tempos 30, 60 e 120 minutos após a aplicação de GM (100 mg/kg, ip.) ou solução salina (10 mL/kg, ip.). A hiperalgesia térmica foi novamente avaliada no 4º dia após incisão, trinta minutos após a administração de GM (10 mg/kg, ip.) ou solução salina (10 mL/kg, ip.).

4.8 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS INESPECÍFICOS E TÓXICOS DA GM: GANHO/PERDA DE PESO CORPORAL, PESO DE ÓRGÃOS VITAIS E COLETA DE SANGUE

A fim de reduzir o número de animais e otimizar os experimentos, os dados obtidos nesta seção são dos mesmos animais do experimento de nocicepção inflamatória persistente induzida por CFA (item 4.6.1). Os dois grupos utilizados foram os que receberam Salina ip ou GM ip. e não foram submetidos à injeção com CFA. Desta maneira obtivemos dados do efeito *per se* da administração diária repetida da GM.

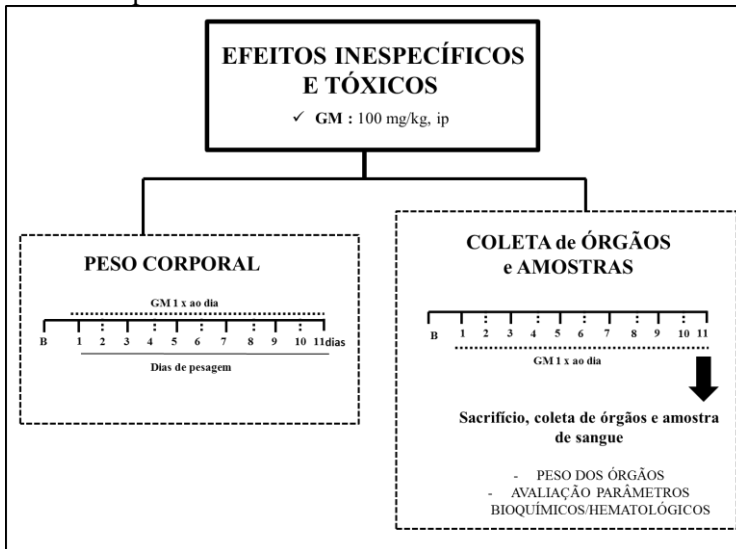
4.8.1 **Peso dos animais**

Primeiramente foi realizada a medida do peso basal (B) dos animais, já separados e homogeneizados nos grupos citados após as medidas basais do limiar térmico ao calor. As medidas foram feitas usando balança (Bioprecisa, modelo BS300000A) em gramas. Nos dias ímpares seguintes à injeção primeira administração, todos os animais foram pesados no final dos testes sensoriais, até o 11º dia. Neste dia os animais foram pesados e eutanasiados para coleta de amostras, permanecendo em jejum de água e comida por 12h.

4.8.2 **Coleta de órgãos vitais e sangue**

No 11º dia os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg, ip.) e xilazina (10 mg/kg, ip.) para a coleta de 1 mL de sangue. Em seguida, foram eutanasiados e os órgãos – coração, pulmões, fígado, baço e rins – foram retirados e pesados. As amostras de sangue colhidas foram separadas em tubos contendo EDTA (300 mmol/L e 22 mg/L de alaranjado de metila), para avaliação de parâmetros hematológicos. Também foi coletado amostras em tubos secos, que foram coaguladas e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O soro coletado foi utilizado para as dosagens bioquímicas de: aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, colesterol total, HD, LDL, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase (γ -GT), dosadas com kits bioquímicos de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 11 – Esquema de administração da GM, avaliação de efeitos inespecíficos e coleta de amostras.



Legenda: Para avaliação de efeitos inespecíficos e tóxicos da GM, os camundongos foram tratados com GM (100 mg/kg, ip.) ou Salina (10 mL/kg, ip.) por 11 dias consecutivos. O peso basal (B) dos animais foi medido 24h antes do início do experimento e em todos os dias ímpares seguintes. No 11º dia os camundongos foram anestesiados para coleta de sangue (avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos) e logo em seguida eutanaziados para coleta de órgãos (coração, pulmões, rins, baço e fígado).

4.8.3 Avaliação do possível efeito sedativo

Para avaliar se o efeito antinociceptivo observado poderia estar relacionado a uma ação sedativa da GM, utilizou-se um modelo previamente descrito por HAJHASHEMI et al. (2010), onde avalia-se a potencialização da sedação induzida por cetamina. Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, ip.), GM (100 mg/kg, ip.) ou com o controle positivo diazepam (3 mg/kg, v.o.), 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg). O intervalo de tempo entre a administração da cetamina e a perda do reflexo de endireitamento foi contabilizado como o tempo de indução da sedação, enquanto

o intervalo entre a perda e a recuperação do reflexo foi contabilizado como o tempo de duração da sedação.

4.8.4 Drogas e Reagentes

As substâncias utilizadas, sua origem e eventuais características são listadas a seguir: Ácido acético e formalina (Merck, Darmstadt, Germany); diazepam solução injetável (Cristália, SP, Brasil); CFA, cinamaldeído, mentol, cânfora, KT5720, prostaglandina E₂ e PMA (Sigma-Aldrich, MO, EUA); capsaicina, forskolina e vermelho de rutênio (Tocris Bioscience, Missouri, EUA); cloridrato de cetamina solução injetável e cloridrato de xilazina solução injetável (Syntec, SP, Brasil);

A GM foi dissolvida em salina (NaCl 0,9%), cânfora foi dissolvida em salina com 1% de etanol e 5% de Tween 80, KT5720 foi dissolvido em salina com 10% de metanol, capsaicina foi diluída com salina e 10% de etanol+10% de Tween 80. As demais drogas foram dissolvidas em salina ou salina com 5% de Tween 80. As concentrações finais de Tween 80 não ultrapassaram 5% e não causaram nenhum efeito *per se*.

4.8.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. e os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Student-Newman-Keuls, exceto na hiperalgesia térmica e mecânica, analisadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os dados de peso relativo de órgãos e dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram analisados por teste *t* de Student. O valor da DI₅₀ (dose capaz de reduzir a resposta nociceptiva em 50% em relação ao valor de controle) foi determinado por análise de regressão não linear e apresentada como média geométrica com limites de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

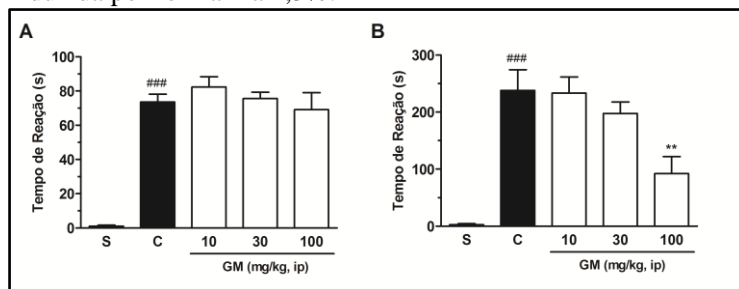
5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA GM NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA

O teste de formalina foi utilizado inicialmente para avaliar o efeito antinociceptivo da GM e também para determinar a melhor dose a ser usada no nosso estudo. De acordo com os dados apresentados na Figura 12A, a injeção ipl. de formalina induziu nocicepção, aumentando o tempo de reação quando comparado ao grupo que recebeu salina ipl. (S). A GM, quando administrado sistemicamente (ip.), foi capaz de reduzir a nocicepção de origem inflamatória (2^o fase) induzida pela formalina, com inibição de $62 \pm 12\%$ e DI_{50} de 71,01 (47,33 - 109,6) mg/kg. No entanto, não foi observado efeito antinociceptivo da administração da GM na primeira fase (fase neurogênica) em nenhuma das doses testadas (Figura 12B).

A partir desse experimento a dose de 100 mg/kg da GM foi escolhida para a realização dos experimentos posteriores.

Figura 12 - Efeito sistêmico da GM na nocicepção espontânea induzida por formalina 2,5%.



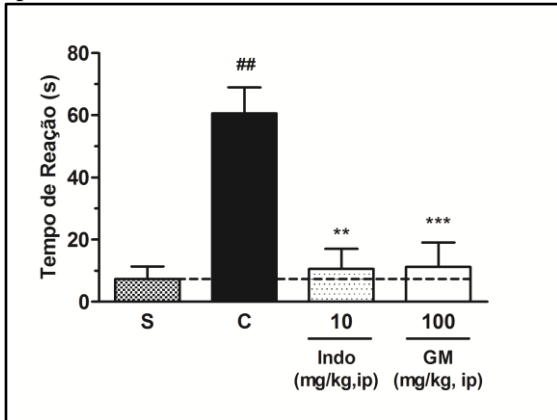
Legenda: Efeito da GM (100 mg/kg, ip.) na nocicepção induzida pela injeção ipl. de formalina 2,5%. A nocicepção foi avaliada na primeira fase (0-5 min, painel A) e na segunda fase (15-30 min, painel B). Os resultados estão expressos como médias \pm E.P.M., $n = 6$. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *post hoc* de Student-Newman-Keuls. O símbolo denota o nível de significância $**p < 0,01$ comparado ao grupo C (Controle; animais que receberam injeção de salina ip. e formalina ipl.).

5.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM NA NOCICEPÇÃO CAUSADA POR PGE₂

5.2.1 Efeito da administração sistêmica GM

A PGE₂ é capaz de induzir nocicepção espontânea por estimulação direta de nociceptores (KASSUYA et al., 2007). Como observado na Figura 13A, a injeção ipl. de PGE₂ (3 nmol/pata; C) induziu o comportamento nociceptivo, aumentando o tempo de reação quando comparado ao grupo que recebeu salina intraplantar (S) (Figura 12) ($p < 0,01$). A GM (100 mg/kg, ip.) foi capaz de reduzir o tempo de reação nociceptiva induzido por PGE₂ com inibição de $92 \pm 15\%$ ($p < 0,001$), esse efeito foi semelhante ao observado para o controle positivo indometacina (Indo), que reduziu $93 \pm 12\%$ a resposta nociceptiva dos animais (Figura 13).

Figura 13 – Efeito sistêmico da GM na nocicepção espontânea induzida por PGE₂.

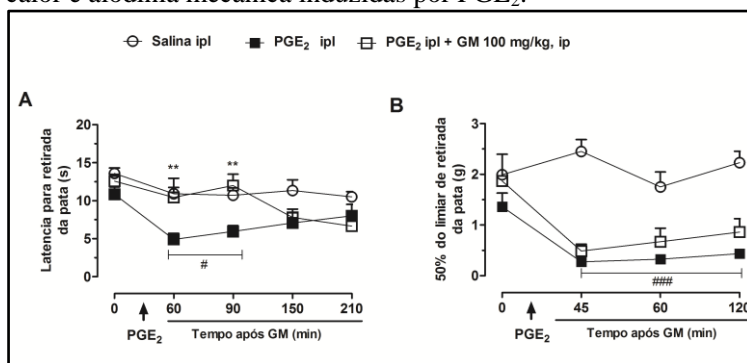


Legenda: Efeito da GM (100 mg/kg, ip.) e indometacina (10 mg/kg, ip.) na nocicepção induzida pela injeção ipl. de PGE₂ (3 nmol/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 8 -10 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + PGE₂ ipl.) e ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo S (salina ip. + salina ipl.).

5.2.2 Efeito da administração sistêmica da GM na hiperalgesia térmica ao calor e alodínia mecânica induzidas por PGE₂

A hiperalgesia térmica ao calor induzida pela injeção ipl. de PGE₂ (0,85 nmol/pata; C) foi evidente 30 min após a sua administração e perdurou por um período de 2 horas, observado pela diminuição da latência de retirada da pata ao estímulo quente quando comparado com o grupo controle S (Figura 14). O tratamento sistêmico com GM (100 mg/kg, ip.) restabeleceu o limiar térmico sensorial próximo ao grupo controle (S), e este efeito permaneceu por até 1,5 horas após o tratamento, onde observou-se uma reversão de 100% da hipersensibilidade térmica, como observado na figura 14A. No entanto, o GM (100 mg/kg, ip.) não foi capaz de reduzir a alodinia mecânica induzida pela PGE₂ (0,10 nmol/pata) em nenhum dos períodos observados (Figura 14B).

Figura 14 – Efeito sistêmico da GM na hiperalgesia térmica ao calor e alodinia mecânica induzidas por PGE₂.

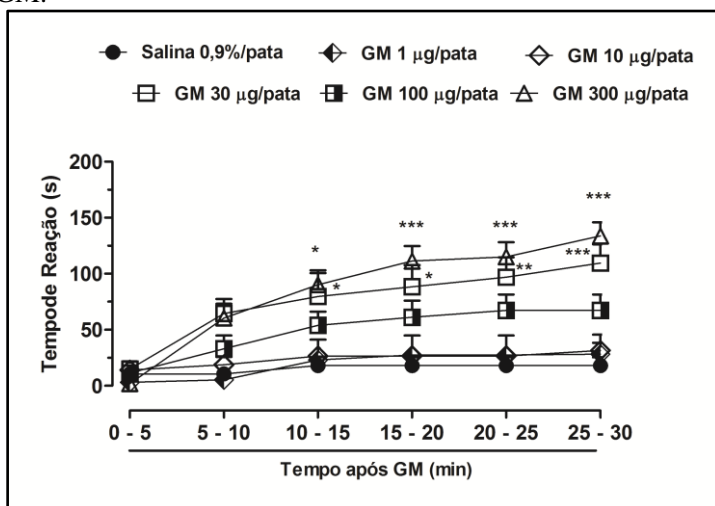


Legenda: Efeito da GM (100 mg/kg, ip.) na hiperalgesia térmica ao calor (A) e alodinia mecânica (B) induzidas por PGE₂. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 6-8 animais. Os níveis de significância são indicados ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo PGE₂ ipl. e # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ quando comparados ao grupo Salina ipl. (teste *two-way* ANOVA seguido de *post hoc* de Bonferroni).

5.2.3 Efeito periférico (local) da GM na nociceção induzida por PGE₂

Inicialmente, foi analisado se a administração periférica da GM era capaz de causar nociceção *per se*. Como observado na Figura 15, a administração das doses de 30 e 300 µg/pata, mas não de 1 a 10 µg/pata, de GM foi capaz de induzir aumento significativo no tempo de lambidas e mordidas da pata dos animais, quando comparado ao grupo Salina, a partir de 10 minutos após aplicação, sendo que esta resposta foi observada por até trinta minutos. A partir destes resultados, a dose de 10 µg/pata de GM foi escolhida para realização de experimentos posteriores.

Figura 15 – Efeito nociceptivo *per se* da administração local de GM.

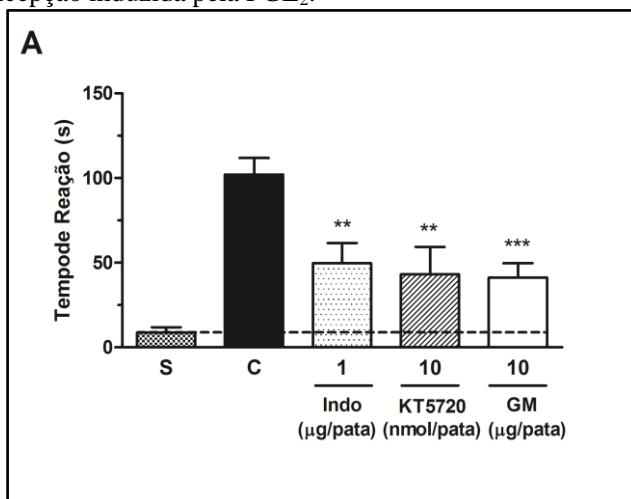


Legenda: Avaliação da nociceção espontânea induzida por GM (1-300 µg/pata). Cada ponto representa a média média ± E.P.M., n= 8 animais. Os níveis de significância são indicados *p <0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparados ao grupo Salina (teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni).

Considerando que o GM aplicado sistemicamente reduziu a hiperalgesia ao calor e a nociceção espontânea induzida pela PGE₂, o próximo passo foi investigar se o GM teria efeito periférico (local). Assim, a aplicação periférica (local e/ou co-injeção) de substâncias é uma maneira indireta de estudar a

possível interação destas com seus alvos (ex. receptores, canais iônicos). Como apresentado na Figura 16, a administração da GM (10 $\mu\text{g/pata}$), 5 minutos antes de PGE_2 reduziu $65 \pm 9\%$ o comportamento nociceptivo ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo C, esse efeito foi semelhante ao encontrado com os grupos KT5720 (inibir da PKA) e indometacina (inibidor não seletivo da COX-1 e 2), que reduziram o tempo de reação em $66 \pm 17\%$ e $56 \pm 13\%$, respectivamente (Figura 16).

Figura 16 - Efeito local da aplicação de GM, inibidor de COX (indometacina) e inibidor não seletivo de PKA (KT5720) na nocicepção induzida pela PGE_2 .



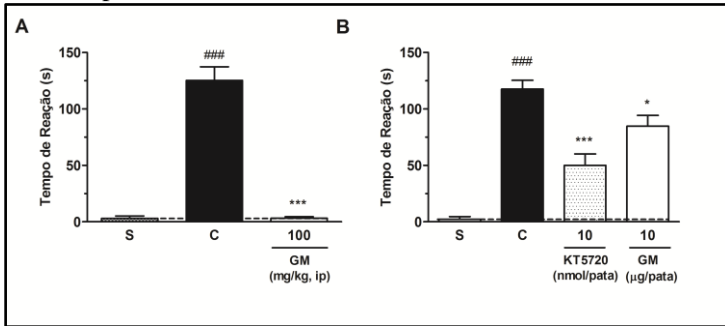
Legenda: Avaliação do efeito local de GM (10 $\mu\text{g/pata}$), Indometacina (1 $\mu\text{g/pata}$) e KT5720 (10 nmol/pata) na nocicepção espontânea induzida por PGE_2 (3 nmol/pata). As barras representam a média \pm E.P.M., $n = 6-8$ animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + PGE_2 ipl.).

5.3 PARTICIPAÇÃO DA PKA NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA GM

5.3.1 Efeito da GM na nociceção induzida por FSK

Considerando o resultado do efeito da administração periférica da GM, o próximo passo foi investigar a participação da cascata “*downstream*” aos receptores de prostaglandina, EP, usando o ativador de ACs, FSK, administrado na pata dos animais. Notavelmente, o GM administrado sistemicamente reduziu em 100% ($p < 0,001$) a nociceção espontânea (tempo de reação) induzida pelo FSK (Figura 17A). Estes dados sugerem o envolvimento da ACs no efeito da GM. Como mostrado anteriormente, o GM (10 $\mu\text{g/pata}$) administrado periféricamente (ipl.), foi capaz de reduzir $28 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) a nociceção induzida pelo FSK, em comparação ao grupo C (Figura 17B). O inibidor de PKA, KT5720, aplicado ipl., também reduziu $58 \pm 9\%$ ($p < 0,001$) a resposta nociceptiva induzida por FSK (Figura 17B).

Figura 17- Efeito sistêmico e periférico da GM na nociceção induzida por FSK.

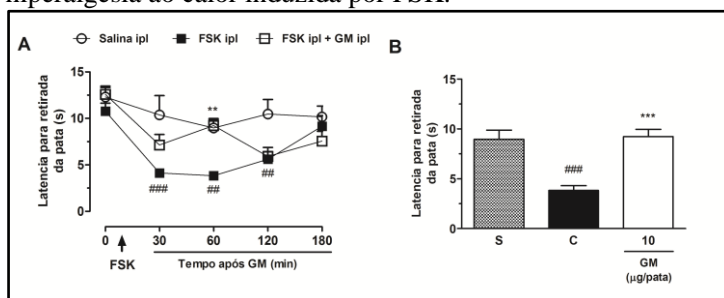


Legenda: Avaliação da nociceção induzida por forskolina (50 nmol/pata) e (Painel A) o efeito sistêmico (100 mg/kg, ip.) e (Painel B) periférico da GM (10 $\mu\text{g/pata}$) e do KT5720 (10 nmol/pata). As barras representam a média \pm E.P.M., $n = 10-16$ animais e a comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + FSK₂ ipl.) ### $p < 0,001$ em relação ao grupo S (Salina ip. + salina ipl.).

5.3.2 Efeito da GM na hiperalgesia ao calor induzida por FSK

Como observado na figura 18A, os animais que receberam injeção ipl. de FSK tiveram uma redução do limiar sensorial caracterizado pela diminuição do tempo para retirada da pata, iniciando em trinta minutos e perdurando por até 120 min, em relação ao grupo que recebeu salina. A administração periférica da GM (10 µg/pata) reestabeleceu o limiar sensorial dos animais o que permitiu aumento ($p < 0,01$) no tempo de retirada da pata quando comparado com o grupo controle. Além disso, é importante salientar que a resposta da GM não foi diferente quando comparado com o grupo salina (Figura 18B).

Figura 18 - Efeito da administração periférica de GM na hiperalgesia ao calor induzida por FSK.



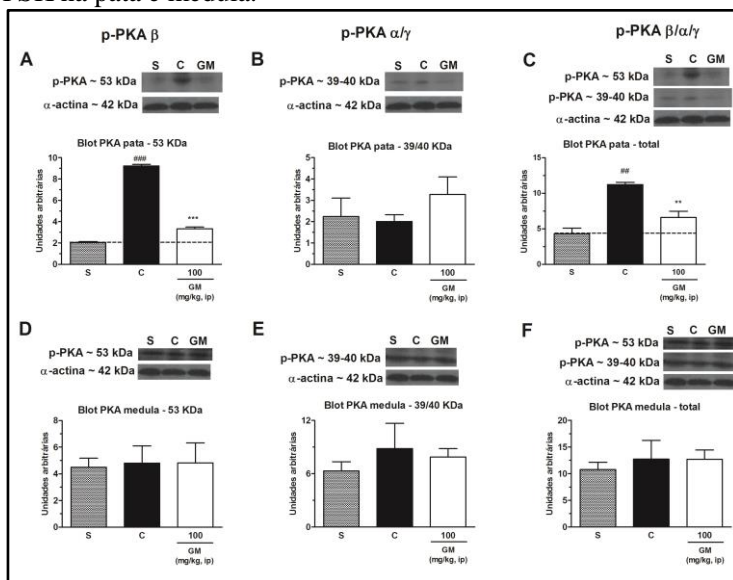
Legenda: Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor induzida por forskolina (10 nmol/pata) e do decurso temporal de ação da GM (10 µg/pata) (Painel A) e o seu efeito no tempo de sessenta minutos após sua aplicação (Painel B). Cada ponto representa a média \pm E.P.M, $n = 6-8$ animais. Os níveis de significância são indicados ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$ quando comparado o grupo que recebeu FSK ipl. + GM ipl. ao grupo que recebeu FSK ipl. e ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ quando comparado o grupo que recebeu FSK ipl. (C) ao grupo que recebeu salina ipl. (S) (teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni para painel A e *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls para painel B).

5.3.3 Efeito da GM na fosforilação da PKA na pata e medula espinal dos animais

Finalmente, a fim de confirmar o envolvimento da via PGE_2 /PKA no efeito da GM, realizamos western blot para p-PKA na pata e na medula espinal dez minutos após a injeção ipl. de FSK (C) ou salina (S).

Os dados apresentados na figura 19 mostram que a injeção ipl. de forskolina induziu um aumento significativo da forma fosforilada de PKA de peso 53 kDa (PKA β) e da p-PKA total (PKA β , α e γ), mas não da p-PKA α/γ , na pata (Figura 19A e C) dos animais. Por outro lado, pode-se observar que a administração sistêmica da GM (100 mg/kg, ip.) preveniu a fosforilação da PKA β induzida por FSK e conseqüentemente da PKA total, com redução da quantidade de p-PKA de $82 \pm 2\%$ e total: $66 \pm 13\%$, respectivamente (Figura 19A e C). O efeito da GM na medula espinal não foi verificado, uma vez que a injeção ipl. de FSK não alterou a p-PKA espinal (Figura 19D, E e F).

Figura 19 - Efeito da GM no conteúdo de p- PKA ativada por FSK na pata e medula.

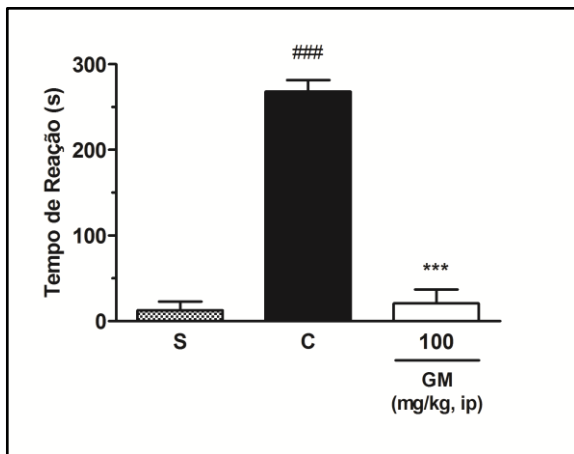


Legenda: Avaliação do efeito da GM na p-PKA ($\beta/\alpha/\gamma$) ativadas por FSK na pata (Painel A, B e C) e na medula espinal (Painel D, E e F). As barras representam a média \pm E.P.M., $n = 3-6$ animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *post hoc* de Student-Newman-Keuls. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ em relação ao grupo C e $\#p < 0,01$, $\#\#p < 0,001$ quando comparado ao grupo S.

5.4 EFEITO DA GM NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE 13-ACETATO 12-MIRISTATO DE FORBOL (PMA)

Neste modelo, a injeção de PMA causou nocicepção, conforme observado quando comparado o tempo de reação do grupo S (salina ipl.) ao do grupo C (PMA ipl.). A administração sistêmica da GM (100 mg/kg, ip.) produziu uma redução no tempo de reação, considerado como resposta nociceptiva, após aplicação de PMA (50 pmol/pata), com um inibição de $97 \pm 6\%$ (Fig. 20).

Figura 20 – Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de PKC.



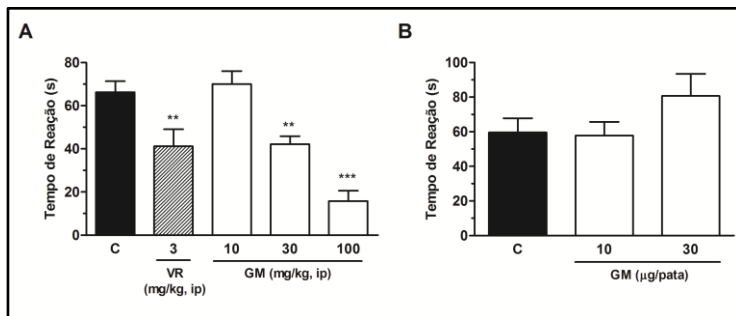
Legenda: Efeito da GM (100 mg/kg, ip.) sobre a nocicepção induzida PMA (50 pmol/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 6-8 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + PMA ipl.) e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo S (Salina ip. + salina ipl.).

5.5 EFEITO DA GM NA ESPONTÂNEA INDUZIDA POR AGONISTAS DE CANAIS TRP

5.5.1 Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

A administração da GM (10-100 mg/kg, ip.) inibiu de forma dependente da dose a nocicepção induzida pela capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) com DI_{50} de 47,7 (34,1-66,7) mg/kg e inibição de $76 \pm 7\%$ (Figura 21A). O vermelho de rutênio (3 mg/kg, ip.), utilizado como controle positivo, inibiu a resposta nociceptiva causada pela capsaicina em $38 \pm 12\%$. Contudo, a GM (10 e 30 $\mu\text{g/pata}$) administrado ipl. (periféricamente) não induziu alteração na nocicepção induzida pela capsacina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) (Figura 21B).

Figura 21 – Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPV1.

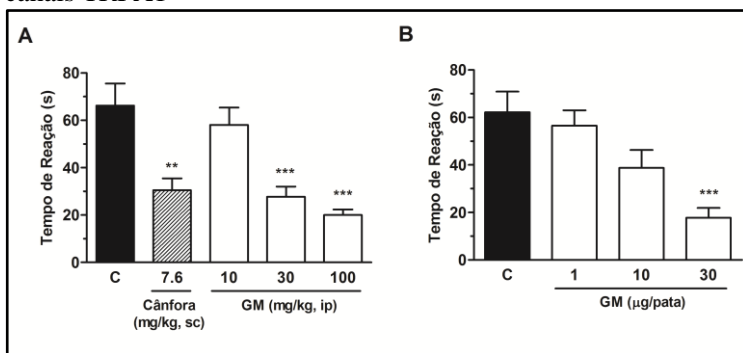


Legenda: Efeito da aplicação sistêmica (100 mg/kg, ip.) (painel A) e local (1030 µg/pata) (Painel B) de GM sobre a nocicepção induzida por capsaicina (1,6 µg/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 6-8 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo C (Salina ip. + capsaicina ipl.). VR = Vermelho de Rutênio.

5.5.2 Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

A administração sistêmica da GM (10-100 mg/kg, ip.) reduziu a nocicepção induzida por cinamaldeído (10 nmol/pata), com inibição de $70 \pm 4\%$ e DI_{50} de 33,6 (21,79- 51,98) mg/kg. O controle positivo, cânfora (7,6 mg/kg, sc.), inibiu a resposta nociceptiva em $54 \pm 8\%$ (Fig. 22A). Além disto, o GM (10-30 µg/pata) administrado perifericamente também reduziu a nocicepção causada pelo cinamaldeído (10 nmol/pata) com inibição de $71 \pm 7\%$ e DI_{50} de 15,9 (10,18-24,80) µg/pata (Fig. 22B).

Figura 22 – Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPA1

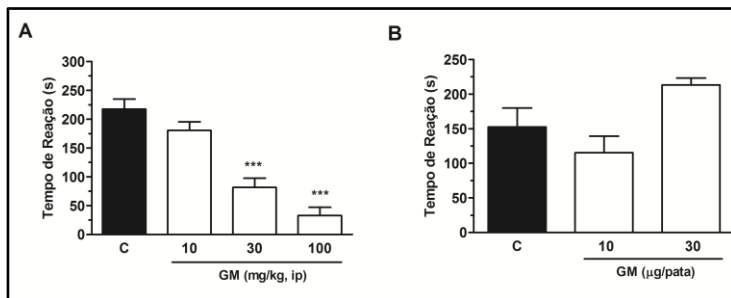


Legenda: Efeito da administração sistêmica (100 mg/kg, ip.) (painel A) e periférica (10 µg/pata) de GM sobre a nocicepção induzida por cinamaldeído (10 nmol/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 6-8 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste one-way ANOVA seguido de pos hoc de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo C (Salina ip. + cinamaldeído ipl.).

5.5.3 Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol

A GM (10-100 mg/kg, ip.) administrado sistêmica, reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo mentol (1,2 µmol/pata) com DI_{50} de 23,8 (17,2-32,9) mg/kg e inibição de $85 \pm 7\%$ (Fig. 23A). Contudo, a administração local (periférica) da GM (10 e 30 µg/pata), cinco minutos antes da aplicação de mentol (1,2 µmol/pata) não alterou a resposta nociceptiva (Fig. 23B).

Figura 23 – Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais TRPM8.



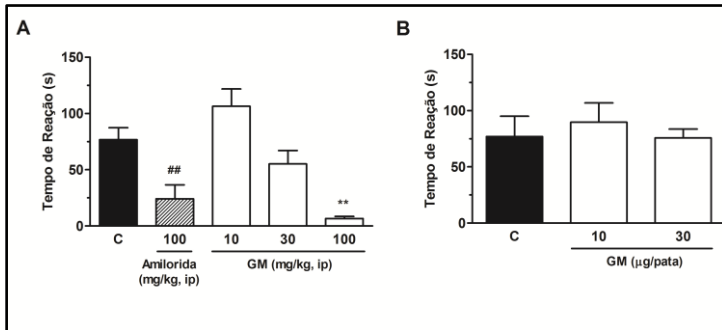
Legenda: Efeito da administração sistêmica (100 mg/kg, ip.) (painel A) e local (10 µg/pata) de GM sobre a nocicepção induzida por mentol (1,2 µmol/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 8-10 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + mentol ipl.).

5.5.4 Efeito da GM sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina acidificada

A administração sistêmica da GM (10-100 mg/kg, ip.) reduziu a nocicepção induzida pela salina acidificada (2%, pH 5,0/pata), com inibição de $91 \pm 2\%$ e DI_{50} de 41,3 (21,0-80,9) mg/kg (Fig. 24A). O controle positivo amilorida (100 mg/kg, ip.), inibiu a nocicepção causada pela salina acidificada em $68 \pm 16\%$.

Já quando administrada localmente, o GM (10 e 30 µg/pata) não alterou a resposta nociceptiva induzida pela salina acidificada (2%, pH 5,0/pata) (Fig. 24B).

Figura 24 – Efeito da GM na nocicepção induzida por ativador de canais ASICs.



Legenda: Efeito da administração sistêmica (100 mg/kg, ip.) (painel A) e local (10 µg/pata) (Painel B) de GM sobre a nocicepção induzida por salina acidificada (ácido acético 2%, pH 5,0/pata). As barras representam a média ± E.P.M., n= 6-7 animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo C (Salina ip. + salina ácida ipl.).

5.6 PARTICIPAÇÃO DE FIBRAS TRPV1+

5.6.1 Avaliação do limiar térmico ao calor e efeito da GM na nocicepção espontânea induzida por PGE₂

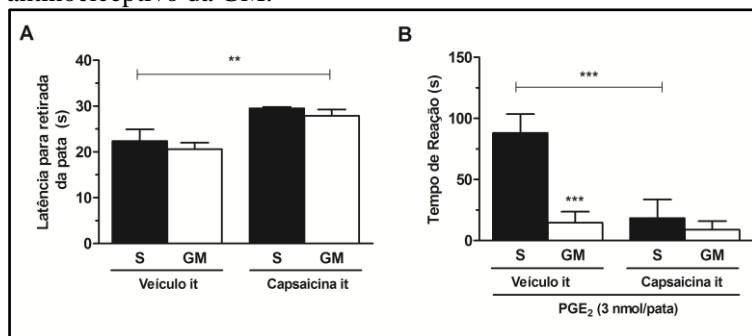
Após 24h da injeção intratecal de veículo (Salina+10% de etanol+10% de Tween 80) ou capsacina (10 µg/sítio), foi verificado a latência para retirada da pata no teste da placa quente à temperatura de 55 °C. Neste teste, os animais que foram injetados com capsacina tiveram um aumento significativo na latência para retirada da pata em relação ao grupo que recebeu somente veículo (Figura 25A). Esse resultado confirma a destruição de terminais centrais que expressam TRPV1.

Em seguida ao teste da placa quente, os animais foram avaliados frente à nocicepção induzida por PGE₂ (3 nmol/pata). Conforme demonstrado na figura 25B, a injeção ipl. de PGE₂ induziu nocicepção no grupo que recebeu veículo intratecalmente. A administração da GM (100 mg/kg, ip.) no grupo veículo foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por

PGE₂, com inibição de 85 ± 11 % (figura 25B), resultado este semelhante ao observado na figura 13.

Interessantemente, os animais que receberam a injeção intratecal de capsaicina e foram tratados com salina ip., tiveram uma acentuada redução da resposta nociceptiva induzida por PGE₂, com redução de 79 ± 17 % em relação ao grupo injetado com veículo it. + PGE₂ ipl. ($p < 0,001$). No entanto, é importante observar que a nocicepção induzida por PGE₂ foi acentuadamente reduzida no grupo de animais que recebeu capsaicina it. e a GM (100 mg/kg, ip.) não alterou essa resposta (figura 25B).

Figura 25 – Avaliação da participação das fibras sensoriais que expressam TRPV1 na nocicepção induzida por PGE₂ e no efeito antinociceptivo da GM.



Legenda: Avaliação da sensibilidade ao calor (placa quente, 55°C) (Painel A) e o efeito da GM (100 mg/kg, ip.) na nocicepção espontânea induzida por PGE₂ (3 nmol/pata) (painel B). As barras representam a média \pm E.P.M., n= 8 animais e a comparação entre os grupos foi realizada através teste one-way ANOVA seguido de pos hoc de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo S (Veículo it. + salina ip.).

5.7 EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA PERSISTENTE INDUZIDA POR CFA

5.7.1 Avaliação da hiperalgesia ao calor

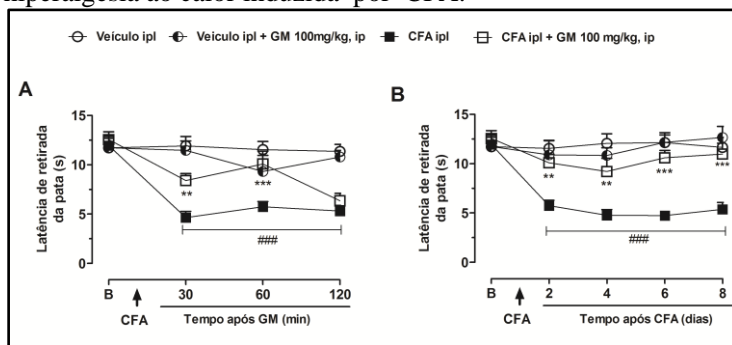
A sensibilidade ao calor foi avaliada 48 horas após a injeção ipl. de CFA ou veículo e conforme demonstrado na figura 26A, o grupo CFA ipl. apresentou uma redução da latência para

retirar a pata do estímulo térmico em relação ao grupo Veículo ipl. ($p < 0,001$). O efeito da administração sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.) foi avaliado ao longo do tempo e observou-se que trinta minutos após sua aplicação ocorreu um aumento da latência de retirada da pata quando comparado ao grupo CFA ipl. ($p < 0,01$), efeito que permaneceu por até 60 minutos ($p < 0,001$) (Figura 26A). A administração *per se* de GM (Veículo ipl. + 100 mg/kg, ip.) não causou alteração na sensibilidade ao calor deste grupo em relação ao grupo Veículo ipl. (Figura 26A).

A injeção ipl. de CFA induziu hiperalgesia ao calor em todos os dias de avaliação (2°, 4°, 6° e 8°) (Figura 26B).

Com base no tempo de efeito da GM observado na Figura 25A, foi escolhido o tempo de avaliação de 1 hora após sua administração. Em todos os dias de avaliação, a latência para retirada da pata dos animais tratados com GM foi aumentada, quando comparado ao grupo CFA ipl. (Figura 26B), demonstrando que o GM foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor. A administração *per se* prolongada de GM (Veículo ipl. + 100 mg/kg, ip.) não causou alteração na sensibilidade ao calor deste grupo em relação ao grupo Veículo ipl. em nenhuma das avaliações (Figura 26B).

Figura 26 - Efeito da administração sistêmica de GM na hiperalgesia ao calor induzida por CFA.



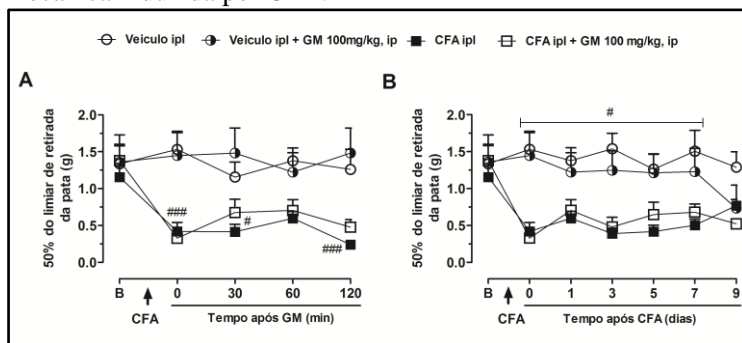
Legenda: Avaliação do decurso temporal de ação da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel A) e avaliação da administração prolongada da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel B) na hiperalgesia térmica ao calor induzida por CFA 80%. Cada ponto representa a média \pm E.P.M., $n = 12$ animais. Os níveis de significância são indicados ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CFA ipl. e ### $p < 0,001$ quando comparado a

grupo Veículo i.pl. (teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni).

5.7.2 Avaliação da alodinia mecânica

A alodinia mecânica foi avaliada 24 horas (Figura 27A) e 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a injeção i.pl. de CFA (Figura 27B) e em contraste à hiperalgesia ao calor (Figura 27), a mesma dose de GM (100 mg/kg, ip.) não teve qualquer efeito na redução da alodinia mecânica induzida por CFA na pata (Figura 27A e B), em nenhuma das avaliações realizadas.

Figura 27 - Efeito da administração sistêmica de GM na alodinia mecânica induzida por CFA.



Legenda: Avaliação do decurso temporal de ação da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel A) e avaliação da administração prolongada da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel B) na alodinia mecânica induzida por CFA 80%. Cada ponto representa a média \pm E.P.M., $n=12$ animais. Os níveis de significância são indicados ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparados ao grupo CFA i.pl. e ### $p<0,001$ quando comparados ao grupo Veículo i.pl. (teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni).

5.8 EFEITO DA GM NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA INDUZIDA POR INCISÃO PLANTAR

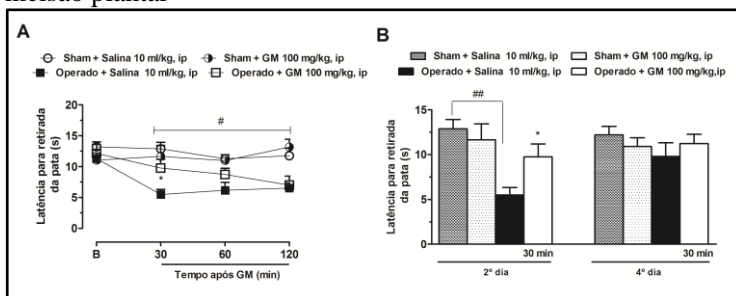
5.8.1 Avaliação da hiperalgesia ao calor

No modelo de dor pós-operatória a hiperalgesia ao calor foi avaliada 48 horas após a incisão plantar. Neste tempo o grupo Operado + salina ip. teve uma redução da latência para retirada da

pata, em relação ao grupo Sham + salina ip., evidenciando a hiperalgesia ao calor. A administração sistêmica de GM (100 mg/kg, ip.) nos animais operados aumentou significativamente a latência para retirada da pata trinta minutos após sua aplicação ($p < 0,05$). A administração *per se* de GM (Sham + 100 mg/kg, ip.) não causou alteração na sensibilidade ao calor deste grupo em relação ao grupo Sham + salina ip. (Figura 28A).

No quarto dia após a incisão a hiperalgesia ao calor foi avaliada novamente e como demonstrado na figura 28B, não houve diferença significativa entre o grupo Operado e o grupo Sham.

Figura 28 – Efeito da GM na hiperalgesia ao calor induzida pela incisão plantar



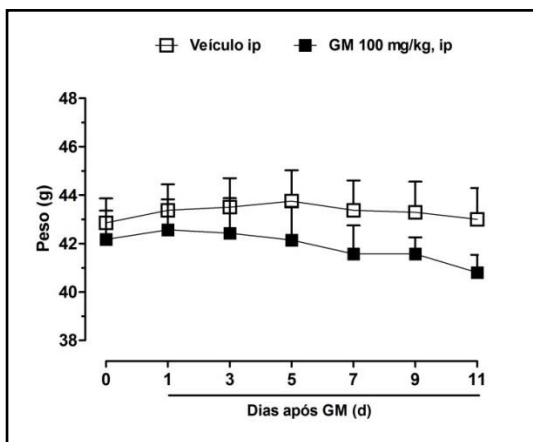
Legenda: Avaliação do decurso temporal de ação da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel A) e avaliação da administração diária da GM (100 mg/kg, ip.) (Painel B) na hiperalgesia ao calor induzida pela incisão plantar. (A) Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 10 animais (teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni). (B) As barras representam a média \pm E.P.M. de 10 animais e a comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Operado+salina ip. e # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ quando comparados ao grupo Sham+salina ip.

5.9 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E POSSÍVEIS EFEITOS DELETÉRIOS DO TRATAMENTO COM O GM EM CAMUNDONGOS

5.9.1 Peso corporal

Conforme apresentado na figura 29, a administração de GM (100 mg/kg, ip.) durante 11 dias consecutivos não causou alteração significativa no peso dos animais em nenhum dos dias avaliados quando comparados com o grupo veículo.

Figura 29 – Avaliação do peso dos animais após administração sistêmica prolongada de GM.

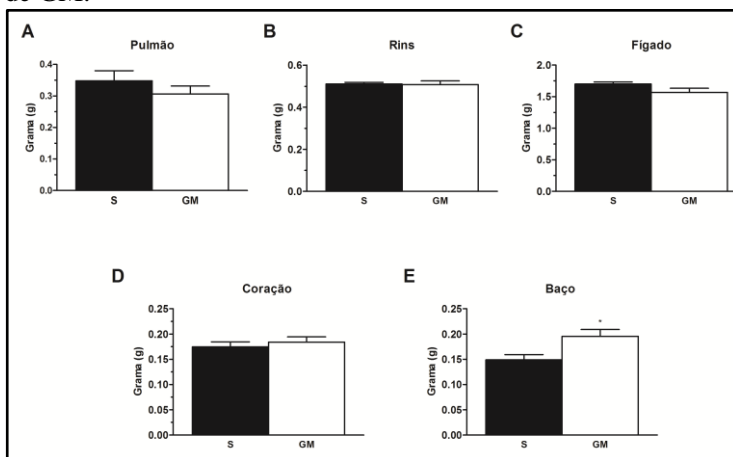


Legenda: Os animais receberam GM (100 mg/kg, ip.) ou salina (10 mL/kg, ip.) 1 vez ao dia e o peso individual dos animais foi avaliado nos dia ímpares. O 0 (zero) indica o peso inicial/basal dos animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *two-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Bonferroni.

5.9.2 Peso dos órgãos vitais

Decorridos 11 dias consecutivos de administração da GM (100 mg/kg, ip.) ou salina (10 mL/kg, ip.), os animais foram sacrificados e os principais órgãos vitais foram retirados e pesados. Como observado na figura 30, não houve diferença significativa no peso dos pulmões, rins, fígado e coração (Figura 30A, B, C e D). Em contraste, o peso do baço foi aumentado nos animais que foram tratados com GM em relação ao seu controles S (salina 10 mL/kg, ip.) (Figura 30E).

Figura 30- Peso dos órgãos vitais após administração prolongada de GM.



Legenda: Efeito da administração prolongada da GM (100 mg/kg, ip.) sobre o peso de órgãos vitais: Pulmões (A), Rins (B), Fígado (C), Coração (D) e Baço (E). As barras representam a média \pm E.P.M., n= 7-8 animais. A comparação entre os grupos foi realizada por teste *t* de Student. Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo S.

5.9.3 Efeito da GM sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos

A tabela 1 demonstra os parâmetros avaliados no sangue no 11º dia de administração da GM (100 mg/kg, ip.) ou salina (10 mL/kg, ip.). Não foi encontrada nenhuma alteração nos parâmetros de triglicérides, glicose, colesterol total, HDL, LDL, uréia, creatinina, AST, ALT e Gama GT, analisados após a administração sistêmica diária de GM.

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos avaliados no soro após aplicação diária da GM

Parâmetro (unidade)	Grupos	
	Veículo ip.	GM 100 mg/kg, ip.
Triglicerídeos (mg/dL)	134.8±1.79	108.3±12.72
Glicose (mg/dL)	165.0±9.4	163.6±12.10
Colesterol total (mg/dL)	112.4±12.13	88.71±3.98
HDL (mg/dL)	68.08± 4.10	56.10±1.78
LDL (mg/dL)	20.63±1.18	17.71±1.27
Uréia (mg/dL)	45.60±2.80	48.59±2.55
Creatinina (mg/dL)	0.25±0.02	0.24±0.02
AST (U/L)	170.3±29.19	164.3±27.68
ALT (U/L)	67.63±9.18	68±10.31
Gama GT^{&} (U/L)	< 0,5	< 0,5

Dados expressos como a média ± erro padrão da média com teste *t* de Student. n=7. [&]Devido ao limite mínimo de detecção deste analito na amostra.

Os parâmetros hematológicos avaliados são demonstrados na tabela 2. A administração diária de GM (100 mg/kg, ip.) ao longo de 11 dias alterou somente o número de leucócito, aumentando significativamente em relação ao grupo Veículo, os outros parâmetros tiveram os mesmos resultados para o grupo que recebeu veiculo ou GM.

Tabela 2: Parâmetros hematológicos avaliados no sangue após aplicação diária da GM

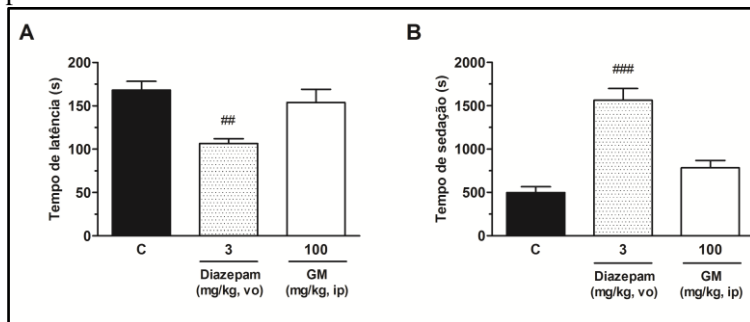
Parâmetro (unidade)	Grupos	
	Veículo ip.	GM 100 mg/kg, ip.
Eritrócitos (milhões/mm ³)	9.34±0.19	9.41±0.22
Hemoglobina (g/dL)	14.86±0.33	14.33±0.41
Plaquetas (mil/mm ³)	1298±75.35	1461±69.00
Leucócitos (mm ³)	9263±937.1	6386±429.0*
Segmentados (%)	21.63±1.77	24.71±1.55
Linfócitos (%)	74.63±2.09	71.14±1.91
Monócitos (%)	3.25±0.31	3.71±0.29

Dados expressos como a média ± erro padrão da média com teste *t* de Student. n=7. A diferença estatística é indicada por * p<0,05 quando comparado com o grupo Veículo.

5.9.4 Sedação por cetamina

Um possível efeito sedativo da GM foi avaliado pelo modelo de sedação induzida por cetamina. Conforme ilustrado na Figura 31 o controle positivo diazepam não alterou o tempo de latência, mas foi capaz de aumentar o tempo de sedação após uma injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg), em relação ao grupo controle (médias de 3011,8 ± 209,7 s e 1438,2 ± 137,5 s, respectivamente). A GM, por outro lado, não alterou nem o tempo de latência e nem o tempo de sedação em relação ao grupo controle.

Figura 31 – Efeito da GM na potencialização da sedação induzida por cetamina



Legenda: Efeitos da GM (100 mg/kg, ip.) e diazepam (3 mg/kg, v.o.) no tempo de latência para sedação (painel A) e na duração da ação sedativa (painel B) induzida por cetamina (100 mg/kg, ip.). Cada coluna representa a média \pm E.P.M., $n=6-7$ animais. A comparação entre os grupos foi realizada através teste *one-way* ANOVA seguido de *pos hoc* de Student-Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ em relação ao respectivo grupo C.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a aplicação da biologia molecular à fisiologia sensorial e pesquisa da dor, tem levado ao descobrimento de múltiplos alvos (receptores e mediadores químicos, entre outros) envolvidos no processamento nociceptivo. Esses avanços permitiram no extraordinário progresso do entendimento dos mecanismos de ação dos neurotransmissores e dos fármacos envolvidos no controle central e periférico da dor (WOOD; DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999). Entretanto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam eficazes e seguras no controle da dor ainda se faz necessário, pois muitos pacientes são refratários aos tratamentos farmacológicos disponíveis. As substâncias obtidas a partir de produtos naturais têm grande relevância na busca de agentes terapêuticos para o controle de diferentes patologias, muitas vezes associadas a dor ou propriamente no controle da dor (por exemplo, a aspirina e morfina, entre outros). Neste contexto, polissacarídeos obtidos de plantas ou de outras fontes naturais podem exercer importantes efeitos farmacológicos, como atividade antitumoral, imunomoduladora e anticoagulante (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; HARDE et al., 2015; OMARSDOTTIR; FREYSDOTTIR; OLAFSDOTTIR, 2006; OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDDOTTIR, 2001), destacando-se o efeito antinociceptivo (analgésico) e anti-inflamatório (SMIDERLE et al., 2008a,b; CARBONERO et al., 2008; BAGGIO et al., 2010; BAGGIO et al., 2012; RUTHES et al., 2013; CHEUNG et al., 2016).

Estudos também indicam que polissacarídeos presentes em fungos liquenizados possuem importantes atividades biológicas, aliado a um baixo nível de toxicidade, o que os torna moléculas farmacologicamente interessantes. Por exemplo, em 2010, Pereira e colaboradores determinaram a estrutura química de uma fração altamente ramificada de glucomanana (GM) extraída do líquen *Heterodermia obscurata* e observaram que a GM possui efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, reduzindo a migração celular e nocicepção no modelo de dor inflamatória somato-visceral causada pelo ácido acético em camundongos. Dando continuidade aos estudos com a GM, nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho demonstrando que esta glucomanana é capaz de reduzir a nocicepção (dor) produzida por

agonistas glutamatérgicos ionotrópico (NMDA) e metabotrópico (trans-ACPD) injetados centralmente. Além disso, foi capaz de prevenir o aumento das concentrações da citocina pró-inflamatória IL-1 β e da alodinia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático em camundongos (CÓRDOVA et al., 2013).

Considerando os dados do efeito antinociceptivo (analgésico) da GM já obtidos, o presente estudo procurou estender os resultados anteriores e avaliar o efeito da GM em modelos de nociceção espontânea e persistente, e também avançar no entendimento dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu efeito, além de investigar a segurança do tratamento com o polissacarídeo. Para tal, foram avaliados os eventuais efeitos deletérios em órgãos vitais em camundongos e analisados alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Primeiramente, foi avaliado o efeito antinociceptivo da GM em um modelo amplamente utilizado na pesquisa de substâncias com potencial atividade analgésica devido à sua característica bifásica, o modelo de nociceção induzida por formalina (MCNAMARA et al., 2007). A resposta nociceptiva inicial (durante os primeiros 5 minutos) promovida pela formalina é causada, predominantemente, pela ativação direta das fibras aferentes primárias do tipo C, embora fibras A (δ e β) também possam estar envolvidas (PUIG; SORKIN, 1995). Quando ativadas, as fibras liberam neurotransmissores como substância P (SP) e aminoácidos excitatórios (glutamato) pelas terminações centrais e periféricas (BARROT, 2012; MCNAMARA et al., 2007), contribuindo na primeira fase da nociceção neste modelo. Em seguida, é observada uma fase quiescente, caracterizada pela ausência de comportamento nociceptivo. A resposta tardia (nociceção inflamatória) é mediada pela combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico com alterações funcionais que culminam na sensibilização central dos neurônios no CDME, e a liberação de substâncias como prostaglandinas (PGE₂) e produção de óxido nítrico (MCNAMARA et al., 2007; BARROT, 2012; TONUSSI; FERREIRA, 1994; ORTIZ et al., 2008). Essa fase envolve a ativação de todas as classes de aferentes sensoriais e persiste independente da maioria das fibras C nociceptivas (SHIELDS et al., 2010). Os AINEs apresentam efeito analgésico no modelo de formalina por inibir localmente a síntese de PGs e,

principalmente, prevenir a liberação de PGE_2 e de neurotransmissores na medula espinal (MALMBERG; YAKSH, 1995; SANTOS; CALIXTO, 1997; FUTAKI et al., 2009; TILLEY et al., 2001). No entanto, é importante salientar que os AINES possuem maior eficácia contra a nocicepção tardia (segunda fase) causada pela formalina (MALMBERG; YAKSH, 1992). Por apresentar tais características, avaliamos o efeito da GM no modelo da nocicepção por formalina (2,5%). A dose de 100 mg/kg de GM reduziu acentuadamente a resposta nociceptiva da fase tardia (segunda fase) da nocicepção causada pela formalina. Assim, estes dados reafirmam que a GM possui efeito antinociceptivo (analgésico) e também suporta que o seu mecanismo de ação pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a inibição da ação ou da produção de mediadores pró-inflamatórios.

Estudos realizados nos últimos 50 anos relacionam e confirmam o envolvimento de mediadores inflamatórios na ativação sustentada e sensibilização de nociceptores de fibras aferentes primárias (sensibilização periférica) (MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005; FERREIRA et al., 1972; FERREIRA; MONCADA; VANE, 1974). Estes processos podem levar a sensibilização central e juntos contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia, principais características encontradas em estados patológicos de dor (por exemplo, neuropatias e dores crônicas inflamatórias) (REICHLING; LEVINE, 1999; MORIYAMA et al., 2005; BIANCHI et al., 2007). Neste sentido, a PGE_2 , um produto de ciclooxigenases (COXs), é o mediador lipídico mais bem conhecido envolvido na dor inflamatória, contribuindo não só na indução de dores agudas, como também na manutenção dos processos dolorosos crônicos, como a dor neuropática (KAWABATA, 2011). Atualmente, a terapia analgésica padrão se baseia no uso de fármacos a base de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), principalmente em estados inflamatórios. Contudo, a segurança desses medicamentos é relativa, pois podem induzir sérios efeitos deletérios no sistema gastrointestinal e renal, assim como o uso de inibidores seletivos da COX-2 foi associado com aumento de risco doença cardiovascular (ZEILHOFER; BRUNE, 2006; KAWABATA, 2011). Por tais razões, a PGE_2 tem um grande impacto sobre os processos envolvidos na nocicepção e consequentemente na dor e a

intervenção farmacológica na cascata de sinalização ativada por esse mediador, desde os receptores até segundos mensageiros e proteínas, é uma estratégia terapêutica para o alívio de dores ainda intratáveis (KAWABATA, 2011).

As concentrações de prostanóides são geralmente reduzidos em estado de homeostase, contudo, durante um processo inflamatório ou lesivo, a concentração e o perfil da produção podem ser alterados acentuadamente. Para tanto, duas enzimas imprescindíveis sofrem aumento na sua atividade, a COX 1 e 2 (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001; KIRKBY et al., 2016). A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa ubiquamente e é responsável pela produção de prostanóide na maioria dos tecidos (KIRKBY et al., 2016). Já a COX-2 está bastante relacionada com a inflamação, fazendo desta enzima o principal alvo terapêutico dos fármacos AINES. Os AINEs estão entre os fármacos mais comumente utilizados na prática clínica como agentes anti-inflamatórios, analgésicos, agentes antipiréticos e para um largo espectro de condições clínicas (AURIEL; REGEV; KORCZYN, 2014). No entanto, a COX-2 também é expressa constitutivamente, na ausência de inflamação aparente, com uma distribuição tecidual específica, que inclui os rins, trato gastrointestinal, cérebro e timo. Neste contexto, a expressão constitutiva da COX-2 é terapeuticamente importante, pois possibilita os efeitos deletérios secundários no sistema cardiovascular, gastrointestinal e renal em indivíduos saudáveis, restringindo o seu uso. Apesar de vários estudos e do uso clínico de AINEs, os processos envolvidos na expressão constitutiva da COX-2 permanecem pouco compreendidos (ZEILHOFER; BRUNE, 2006; KAWABATA, 2011; KIRKBY et al., 2016).

Existem muitos estudos consistentes que relacionam a PGE_2 com as alterações de sensibilidade nos aferentes primários, as quais resultam em modificações centrais. Tais observações podem ser confirmadas através de comportamento nociceptivo espontâneo (dor nociceptiva) em roedores, obtido pela injeção periférica de doses elevadas deste prostanóide (ST-JACQUES; MA, 2014; KASSUYA et al., 2007). Até certo ponto a nocicepção aguda após a exposição à prostaglandinas pode ser benéfica, como um componente da resposta inflamatória. Contudo, sob condições patológicas a nocicepção se torna persistente e, somada a alterações celulares, podem contribuir

para a cronificação da dor (VASKO et al., 2014). De fato, condições de dor crônica, como as doenças inflamatórias (artrite) e neuropáticas, são quadros clínicos graves. Geralmente se manifestam com dor espontânea, hiperalgesia e alodinia e seu tratamento ainda é um desafio em muitos casos (ST-JACQUES; MA, 2014).

No presente estudo, foram confirmados os dados da literatura e também, observado que a injeção do mediador PGE₂ na pata, promoveu comportamento nociceptivo em camundongos (Fig 12), o qual foi prevenido pela GM (100 mg/kg), administrada sistemicamente. Além disso, pode-se observar também que o AINE indometacina (10 mg/kg, ip.) promoveu redução da nocicepção causada pela PGE₂ semelhante ao observado com a administração sistêmica da GM, sugerindo o envolvimento da PGE₂ no efeito antinociceptivo da GM. A inibição local da produção de prostanoídes ou o bloqueio de seus receptores ou via de sinalização intracelular são alvos terapêuticos interessantes, pois limitam a transmissão nociceptiva em nível periférico. Além disso, promovem a redução da liberação de mediadores e neurotransmissores na medula espinal (substância P, CGRP e glutamato, entre outros). Assim, de certa forma, a complexa rede de alterações neuronais que geram a nocicepção e que culmina na dor pode ser controlada (DAVIDSON et al., 2014).

Considerando o efeito apresentado pela GM na nocicepção da PGE₂, bem como na formalina, surgiu a hipótese de ação periférica (local) da GM envolver direta ou indiretamente os receptores EP e as suas vias de sinalização subsequentes. Depois de verificado o efeito *per se* da GM, avaliamos seu efeito periférico na nocicepção espontânea induzida por PGE₂. O tempo de reação à PGE₂ foi menor nos camundongos que receberam GM perifericamente. O AINE indometacina também apresentou efeito antinociceptivo periférico, que pode estar relacionado com a inibição da produção subsequente de PGs ou ainda a uma via independente, por exemplo na produção de NO ou outro mediador. Corroborando com informações da literatura, o inibidor de PKA, KT5720, reduziu a nocicepção induzida neste modelo, que ocorre, em parte, por ativação da via de sinalização ACs/AMPC e PKA e por fosforilação de alvos moleculares. Contudo, a especificidade deste inibidor é controversa, segundo Davies e colaboradores, o composto KT5720 pode atuar em

diferentes proteínas cinase (DAVIES et al., 2000). Mesmo assim, o resultado obtido com o KT demonstra a participação de proteínas cinase, possivelmente PKA e PKC, na nocicepção induzida por PGE₂.

As ações da PGE₂ ocorrem através de quatro receptores que pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) (EP 1-4), e podem excitar diretamente os nociceptores e/ou potencializar os efeitos sensibilizadores de outros mediadores algícos, como o ATP, bradicinina (BK) e os prótons (MORIYAMA et al., 2005; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; ST-JACQUES; MA, 2014). Ademais, todos os quatro subtipos de receptores para PGE₂ são expressos em neurônios sensoriais (ST-JACQUES; MA, 2014). Em geral, o receptor EP1 está associado a uma Gq/11 e assim ativa a PLC, que catalisa a conversão de PIP₂ em IP₃ e DAG, com subsequente ativação de PKC. Os receptores EP3 são acoplados a vários tipos de proteínas G, incluindo a Gs, Gi/o e Gq, dependendo da variante de splicing e do tipo de células. Os receptores EP2 e EP4 são acoplados a proteínas Gs, que ativam ACs e elevam os níveis de AMPc (SMITH; DAVIS; BURGESS, 2000; ST-JACQUES; MA, 2014). Estudos demonstram que o nível aumentado de AMPc está relacionado com a ativação *in vivo* e *in vitro* da PKA, e esta possui papel central no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂ (MALMBERG et al., 1997; ALEY; LEVINE, 1999; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; KASSUYA et al., 2007). A PGE₂ também promove a ativação da sinalização dependente do AMPc/PKA e sensibilização de neurônios do GRD, resultando em hiperalgesia térmica e tátil em modelos de dor inflamatória crônica (SMITH; DAVIS; BURGESS, 2000; St-JACQUES; MA, 2014; BIANCHI et al., 2004).

Conforme descrito nos resultados, a injeção ipl. de PGE₂ diminuiu a latência de retirada da pata ao calor radiante quando comparado ao valor basal, caracterizando um estado de hiperalgesia ao calor. Neste modelo, a administração sistêmica de GM foi capaz de restabelecer o limiar sensorial e de aumentar a latência de retirada ao calor em até 1,5 h após sua administração. Entretanto, de maneira surpreendente a GM administrada sistemicamente, não foi capaz de reduzir a alodinia mecânica (tátil) induzida pela injeção de PGE₂.

A sensibilização das vias nociceptivas por PGE₂ ocorre, em parte, através da sua ligação a receptores EP2, EP3c e EP4, acoplados a proteínas Gs que quando estimuladas promovem a ativação da ACs e subsequente conversão do ATP em AMPc (NATURA et al., 2013; KAWABATA, 20011; ST-JACQUES; MA, 2014). Neste sentido, estudos demonstram que a hiperalgesia ao calor induzida por PGE₂ provavelmente pode ser explicada pela sensibilização de canais TRPV1 e este processo ocorre através da ativação da PKA via o receptor EP4 (BHAVE et al., 2003; SACHS et al., 2009, VILLARREAL et al., 2009) e da PKC via receptor EP1 (KAWABATA, 2011). Além de fosforilar e sensibilizar canais TRPV1, essas cinases podem atuar em canais de sódio voltagem-dependente Nav1.8 e receptor purinérgico do tipo P2X3, que também passam a responder com limiar mais baixo a seus ativadores (MORIYAMA et al., 2005; KAWABATA, 2011; EFENDIEV et al., 2013; NAMER; SCHICK, 2015). Contudo, as informações sobre a ativação de receptores EP e sua participação na nocicepção (dor) muitas vezes é controverso, tornando o entendimento dos seus mecanismos envolvidos na sensibilização dolorosa pouco compreendidos. Estudos demonstraram que a dor aguda ao calor é suprimida com a deleção de EP4, mas é amplificada pela deleção de receptores EP1. Já a dor aguda mecânica (tátil) não é afetada pela eliminação de qualquer um dos receptores para PGE₂ (POPP et al., 2009; KAWABATA, 2011).

O efeito da GM encontrado nos modelos induzidos por PGE₂ sugerem que essa molécula possa atuar via interação com receptores EP, conforme observado pelo seu efeito periférico, e assim inibir também periféricamente a ativação de proteínas cinase A e C, e a fosforilação de alvos como o canal TRPV1, que neste caso se justifica pelo efeito da GM somente na hiperalgesia térmica. A falta de efeito na alodinia mecânica também pode sugerir e confirmar esse fato, pois por mais que a PKA também esteja envolvida nos processos de sensibilização a estímulos mecânicos, parece ser por uma via independente da ativação de receptores EP (POPP et al., 2009; KAWABATA, 2011). Dessa maneira, a ausência de efeito na alodinia mecânica pode estar relacionada à especificidade da molécula GM, pois, parece haver mecanismos neurais distintos envolvidos na hiperalgesia térmica ao calor e na alodinia mecânica induzida por PGE₂, como a participação de receptores ou vias específicas para cada

submodalidade sensorial (MORIYAMA et al., 2005; KAWABATA, 2011). Assim, sugere-se que a antinocicepção (analgesia) promovida pela GM pode depender da interação na via de sinalização da PGE₂, e como consequência promover a redução da sensibilização dos nociceptores e a hipersensibilidade térmica ao calor.

A fim de avaliar a participação da cascata de sinalização mediada por PGE₂, utilizamos um ativador de ACs, a forskolina. Atualmente, estudos moleculares e farmacológicos têm avançando na compreensão sobre o funcionamento das ACs, gerando interesse crescente no desenvolvimento de inibidores seletivos (SEIFERT et al., 2012). De fato, animais *knockout* para os subtipos AC1 e AC8 apresentam menor nocicepção e hipersensibilidade no modelo de formalina e CFA (WEI et al., 2010; PIERRE et al., 2009). A família de ACs tem 9 isoformas ligadas a membrana e uma isoforma solúvel, com diferentes padrões de expressão e influência na fisiologia e patologia (SEIFERT et al., 2012).

Neste trabalho a injeção ipl. de forskolina (FSK), diterpeno ativador de AC 1-8 (PIERRE et al., 2009), induziu nocicepção espontânea, que foi reduzida tanto pela administração sistêmica quanto periférica de GM. A injeção periférica do inibidor não seletivo de PKA, KT5720, reduziu a nocicepção induzida pela FSK, confirmando a participação da via ACs/AMPC/PKA. De maneira interessante, a GM administrada periféricamente mostrou ter efeito antinociceptivo neste modelo, possivelmente por interagir em algum ponto da via de sinalização da PGE₂, potencialmente com a cascata *downstream* aos receptores EP, como as ACs. A redução na atividade de ACs diminui o AMPc formado e assim restabelece o nível basal de PKAs ativadas.

A PKA é uma holoenzima tetramérica, formada por duas subunidades regulatórias (RI e RII) e duas subunidades catalíticas (C), sendo conhecidas três isoformas de C, amplamente expressas em tecidos neuronais e não neuronais: C α , C β e C γ (TURNHAM; SCOTT, 2015; TAYLOR et al., 2008). Após a ligação de duas moléculas de AMPc em cada subunidade R, ocorre uma alteração conformacional na PKA, que libera as subunidades C. Estas cinases ativas fosforilam alvos, como substratos proteicos (canais e receptores) em resíduo de serina e treonina, propagando eventos de sinalização celular, como é o caso da sensibilização de

canais TRPV1 mediada por PGE₂ (TURNHAM; SCOTT; 2015; TAYLOR et al., 2008). Alguns estudos demonstram que a PKA também é capaz de fosforilar canais de cálcio e receptores de glutamato, incluindo as subunidades NR1 dos receptores NMDA e as subunidades GluR1 de receptores AMPA, evidenciando, portanto, a importância da PKA no processamento nociceptivo (SKALHEGG; TASKÉN, 1997; DOLAN; NOLAN, 2001; TAYLOR et al., 2008). Essas evidências também corroboram com resultados da GM obtidos recentemente, que demonstraram o envolvimento de receptores glutamatérgicos e de citocinas no efeito antinociceptivo deste polissacarídeo (CÓRDOVA et al., 2013).

Com os resultados obtidos até aqui e considerando que a ativação da PKA está associada à sensibilização de nociceptores e hiperalgesia, o próximo passo para tentar elucidar os mecanismos da GM foi avaliar a quantidade de PKA fosforilada na pata e medula espinal de camundongos após a injeção periférica de FSK. Indiretamente, avaliamos a atividade de PKA, quantificando a p-PKA após injeção de FSK, usando a técnica de western blot, um método semi-quantitativo. Após a injeção de FSK foi observado um aumento na quantidade de p-PKA no tecido da pata e de maneira interessante o tratamento sistêmico com GM impediu, em parte, esse aumento. Em contrapartida, não foi observado um aumento de p-PKA na medula após a injeção periférica de FSK. Dados da literatura sugerem que a PKA contribui para a hipersensibilidade inflamatória sensibilizando neurônios sensoriais primários enquanto a PKC sensibiliza neurônios secundários, dessa maneira a PKC parece estar envolvida com a transmissão nociceptiva ao nível espinal (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999), o que poderia explicar o resultado encontrado.

Esses resultados mostram que de alguma maneira a GM também pode interagir com a via AMPc/PKA, possivelmente inibindo a atividade de ACs e reduzindo, assim, a formação de AMPc e ativação de PKA. Na tentativa de confirmar funcionalmente a participação dessa via, avaliamos o efeito da GM na hiperalgesia ao calor induzida por FSK. Além do efeito na nocicepção espontânea, a GM administrada ipl. também reduziu a hiperalgesia térmica ao calor induzida por FSK. Esses dados demonstram que parte do efeito da GM é periférico, no local da lesão. Esse perfil de efeito é importante, pois, inibindo a

nociceção na periferia ocorre a diminuição da liberação de neurotransmissores no CDME, e da sensibilização central, podendo explicar o efeito anti-hiperalgésico de pelo menos 1 hora da GM neste modelo.

Apesar de os mecanismos envolvidos na nociceção espontânea e na hiperalgesia serem diferentes, a via AMPc/PKA parece ser um ponto em comum nos modelos utilizados até aqui. De fato, o inibidor da PKA (KT5720), mostrou ter ação antinociceptiva nos modelos de PGE₂ e FSK, inclusive com inibições parecidas, confirmando a participação da PKA nesses modelos. Por exemplo, antagonistas de receptores EP3/4 reduzem a ativação da PKA induzida por PGE₂, reduzindo também a ativação de ERK mostrando que a resposta nociceptiva é um processo complexo que envolve vários fatores (KASSUYA et al., 2007). Neste contexto, o fato de a nociceção ser multifatorial pode ajudar a responder a diferença no efeito periférico da GM na nociceção da PGE₂ (inibição de 63 ± 9%) e FSK (inibição de 28±7%), periféricamente a PGE₂ pode estar atuando em diferentes receptores EP e ainda sensibilizando outros canais e receptores. Já com a FSK têm-se especificamente a ativação das enzimas ACs, o que permite propor que a GM pode atuar em múltiplos alvos ou em um alvo específico que coordena algum ponto do processamento nociceptivo.

Levando em consideração o efeito antinociceptivo apresentado pela GM nos modelos de nociceção espontânea e sensibilidade ao calor, sugerimos que essa glucomanana interage com a via de sinalização que ativa ACs e AMPc/PKA. E esse efeito possivelmente está relacionado ao bloqueio de receptores EP e/ou inibição de ACs. Contudo, a ausência de efeito da GM na alodinia mecânica necessita de mais estudos e pode ser a chave para esclarecer o mecanismo de ação deste polissacarídeo. Se considerarmos o envolvimento da PKA nos processos de sensibilização mecânica e no efeito da GM, seria esperado que houvesse uma redução na alodinia mecânica, o que não ocorreu com a GM. Possivelmente algum mecanismo diferente, subsequente à ativação da PKA, seja a resposta para essa seletividade do efeito da GM.

Neste sentido, a via AMPc/PKA é a principal cascata de sinalização ativada pela PGE₂ que sensibiliza canais TRPV1, com uma importante contribuição para a sensibilização de neurônios do (JULIUS; BASBAUM, 2001; SCHNIZLER et al.,

2008). Ademais, estudos demonstram que camundongos *knockout* para TRPV1 tem uma acentuada redução da hiperalgesia térmica induzida por PGE₂ (MORIYAMA et al., 2005) e ainda, inibidores de PKA (como KT5720) bloqueiam o efeito da PGE₂ em neurônio do GRD (SCHNIZLER et al., 2008).

A ação da subunidade reguladora da PKA depende de proteínas ancoradoras, que a posicionam e facilitam a associação aos substratos, por exemplo, aos canais TRPV1 (BEENE; SCOTT, 2007; SCHNIZLER et al., 2008). A família de proteínas de ancoragem A (AKAP) é composta por mais de 50 proteínas com diferentes funções nas sinalizações e distribuição pelos tecidos, com expressão de pelo menos quatro membros dessa família (AKAP15/18, AKAP150, AKAP250 e Yotiao) no GRD (WONG; SCOTT, 2004). Neste sentido, a AKAP150 é expressa em grande parte de neurônios TRPV1+ do GRD e é essencial para a sensibilização induzida por PGE₂/PKA destes canais (SCHNIZLER et al., 2008). Em animais com mutação no sítio de ligação para PKA na AKAP150 (camundongos Δ 36), ocorre uma acentuada redução da hiperalgesia térmica ao calor induzida por PGE₂. Além disso, a inibição farmacológica da AKAP 150, com o peptídeo Ht31, é capaz de bloquear o efeito potencializador da PGE₂ e FSK em canais TRPV1 (SCHNIZLER et al., 2008; RATHEE et al., 2002).

A AKAP150 também tem capacidade de organizar complexos multiprotéicos, por exemplo, ao posicionar a PKA e PKC próximas a canais TRPV1. De maneira muito interessante, também facilita a formação de complexos protéicos de ACs e TRPV1 e a dissociação de AC de um complexo de AKAP150-TRPV1 em neurônios do GRD abole a sensibilização de canais TRPV1 induzida por FSK e PGE₂ (EFENDIEV et al., 2013). Assim, as proteínas AKAP são componentes moleculares da maquinaria celular que parecem controlar o estado de hiperalgesia ao calor de maneira dependente da via de sinalização AMPc/PKA e da sensibilização de canais TRPV1. Neste contexto, parece pertinente sugerir uma possível interação da glucomanana com os complexos proteicos de AKAPs contendo principalmente ACs, PKA ou TRPV1, e explicaria a redução somente da hiperalgesia ao calor encontrada com a GM, elucidando um mecanismo de ação onde há associação de fatores nociceptivos coordenados por uma proteína central, neste caso a AKAP150.

Tanto a PKA quanto PKC participam dos processos de nociceção e sensibilização de nociceptores, mas pode haver uma diferença temporal de ação. Por exemplo, a sensibilização aguda e hiperalgia induzida por PGE_2 são atenuadas por inibidores da PKA (VASKO et al., 2014). Entretanto, na inflamação crônica ou após exposição repetida a PGE_2 , a sensibilização induzida por esse prostanóide é mantida e não é mais inibida por inibidores de PKA. Ao invés disso, o aumento na excitabilidade de neurônios sensoriais e a hiperalgia induzidos por PGE_2 passam a ser reduzidos por inibidores de PKC (VASKO et al., 2014).

A PKC é uma cinase da subfamília de AGCs (PKA, PKC e PKG). Os membros desta subfamília compartilham o domínio cinase catalítico altamente conservado e um domínio de regulação, que é menos conservado, mas é responsável pela ligação dos ativadores e de proteínas de ancoragem (LIM; SUTTON; RAO, 2015). A PKC representa uma família de enzimas envolvidas em vias de sinalização que especificamente fosforilam substratos em resíduos de serina/treonina. Ademais, elas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com aspectos estruturais e requisitos de ativação: i) as isoenzimas convencionais [α , βI , βII e γ] que são dependentes de cálcio e diacilglicerol (DAG), ii) as isoenzimas originais [$n(\delta, \epsilon, \eta$ e $\theta)$], que são independentes de cálcio mas dependente de DAG e iii) atípicas [$a(\xi$ e $\lambda/i)$] que são independentes de cálcio e DAG (LIM; SUTTON; RAO, 2015; VELAZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007).

Periféricamente, essas isoenzimas são ativadas por um grande número de substâncias liberadas em resposta a uma lesão, entre elas a bradicinina, endotelina-1, prostaglandinas e citocinas, entre outras. Quando ativadas, essas cinases fosforilam vários componentes celulares, incluindo enzimas, canais iônicos e receptores de membrana (LIM; SUTTON; RAO, 2015; VELAZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007). Neste sentido, evidências sugerem que a PKC pode fosforilar substratos como canais TRPs e ASIC, particularmente o termosensor TRPV1. Assim, tanto a PKC quanto PKA fosforilam canais TRPV1 e este evento constitui um sinal específico que sustenta os processos dolorosos (WANG et al., 2015a). Nas terminações centrais dos aferentes primários, a PKC influencia na liberação de neurotransmissores, regulando assim a atividade dos receptores

NK-1, glutamatérgicos e de CGRP nos neurônios pós-sinápticos do CDME (VELAZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007).

Existem ativadores exógenos clássicos de PKCs, como os ésteres de forbol derivados de plantas da família Euphorbiaceae e Thymelaceae (ARNASON; MATA; ROMEO, 1995). Esses diterpenos são análogos do DAG e da mesma maneira, se ligam a PKCs convencionais e novas, estimulando a atividade catalítica da enzima (domínio C1) (CASTAGNA et al., 1982; OHNO; NISHIZUKA, 2002). Em experimentos *in vitro*, os ésteres de forbol produziram excitação direta de aferentes primários (LENG et al., 1996; SCHEPELMANN; MESSLINGER; SCHMIDT, 1993) e a injeção periférica de ativadores de PKC produzem nocicepção espontânea, hiperalgesia térmica e alodinia mecânica em roedores (SOUZA et al., 2002). Além disso, algumas evidências mostraram que a fosforilação (ativação) da PKC é fundamental para a sensibilização central e nocicepção persistente induzida por formalina em ratos (CODERRE, 1993). Recentemente, a β -D-Glucana (GL), um polissacarídeo isolado do cogumelo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., apresentou atividade antinociceptiva em camundongos, inclusive reduzindo as repostas nociceptiva induzida pelo PMA, um ativador de PKC. Além disto, foi confirmado que o efeito antinociceptivo da GL depende da inibição da ativação da PKC ϵ pelo éster de forbol (BAGGIO et al., 2012). No presente estudo, foi demonstrado que a GM administrada sistemicamente promoveu acentuada redução do comportamento nociceptivo induzido pelo ativador de PKC, o PMA, indicando que a inibição da PKC também contribui para o efeito terapêutico apresentado pelo polissacarídeo GM.

Neste ponto, é importante ressaltar alguns aspectos como: 1) o efeito antinociceptivo da GM nos modelos de nocicepção espontânea com a participação da via de receptores EP/PKA; 2) a capacidade da GM de reduzir a nocicepção causada pelo ativador da PKC, o PMA; 3) o efeito sistêmico e periférico da GM de reduzir a hiperalgesia térmica (calor); e 4) a sensibilização de canais TRPs por PKA e PKC; Ainda, a β -glucana GL (*P. pulmonarius*) também demonstrou que promove antinocicepção (analgesia) no modelos de nocicepção espontânea induzida por agonistas do canais TRPA1, TRPM8, TRPV1 e ASIC (BAGGIO et al., 2012). Em conjunto, estas observações permitem formular a seguinte hipótese: será que a GM, a exemplo da GL, pode também promover a inibição de canais TRPs e ASIC?

Diferentes substâncias obtidas de produtos naturais, como a capsaicina (componente da pimenta), mentol (componente da menta) e cinamaldeído (substância encontrada na canela), causam dor e contribuíram de maneira marcante para a descoberta e caracterização dos canais iônicos pertencentes aos membros da superfamília de canais TRPs. Atualmente os TRPs são considerados os principais detectores de estímulos químicos e térmicos expressos em nociceptores (JULIUS, 2013; MICKLE; SHEPHER; MOHAPATRA, 2015). Especialmente os canais TRPV1, TRPM8 e TRPA1 que estão envolvidos na sinalização de detecção de estímulos térmicos e químicos e na produção de dor aguda e persistente (JULIUS, 2013; SISIGNANO et al., 2014; TABERNER et al., 2015). Os TRPs são amplamente expressos em vários tipos de células e desempenham papel chave na regulação de várias funções (YOO; LIM; HWANG, 2013). Notavelmente, esses termosensores polimodais (que respondem a ambos os estímulos, físicos e químicos) tem sua atividade modulada por agentes lipídicos álgicos e outras substâncias liberadas no tecido lesado (TABERNER et al., 2015). Por exemplo, o mediador lipídico PGE₂ tem ação em nociceptores, particularmente na sensibilização de canais TRPV1 (MORIYAMA et al., 2005). Corroborando, camundongos *knockout* para TRPV1 não desenvolvem hipersensibilidade térmica após inflamação periférica com CFA e nem após PGE₂ (PALAZZO et al., 2010). Essas alterações observadas na via nociceptiva envolvendo o termosensor TRPV1 podem explicar a sensibilização ao calor (hiperalgesia) induzida por PGE₂ (NAMER et al., 2015). Esse fato nos chamou atenção, pois como discutido até aqui, a GM apresentou efeito em modelos de nocicepção causados por PGE₂ ou por agentes que promovem a sua liberação. E, notavelmente, a GM foi capaz de reduzir somente a hiperalgesia ao calor induzida por este prostanóide, não apresentando efeito na alodinia mecânica. Considerando o importante papel dos canais TRPV1 na sensibilidade térmica e nociceptiva, o passo seguinte foi investigar a participação desses canais no efeito antinociceptivo da GM.

O receptor TRPV1 é um canal iônico que serve como alvo molecular da capsaicina e além de ser ativado por substâncias naturais, também detectam calor nocivo (com limiar térmico >43 °C) ou prótons (pH reduzido), os quais são conhecidos por causar dor *in vivo* (NUMAZAKI; TOMINAGA,

2004). Estudos utilizando abordagens genéticas evidenciaram que camundongos *knockout* para TRPV1 apresentaram redução completa das respostas fisiológicas e comportamentais promovidas pela capsaicina. Entre elas a diminuição parcial nas respostas ao calor nocivo e resposta normal a estímulos mecânicos nocivos (CATERINA et al., 2006; BOLCSKEI et al., 2005; DAI, 2015). Dessa maneira, esses estudos reafirmaram que o TRPV1 é essencial para as submodalidades sensoriais de dor e hiperalgesia térmica e o mecanismo para estes processos parece envolver alterações relacionadas à inflamação/dano tecidual (NUMAZAKI; TOMINAGA, 2004). Por exemplo, os processos inflamatórios normalmente levam a uma redução do pH e acidez tecidual, e os canais TRPV1 podem ser diretamente ativados por prótons presentes no tecido e levar à transmissão nociceptiva (REEH et al., 2001). Assim, os canais TRPV1 são considerados termosensores chave no desenvolvimento da hipersensibilidade ao calor (MORIYAMA et al., 2005; PALAZZO et al., 2005; REEH et al., 2001).

Para a avaliação dos TRPs, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela injeção ipl. de agonistas seletivos destes transdutores. No caso do TRPV1, foi usado a capsaicina como ativador do canal e indutor de nocicepção. A injeção periférica de capsaicina induziu comportamento nociceptivo nos camundongos e o tratamento prévio com o antagonista vermelho de rutênio (VR) reduziu esse tempo de reação parcialmente, validando a ativação de canais TRPV1 no modelo. A administração sistêmica de GM foi capaz de reduzir acentuadamente e de maneira dependente da dose, a nocicepção induzida pelo agonista de canais TRPV1, capsaicina. Contudo, a GM não apresentou efeito antinociceptivo periférico frente à capsaicina. Esses resultados indicam que provavelmente a GM não atua diretamente nos receptores TRPV1, presentes nas fibras aferentes primárias. No entanto, pode-se sugerir que a GM estaria atuando em vias de sinalização subsequentes à ativação desses receptores ou modulando a liberação de mediadores pelo terminal central da fibra aferente na sinapse com os neurônios nociceptivos de segunda ordem. Ainda, esses dados coletivamente podem sugerir que a redução da hiperalgesia ao calor observada com a GM, deve-se em parte, a alguma interação com canais TRPV1, possivelmente através da via de sinalização AMPc/PKA, podendo envolver também a PKC, considerando o efeito antinociceptivo

no modelo do PMA e também as possíveis interações com proteínas ancoradoras como a AKAP150.

Assim como os canais TRPV1, os canais TRPA1 também estão envolvidos na transdução de estímulos químicos e físicos, sendo considerados transdutores polimodais. Seu papel como detector de frio ainda é controverso (STORY et al., 2003), contudo há um consenso generalizado de que o TRPA1 desempenha um papel importante na quimionocicepção, servindo de detector químico para irritantes que induzem dor aguda e inflamatória (ANDRADE et al., 2012, BASBAUM, 2009; BAUTISTA et al., 2012). Os canais TRPA1 são ativados diretamente por substâncias químicas irritantes como alilsotiocianato, alicina, cinamaldeído, formalina (BANDEL et al., 2004; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005), por temperatura (≤ 18 °C) e estímulos mecânicos e osmóticos (STORY et al., 2003; JULIUS, 2013; DAI, 2015). Neste contexto, mediadores inflamatórios como bradicinina e prostaglandinas podem indiretamente ativar esses canais, relacionando assim sua ativação com situações inflamatórias (DA COSTA et al., 2010), e hipersensibilidade térmica (PERTOVAARA; KOIVISTO, 2011).

De maneira interessante, canais TRPA1 tem uma alta co-expressão com TRPV1 em fibras nociceptivas de pequeno diâmetro (DAI, 2015; STORY, 2003). Esses termosensores polimodais além de mediar a hipersensibilidade ao frio associada aos processos inflamatórios (STUCKY et al., 2009), também apresentam um papel importante na transdução de estímulos mecânicos nestas condições. Entretanto, o papel dos canais TRPA1 na transmissão nociceptiva ao nível espinal ainda não é bem estabelecido (KOSUGI et al., 2007; KLAFKE et al., 2012).

Avaliando a participação dos canais TRPA1 no efeito da GM, foi observado que a administração sistêmica e, surpreendentemente, a periférica deste polissacarídeo reduziu de maneira significativa a nocicepção induzida pelo agonista de TRPA1, o cinamaldeído. A administração do controle positivo, cânfora (antagonista TRPA1) e o efeito de redução do comportamento nociceptivo evidenciaram a participação dos canais TRPA1 neste modelo. A relação dessas informações discutidas sobre TRPA1 e sua participação na hiperalgesia, com os dados obtidos com a GM é contraditória. Esperava-se encontrar efeito na redução da alodinia mecânica induzida por

PGE₂. Isso considerando a participação de canais TRPA1 neste modelo e o efeito da GM (sistêmico e periférico) na nocicepção induzida pelo agonista do canal. Contudo, a abordagem experimental utilizada aqui para verificar a participação de TRPs no efeito da GM, avaliou somente a dor espontânea induzida por agonistas desses canais e não a hiperalgesia. Desta maneira, não se pode fazer uma relação direta com o efeito apresentado na alodinia mecânica e na hiperalgesia ao calor.

Corroborando com os outros dados da GM, alguns estudos têm demonstrado que os canais TRPA1 parecem exercer um relevante papel na transmissão nociceptiva em modelos inflamatórios como o CFA e a formalina. Por exemplo, tanto o bloqueio farmacológico dos canais TRPA1, utilizando um antagonista seletivo (HC-030031), quanto a deleção gênica desses canais, utilizando animais *knockout*, diminuem de modo significativo as respostas nociceptivas à formalina (McNAMARA et al., 2007; STUCKY et al., 2009). Ademais, a fosforilação do TRPA1 e TRPV1 pela PKC e PKA sensibiliza esses canais frente à ação de mediadores inflamatórios (BHAVE et al., 2003) e o bloqueio desse processo também poderia contribuir para o efeito analgésico da GM. Embora o mecanismo exato da participação de canais TRPA1 na transmissão nociceptiva ainda não esteja completamente elucidado (PETRUS et al., 2007; WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009), mais estudos investigando a participação destes canais bem como o efeito da GM na hiperalgesia ao frio são necessários.

Os canais TRPM8 são ativados por uma variedade de agentes naturais e sintéticos, como o mentol, bem como por estímulos térmicos (frio), com um limiar médio de ativação de < 26 °C (JULIUS, 2013). Assim como TRPV1, o TRPM8 é um homotetrâmero não seletivo, mas com acentuada permeabilidade ao cálcio (MCCOY et al., 2011, MCKEMY et al., 2002). Esse canal é expresso por menos de 15% de todos os neurônios somatossensorial, sendo principalmente encontrados nas fibras aferentes do tipo C e Aδ. Um subconjunto destas fibras, as denominadas de TRPM8-positivas, podem co-expressar TRPV1 (TAKASHIMA; MA; MCKEMY, 2010) e/ou CGRP, mas uma grande parte dos neurônios TRPM8 não expressam outros marcadores nociceptivos. Assim, elas são caracterizadas como uma população de fibras sensoriais anatômica e funcionalmente únicas (KOBAYASHI et al., 2005). Estudos recentes utilizando

técnicas de ablação celular seletiva de neurônios contendo TRPM8 demonstraram que esse canal é importante para a sensibilidade ao frio nocivo (DAI, 2015). O mentol é um terpeno cíclico presente no gênero *Mentha*, dando a essas plantas cheiro e sabor característico, induz sensação de refrescância através da ativação de terminais nervosos periféricos, servindo como agonista de receptores TRPM8 (MCKEMY et al., 2002; PEIER et al., 2002). Além disso, já foi observado que o mentol pode induzir sensações nociceptivas de queimação, ardor ou formigamento (GREEN, 1992; WASNER et al., 2004; GREEN, 2005). Quando aplicado topicamente, o mentol pode induzir hiperalgesia ao frio (NAMER et al., 2005).

Neste trabalho, o agonista de canais TRPM8, mentol, foi capaz de induzir nocicepção espontânea nos camundongos. E a administração sistêmica da GM reduziu de maneira dependente da dose, o comportamento nociceptivo induzido pelo mentol. Devido à falta de um antagonista seletivo adequado, neste experimento não fomos capazes de determinar se a resposta ao mentol realmente resultou da ativação de canais TRPM8. Contudo, a GM administrada perifericamente não apresentou efeito antinociceptivo na nocicepção do mentol.

Diversos estudos têm demonstrado que os prótons podem promover a ativação direta de nociceptores, bem como hiperalgesia e que TRPV1 e ASICs são canais iônicos sensores de prótons. Na verdade, a redução do pH (acidificação) tecidual para baixo de 5 ocorre numa variedade de patologias dolorosas, assim os prótons parecem estar envolvidos na geração de dor inflamatória (DEVAL et al., 2004; PREMKUMAR et al., 2005; UGAWA et al., 2005; WANG et al., 2008).

Os canais ASICs são considerados um dos mais importantes receptores que percebem mudanças de pH no organismo. São canais catiônicos voltagem-independente, permeáveis principalmente a Na^+ , e expressos em neurônios de todo o sistema nervoso central e periférico (KWEON; SUH, 2013). Em mamíferos, existem quatro genes (ACCN 1-4) que codificam pelo menos seis subunidades desse canal: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, e ASIC4 (WEMMIE; PRICE; WELSH, 2006). Entre as subunidades de ASIC, a ASIC3, é o sensor de pH mais essencial para a dor, e se distribui por fibras nociceptivas que inervam os músculos cardíacos e esqueléticos, articulações e ossos (KWEON; SUH, 2013). Nestes

tecidos, o metabolismo anaeróbico durante o exercício intenso ou lesão do tecido induz o acúmulo de lactato e prótons, resultando na ativação de nociceptores. Além disso, a inflamação e lesão dos tecidos aumenta os níveis de expressão de ARNm para ASIC1a, ASIC2b, e ASIC3 em neurônios do GRD (KWEON; SUH, 2013). Assim como os canais TRPs, a ativação do ASIC é importante para sensibilizar nociceptores cutâneos e é regulada por mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina, ácido araquidônico, e óxido nítrico (WANG et al., 2008; KWEON; SUH, 2013). Avaliando o efeito da GM foi observado que a administração prévia reduziu a nocicepção induzida por ácido (pH 5,5). Confirmou-se que a resposta nociceptiva induzida por solução salina acidificada foi inibida pelo tratamento com amilorida, um bloqueador dos canais de ASIC. Assim, o efeito antinociceptivo da GM contra injeção ipl. de solução salina acidificada pode ser explicada pela capacidade deste polissacarídeo interagir com ASIC ou canais TRPV1, entretanto a GM não apresentou efeito quando administrado periféricamente neste modelo. Coletivamente, esses resultados indicam que provavelmente a GM não atue diretamente nos receptores que estão presentes nas fibras aferentes primárias, com exceção ao canal TRPA1. No entanto, pode-se sugerir que a glucomanana estaria atuando em vias de sinalização subsequentes à ativação desses receptores ou modulando a liberação de mediadores pelo terminal central da fibra aferente.

Existem dois grandes subconjuntos de aferentes primários não mielinizados (Fibras C) envolvidos no processamento da dor. As fibras TRPV1+, que expressam o canal e uma população de fibras não peptidérgicas, as fibras MrgprD+, que compreendem a maioria dos aferentes cutâneos (ZYLKA et al., 2003, ZYLKA, 2005; BASBAUM et al., 2009). As diferenças anatómicas, como a expressão de peptídeos e as lâminas do CDME para qual se projetam, contribuem para a detecção de modalidades sensoriais específicas pelas diferentes fibras no processamento da dor (BASBAUM et al., 2009; ZHANG et al., 2013). Neste sentido, estudos demonstraram que a injeção intratecal de capsaicina promove uma ablação das fibras TRPV1+ centrais, “dessensibilizando” neurônios do CDME bem como os terminais centrais de aferentes primários TRPV1+. A ablação seletiva dessas fibras produz uma perda quase completa da capacidade de resposta ao calor nocivo sem alterar a resposta a estímulos

mecânicos ou de frio nocivo (ZHANG et al., 2013; CAVANAUGH et al., 2009).

No presente estudo foi utilizada a abordagem de ablação de fibras TRPV1+ através da injeção intratecal de capsaicina para explorar o papel dessas fibras no efeito antinociceptivo da GM. Em conformidade com a literatura, a injeção de capsaicina intratecal induziu ablação de fibras TRPV1+, reduzindo a sensibilidade ao calor dos animais. E de maneira surpreendente, a injeção de capsaicina intratecal praticamente aboliu a nocicepção espontânea induzida por PGE₂. A ausência de resposta nociceptiva nos impossibilitou avaliar o efeito da GM neste modelo e confirmar a dependência de fibras TRPV1+ na sua ação. Porém, os dados obtidos são importantes e contribuem para discussão dos mecanismos de ação da GM, mostrando que o processamento da nocicepção induzida pelo mediador PGE₂ envolve as fibras C (TRPV1+). Aliado ao fato que o GM teve um acentuado efeito de reduzir a nocicepção espontânea e hiperalgesia térmica induzidas por esse prostanóide, sugerindo que pelo menos em parte, o efeito da GM ocorre através da participação das fibras TRPV1+.

Considerando o efeito da GM em modelos de dor aguda e de hiperalgesia térmica, que aparentemente ocorrem através da via de sinalização ativada por PGE₂ e por canais TRPs expressos em fibras C, o questionamento seguinte foi se a GM seria efetiva em um modelo inflamatório crônico, ou seja, se seria capaz de reduzir as hipersensibilidades térmica e mecânicas comumente associadas a estados inflamatórios crônicos.

Neste trabalho, o modelo utilizado para mimetizar um estado inflamatório crônico foi o modelo de inflamação periférica induzida pela injeção ipl. de CFA. A hipersensibilidade foi avaliada através da aplicação de filamentos de von Frey (para verificar a alodinia mecânica) e de calor radiante (para a hiperalgesia térmica ao calor). A administração sistêmica de GM reduziu a hiperalgesia ao calor por até uma hora, mostrando novamente ter efeito anti-hiperalgésico ao calor. O processo inflamatório gerado pelo CFA persiste por dias, permitindo avaliar o efeito de repetidas administrações da GM, nas avaliações feitas ao longo de oito dias a GM mostrou o mesmo perfil de redução da hiperalgesia ao calor.

É consenso na literatura que a inflamação periférica induzida por CFA está associada ao surgimento de hiperalgesia

mecânica e térmica (frio e calor) (FERREIRA et al., 2001; BIANCHI et al., 2007), o que pode ser observado neste trabalho. Além disto, alguns estudos também indicam que a hipersensibilidade associada ao processo inflamatório induzido por CFA é reduzida por AINEs, indicando a participação de PGs no processamento nociceptivo neste modelo (BIANCHI et al., 2007; FUTAKI et al., 2009). A PGE₂ e seus GPCRs induzem sinalizações celulares como a ativação de PKA e PKC, que fosforilam alvos como o canal TRPV1, diminuindo seu limiar de ativação e promovendo a hiperalgesia ao calor. Considerando que a hipótese para o efeito da GM está relacionada com a modulação da via de sinalização da PGE₂ e possivelmente com canais TRPV1, o efeito em reduzir a hiperalgesia térmica neste modelo inflamatório persistente parece se justificar. Alguns estudos demonstram a participação de canais TRPA1 na transdução de estímulos mecânicos em condições inflamatórias (PETRUS et al., 2007; DA COSTA et al., 2010). Considerando que a GM teve efeito periférico e sistêmico na nocicepção induzida pelo agonista desses canais (cinamaldeído), era esperado que a alodinia mecânica induzida por CFA fosse reduzida. No entanto, a GM não apresentou efeito na hipersensibilidade mecânica, assim como na PGE₂. O motivo pelo qual a GM não apresenta efeito na alodinia mecânica ainda não está claro, mas estudos demonstram que a participação do TRPA1 na transmissão nociceptiva também não está completamente elucidada (STUCKY et al., 2009; PETRUS et al., 2007; WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). Segundo Lennertz e colaboradores, a resposta à estimulação mecânica após inflamação com CFA está aumentada em um conjunto de fibras C sensíveis a estímulos mecânico e frio. Apesar da maioria das fibras positivas para TRPA1 também expressar TRPV1 (STORY et al., 2003), a GM pode atuar somente em uma subpopulação de fibras termosensíveis específicas para o calor, que expressam somente TRPV1.

O trauma advindo de uma cirurgia implica em alterações fisiológicas e emocionais que, se não controladas adequadamente, predispõem o paciente a complicações e também a um maior período de internação. Entre as condições que podem afetar a recuperação do indivíduo, a dor merece destaque. É um fenômeno muito frequente no pós-operatório e pode resultar em sofrimento e exposição do paciente a riscos desnecessários (KEHLET; HOOLTE, 2001; MĘDRZYCKA-DĄBROWSKA et

al., 2015). Além disso, muitos pacientes sentem dor moderada a grave, especialmente no decorrer de atividades cotidianas, afetando a sua recuperação (KEHLET; HOOLTE, 2001; CHAORAN, 2011). O controle da dor pós-operatória ainda é um problema, pois os tratamentos atuais têm eficácia limitada (CHAORAN, 2011; KEHLET; HOOLTE, 2001). A terapia de controle se baseia no uso de ferramentas farmacológicas como analgésicos opioides, que apresentam muitos efeitos colaterais, incluindo náusea, sedação e depressão respiratória. O bloqueio local com anestésico também é usado, mas tem a limitação de ser de curta duração, e uso de AINEs, que apresentam vários efeitos secundários indesejáveis (BALLANTYNE et al., 1998).

Nos últimos anos, modelos animais de dor incisional foram desenvolvidos, destacando-se o modelo criado por Brennan et al. (1996) e adaptado para camundongos por Pogatzki e Raja (2003). Neste modelo são observados comportamentos nociceptivos como dor espontânea, hiperalgesia e alodinia, mimetizando, até certo ponto, a dor cirúrgica em humanos (BRENNAN et al., 2005; RICHMOND et al., 1993). A hiperalgesia mecânica e térmica que se desenvolve na área da incisão deve-se a alterações nas vias nociceptivas, como a sensibilização da fibra aferente primária que ocorre no local da incisão. Esse evento reflete em alterações no campo receptivo dos neurônios no CDME, contribuindo para o processo de sensibilização central (ZAHN; BRENNAN, 1999b; ZAHN; BRENNAN, 1999a; POGATZKI; RAJA, 2003). Além disso, Pogatzki e colaboradores mostraram que fibras A δ e fibras C são sensibilizadas pela incisão e que a ativação de nociceptores silenciosos tem um papel importante na manutenção da hiperalgesia após a incisão (POGATZKI; RAJA, 2003). Embora os mecanismos envolvidos na dor pós-operatória ainda não estejam totalmente compreendidos, as pesquisas vem sugerindo a participação de canais e receptores específicos nos processos de sensibilização (POGATZKI et al., 2003; BRENNAN, 2002). Neste sentido, o canal TRPV1 parece ser um alvo molecular importante nos processos de sensibilização térmica neste modelo. Um estudo com camundongos com deleção para TRPV1 concluiu que esses canais são necessários para o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor, mas não para a hiperalgesia mecânica (POGATZKI-ZAHN et al., 2005).

Levando em consideração que os mecanismos envolvidos na sensibilização e hiperalgesia ao calor após incisão parecem ser alvos de ação da GM, como os canais TRPV1, foi avaliado o efeito deste polissacarídeo no modelo de incisão plantar. De encontro à literatura, a incisão plantar induziu hiperalgesia térmica ao calor e a administração sistêmica repetida de GM foi capaz de impedir a redução da latência da pata somente no segundo dia pós-operatório, com efeito terapêutico de trinta minutos. Comparado ao efeito encontrado na hiperalgesia no modelo de CFA, a ação da GM na dor pós-operatória foi bem mais discreta. Já está bem estabelecido que canais TRPV1 participam na nocicepção e hiperalgesia térmica, tendo papel central na dor inflamatória e incisional, porém os mecanismos envolvidos são diferentes. Por exemplo, aparentemente o aumento na expressão de canais TRPV1 no GRD que acontece na inflamação, não ocorre após a incisão (POTGAKZI-ZAHN et al., 2005). Assim, essa diferença de efeito pode estar relacionada ao fato de estados distintos de dor apresentarem conjuntos de mecanismos nociceptivos diferentes.

Na busca por moléculas bioativas com potencialidade para o desenvolvimento de novos medicamentos clinicamente úteis questões como eficácia e segurança devem ser levadas em consideração. Em virtude do efeito antinociceptivo apresentado pela GM em modelos de dor aguda e persistente e do baixo efeito tóxico descrito para polissacarídeos junto à “facilidade” em sofrer modificações, a glucomanana GM parece ser uma molécula natural interessante para fins terapêuticos do controle da dor. Dessa maneira, avaliamos a segurança e os possíveis efeitos inespecíficos e/ou deletérios da administração sistêmica da GM. Foram verificados parâmetros relacionados ao ganho de peso, peso de alguns órgãos vitais, parâmetros bioquímicos como perfil lipídico e marcadores de função hepática e parâmetros hematológicos. A avaliação de um efeito sedativo da GM também foi realizada com o modelo de sedação induzida por cetamina.

A administração sistêmica diária de GM durante onze dias não alterou o peso corporal dos animais e nem o peso dos órgãos vitais, exceto o peso do baço. O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo, contendo cerca de um quarto dos linfócitos. Suas principais funções são iniciar as reações imunológicas a antígenos transmitidos pelo sangue e operar como um filtro para partículas estranhas e glóbulos vermelhos velhos

ou danificados. Essas funções são realizadas por dois compartimentos principais do baço, a polpa branca e a polpa vermelha. A polpa vermelha compreende uma extensa rede de seios venosos que atuam como filtros, interceptando eritrócitos velhos ou danificados que serão fagocitados pelos macrófagos (CESTA, 2006; ADEMA, 2009). Já a polpa branca está envolvida com o início de respostas imunitárias contra antígenos transmitidas pelo sangue e agentes patogênicos. É formada por vários tipos celulares como linfócitos T CD4+ e CD8+, células B migratórias e monócitos/macrófagos, e é organizada em três regiões: a zona de células T ou bainha periarteriolar (PALS), os folículos de células B e a zona marginal (reservatório de células residentes como os macrófagos) (CESTA, 2006; HEY; O'NEILL, 2012). Em humanos, o baço de um indivíduo adulto pesa em torno de 150 g, com aproximadamente 11 cm de comprimento (no sentido crânio-caudal). No entanto, em algumas condições observa-se um aumento do seu peso, e quando atinge 400-500 g é considerado como uma esplenomegalia, tornando-se palpável entre 750 g a 1.000 g. As causas da esplenomegalia são variadas, mas podem envolver processos congestivos, infiltrativos, infecciosos, hematológicos, inflamatórios infecciosos ou não e doenças primárias do baço. No entanto, muitos dos mecanismos de aumento esplênico ocorrem por formas exageradas da própria função normal do órgão (NOVARETTI, 2006; DE LIMA; PEREIRA, 1999).

Levando em consideração os fatos citados, o efeito secundário da GM de aumentar o peso do baço, pode se dar por uma interação com células residentes desse órgão, por exemplo, macrófagos e/ou linfócitos, induzindo proliferação e assim o aumento. Neste sentido, estudos demonstram que alguns polissacarídeos, como as β -glucanas, apresentam ações imunomoduladoras, podendo atuar diretamente em macrófagos ou induzir proliferação de linfócitos em cultura (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; LEI et al., 2015). Aparentemente não foi observado nenhum outro sinal nos animais, como perda de peso e anemia, desta maneira essa alteração encontrada pode se dar dentro dos limites fisiológicos do órgão. Aliado a isso, em humanos o baço tem que aumentar em torno de três vezes para ser considerado em esplenomegalia, o que não aconteceu com os animais que receberam GM. No entanto a análise hematológica mostrou uma redução no número de leucócitos totais no grupo

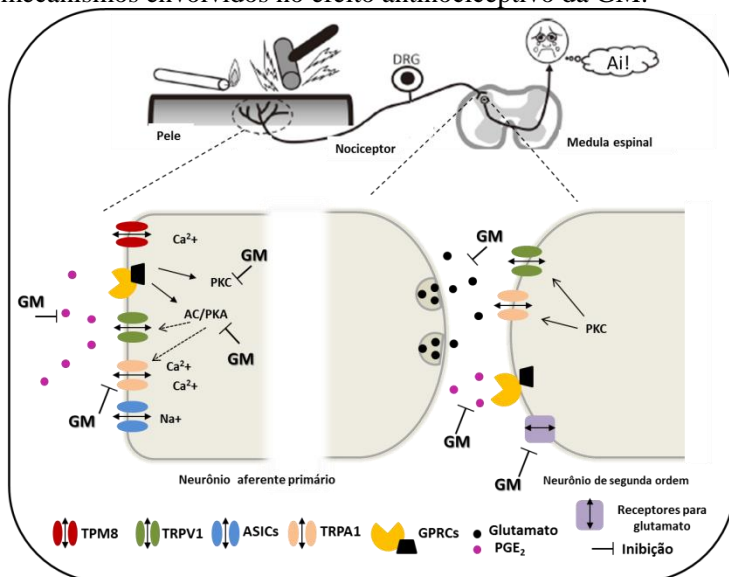
que recebeu GM diariamente. Buscando na literatura, observou-se que a redução do número de leucócitos totais pela GM não pode ser associado a um efeito deletério. Tal afirmativa esta pautada no fato que os valores no numero de leucócitos encontrado no nosso estudo é semelhante ao de camundongos Swiss saudáveis de biotérios nacionais e internacionais (BRANCO et al., 2011). Assim, essas alterações encontradas necessitam de estudos futuros, como histologia e ensaios in vitro, que forneçam informações sobre esse efeito inespecífico da GM no baço e possivelmente no sistema imune. E apesar de inesperado, o efeito secundário encontrado também pode possibilitar estudos para novos fins e aplicações terapêuticas para a GM, por exemplo, explorando um efeito anti-tumoral.

Continuando a avaliação da segurança e toxicidade, foram verificados alguns parâmetros bioquímicos como enzimas hepáticas, creatinina, ureia, além de lipídios (HDL, LDL) e glicose, e após a administração diária de GM durante onze dias não foi encontrada nenhuma alteração. Além disso, é importante salientar também que essas administrações diárias de GM não modificaram o limiar sensorial mecânico e térmico ao calor dos animais, em nenhuma avaliação ao longo do experimento os animais que receberam GM mostraram diferença de resposta para o grupo que recebeu somente salina. Uma molécula com ação central pode ter efeitos importantes, como um efeito sedativo, que também poderia interferir no comportamento dos animais levando a erros na interpretação dos dados. Desta maneira, utilizamos o modelo de sedação induzida por cetamina para descartar um efeito sedativo da GM. Foi observado que a administração sistêmica do polissacarídeo não alterou o tempo de sedação induzido pela cetamina, ao contrário do controle positivo diazepam. Este resultado nos permite sugerir que o efeito antinociceptivo da GM não é decorrente deste efeito inespecífico. Apesar de apresentar baixa toxicidade, estes resultados da GM são apenas preliminares, caso venha a ser efetivamente explorado e desenvolvido para fins terapêuticos, serão necessários mais estudos pré-clínicos aprofundados sobre os efeitos e mecanismos da GM.

Em resumo, a glucomanana GM apresentou efeito antinociceptivo em modelos de dor aguda e persistente com o mecanismo que envolve os receptores EP e canais TRPs e a sinalização dependente da PKA e PKC (figura 32), além de

apresentar boa eficácia e relativa segurança. Pelas suas potencialidades, a GM pode ser uma molécula bastante útil, por exemplo, como base para a derivação química, gerando compostos mais seguros e potentes.

Figura 32 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da GM.



Legenda: Representação esquemática de uma fibra aferente primária e sua sinapse no corno dorsal da medula espinal. No terminal periférico, mediadores inflamatórios como prostaglandina E₂, ativando receptores EP ativam as vias e AC/AMPc/PKA e PLC/PKC. A PKC e a PKA, entre outras ações, fosforilam canais TRPV1 e TRPA1, diminuindo seu limiar de ativação. A GM, por sua vez, pode exercer sua ação periférica por bloqueio direto de canais TRPA1, ou por inibição da fosforilação (e consequente ativação) da PKA. Estas ações, por sua vez, podem diminuir a liberação sináptica de glutamato e diminuir a transmissão mediada pelos receptores de glutamato (AMPA e NMDA), cuja ativação é parcialmente dependente de fosforilação mediada pela PKA. Desta forma, as ações centrais da GM reduzem a sensibilização central, diminuindo a hipersensibilidade associada aos estados crônicos de dor.

Fonte: Córdova M.M.

7 CONCLUSÃO

As conclusões desse trabalho se baseiam nas seguintes afirmações:

- A GM apresenta efeito antinociceptivo na nocicepção espontânea induzida por formalina (fase inflamatória), PGE₂ e FSK;

- A GM apresenta efeito antinociceptivo, diminuindo a hiperalgesia térmica ao calor induzida pelo PGE₂, sem modificar a alodinia mecânica induzida por esse mediador;

- A GM é capaz de prevenir a fosforilação da PKA, diminuindo a nocicepção e a hiperalgesia ao calor induzida por um ativador de ACs;

- Os efeitos antinociceptivos da GM também parecem envolver a PKC e canais TRPs, sendo observada uma redução na nocicepção induzida por PMA e agonistas destes canais;

- A participação das fibras TRPV1+ no efeito antinociceptivo da GM não pode ser confirmada, mas demonstrou-se que a nocicepção induzida por PGE₂ é dependente desta subpopulação de neurônios.

- A GM apresenta efeito antinociceptivo, diminuindo a hipersensibilidade térmica ao calor em um modelo inflamatório de dor persistente e na dor pós-operatória e não alterou a alodinia mecânica;

- O efeito antinociceptivo da GM não é decorrente de efeitos inespecíficos como a sedação;

- A administração diária de GM por um período de 11 dias não acarreta alterações perceptíveis em indicadores toxicológicos como o percentual de ganho de peso ou peso relativo de órgãos vitais como o coração, pulmões, rins e fígado;

- Embora a GM tenha causado um aumento no peso do baço, não foram encontradas outras alterações significativas em parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Assim, a glucomanana extraída do líquen *H. obscurata* apresentou efeito antinociceptivo relevante nos modelos de nocicepção aguda e persistente, sendo esse efeito mediado por interação com a via de sinalização ativada pela PGE₂ (AMPC/PKA) e com canais TRP, principalmente o TRPV1 e TRPA1. Coletivamente, os resultados indicam que a GM pode ser

uma molécula de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da dor principalmente em condições inflamatórias.

REFERÊNCIAS

ADEMA, G.J. Dendritic cells from bench to bedside and back. **Immunol Lett**, v. 122, p. 135–7, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+novos/Como+a+Anvisa+avalia+o+registro+de+medicamentos+novos+n+o+Brasil>>. Acesso em: 16 abril, 2016.

AKESOWAN, A. Reduced fat, added konjac gel pork sausage as affected by chopping times. **J Int Soc Asian Agric Sci**, v. 7, p. 17- 30, 2002.

AKOPIAN, A.N. Regulation of the nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, p. 89-94, 2011.

AMIR, R.; DEVOR, M. Extra spike formation in sensory neurons and the disruption of afferent spike patterning. **Biophys J**, v. 84, n. 4, p. 2700-8, 2003..

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J Neurosci**, v.19, p. 2181-2186, 1999.

ALLEN, D.E.; HATFIELD, G. Medicinal plants in Folk tradition: an ethnobotany of britain and ireland. p. 41-3, 2004.

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

ANDRADE, E.L.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacol Ther**, v. 133, p. 189-204, 2012.

ARNASON, J.T.; MATA, R.; ROMEO, J.T. **Phytochemistry Medicinal Plants**, (Ed.1), v. 29, p. 1-18, 1995.

ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, v.17, n. 9, p.1113-e88.

AURIEL, E.; REGEV, K.; KORCZYN, A.D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. **Handb Clin Neurol**, v.119, p. 577-84, 2014.

AXELROD, F.B.; HILZ, M.J. Inherited autonomic neuropathies. **Semin Neurol**, v. 23, n. 4, p. 381-90, 2003.

BAGGIO, C.H. et al. Antinociceptive effects of (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **J Pain**, v.11, n. 10, p. 965-71, 2010.

BAGGIO, C.H. et al. Antinociception of β -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **Int J Biol Macromol**, v. 50, n. 3, p. 872-7, 2012.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradikinin. **Neuron**, v.41, p. 849-87, 2004.

BALLANTYNE, J. C. et al. The comparative effects of postoperative analgesic therapies on pulmonary outcome: cumulative meta-analyses of randomized, controlled trials. **Anesth Analg**, v. 86, n. 3, p. 598-612, 1998.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.

BASBAUM A. et al., Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p. 267-284, 2009.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. **The Perception of Pain**. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, editors. Principles of

Neuroscience. New York: Appleton and Lange; 2000. pp. 472–491.

BAUTISTA, D.M. et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 12248-52, 2005.

BAUTISTA, D.M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v.124, p. 1269-82, 2006.

BEENE, D.L.; SCOTT, J.D. A-kinase anchoring proteins take shape. **Curr Opin Cell Biol**, v.19, n. 2, p. 192-8, 2007.

BEHERA et al. Tissue culture of some lichens and screening of their antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties. **Phytother Res**, v. 21, n. 12, p. 1159-70, 2007.

BELMONTE, C.; VIANA, F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. **Mol Pain**, v. 4, p.14, 2008.

BENNETT, G.J. A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy. **Clin J Pain**, v. 16, p.139-43, 2000.

BHAVE, G. et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 12480-5, 2003.

BIANCHI, M. et al. Increased substance P and tumor necrosis factor-alpha level in the paws following formalin injection in rat tail. **Brain Res**, v. 1019, n. 1-2, p. 255-8, 2004.

BIANCHI, M. et al. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs. **Anesth Analg**, v.104, n. 4, p. 949-54, 2007.

BOHN, J.A.; BEMILLER, J.N. (1-3)- β -D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr Polym**, v. 28, p. 3-14, 1995.

BÖLCSKEI, K. et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. **Pain**, v. 117, n. 3, p. 368-76, 2005.

BRANCO et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **RBCS**, v.15, n. 2, p.209-14, 2011.

BRENNAN, T.J. et al. Mechanisms of incisional pain. **Anesthesiol Clin North Americ**, v. 23, n. 1, p. 1-20, 2005.

BRENNAN, T.J.; VANDERMEULEN, E.P.; GEBHART, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493-501, 1996.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v. 22, n. 2, p. 162-95, 2005.

CALIXTO, J.B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their function. **Pharmacol Ther**, v. 106, p. 179-208, 2005.

CAMERON, J. The Gaelic names of plants (Scottish, Irish and Mnax) Collected and Artanged in Scientific Order, with Notes on Their Etymology, Uses, Plant Superstitions, etc., among the Celts, with Copious Gaelic, English and Scientific Indices; John Mackay: Glasgow, Scotland, UK, p. 160, 1900.

CARBONERO, E.R. et al. Galactomannans with novel structures from the lichen *Roccella decipiens* Darb. **Carbohydr Res**, v. 340, n. 10, p. 1699-705, 2005.

CARBONERO ER et al. A (1 \rightarrow 6)-linked beta-mannopyrananan, pseudonigeran, and a (1 \rightarrow 4)-linked beta-xylan, isolated from the

lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 206, n. 2, p. 175-8, 2002a.

CARBONERO, E. R. et al. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 61, p. 681- 686, 2002b.

CARBONERO, E. R. et al. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti inflammatory effects. **Food Chem**, v. 111, p. 531-37, 2008.

CASTAGNA, M. et al. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J Biol Chem**, v. 257, n.13, p. 7847-51, 1982.

CATERINA, M.J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 6653, n. 389, p.816-24, 1997.

CATERINA, M.J. Chapter 16 Pathological changes in the nociceptor: alterations in TRPV1 activity and expression. **Handb Clin Neurol**, v. 81, p. 221-9, 2006.

CAVANAUGH, D.J. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 22, p. 9075-80, 2009.

CHAORAN WU, J. X. et al. **Animal Models of Postoperative Pain**. In: ZHANG, C. M. J.-M. (Ed.). *Animal models of pain*. London: Humana Press, 2011.

CHAPLAN, S.R., et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Meth**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEUNG, R.C. et al. Marine natural products with anti-inflammatory activity. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 4, p. 1645-66, 2016.

CESTA, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol Pathol**, v. 34, n. 5, p. 455-65, 2006.

CHRISTOPH, T. et al. Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. **Mol Cell Neurosci**, v. 37, n. 3, p. 579-89, 2008.

CHUA, M. et al. Traditional uses and potential health benefits of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N.E.Br. **J Ethnopharmacol**, v. 128, n. 2, p. 268-78, 2010.

CODERRE, T.J. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v. 52, p. 259-285, 1993.

COLBURN, R.W. et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 379-86, 2007.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, v. 29, p. 421- 37, 2008.

CORDEIRO, L.M. et al. A fungus-type beta-galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 244, n. 1, p. 193-8, 2005.

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

CORTELLI, P. et al. Nociception and autonomic nervous system. **Neurol Sci**, v. 1, p. 41-6, 2013.

CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. TRP channels and pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 8, p. 978-88, 2007.

CRAIG, A.D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 6, p. 303-7, 2003.

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems—cyclic AMP and cyclic GMP—on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 127, p.671-678, 1999.

DA COSTA, D.S.M. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, p. 431-7, 2010.

DAI, Y. TRPs and pain. **Semin Immunopathol**, [Epub ahead of print], 2015.

DAVIDSON, S. et al. Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. **Pain**, v. 155, n. 9, p. 1861-70, 2014.

DAVIES, S.P. et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochem J**, v. 351, p. 95-105, 2000.

DAVIS, J.B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 6783, n. 405, p. 183-7, 2000.

DHAKA, A. et al. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 371-8, 2007.

DE LIMA PEREIRA, A. S. et al., O peso do baço em chagásicos crônicos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n.2, 1999.

DEVAL, E. et al. ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 19, p. 19531-9, 2004.

DEWICK, P.M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Nat Prod Rep**, v. 19, n. 2, p.181-222, 2002.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A. historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303–33, 2012.

DIOGENES, A.; AKOPIAN, A.N.; HARGREAVES, K.M. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 550-5, 2007.

DOBKIN, P.L.; BOOTHROYD, L.J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. **Pain Med**, v. 9, n. 7, p. 881-9, 2008.

DOLAN, S.; NOLAN, A.M. Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase A signaling pathway in sheep spinal cord. **Neurosci Lett**, v. 309, p. 157-160, 2001.

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760-72, 2010.

EFENDIEV, R. et al. Scaffolding by A-kinase anchoring protein enhances functional coupling between adenylyl cyclase and TRPV1 channel. **J Biol Chem**, v. 288, n. 6, p. 3929-37, 2013.

FERREIRA, J. et al. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 1006-12, 2001.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol**, v. 240, n. 102, p. 200-3, 1972.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockage and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, n. 3, p. 365-71, 1990.

FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Proceedings: Potentiation by prostaglandins of the nociceptive activity of bradykinin in the dog knee joint. **Br J Pharmacol**, v. 50, n. 3, p. 461, 1974.

FERREIRA, J. et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p.171-81, 2005.

FUTAKI, N. et al. The importance of brain PGE₂ inhibition versus paw PGE₂ inhibition as a mechanism for the separation of analgesic and antipyretic effects of lornoxicam in rats with paw inflammation. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 607-14, 2009.

GOODRIDGE, H.S. et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. **Nature**, v. 7344, n. 472, p. 471-5, 2011.

GORIN, P.A.J. et al. Lichen carbohydrates. **Ci e Cult**, v. 45, n. 1, p. 27-36, 1993.

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polyssacarharide of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr Res**, v. 128, p. 119 -32, 1984.

GREEN, B.G. The sensory effects of l-menthol on human skin. **Somatosens Mot Res**, v.9, n. 3, p. 235-44, 1992.

GREEN, B.G.; SCHOEN, K.L. Evidence that tactile stimulation inhibits nociceptive sensations produced by innocuous contact cooling. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 90-8, 2005.

HANSEN, M.S. et al. Pain treatment after craniotomy: where is the (procedure-specific) evidence? A qualitative systematic review. **Eur J Anaesthesiol**, v. 28, n. 12, p. 821-9, 2011.

HARDE, H. et al. Divalent toxoids loaded stable chitosan-glucomannan nanoassemblies for efficient systemic, mucosal and cellular immunostimulatory response following oral administration. **Int J Pharm**, v. 487, n. 1-2, p. 292-304, 2015.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p.77-88, 1988.

HARMAYANI, E.; APRILIA, V.; MARSONO, Y. Characterization of glucomannan from *Amorphophallus oncophyllus* and its prebiotic activity in vivo. **Carbohydr Polym**, v. 112, p. 475-9, 2014.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 3, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v.14, n. 2, p. 111-29, 2015.

HEY, Y.Y.; O'NEILL, H.C. Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 11, p. 2611-9, 2012.

HONEGGER, R. **Mycobionts**. In: NASH III, T. H. Lichen Biology. Cambridge: University Press, p. 24-36, 1996.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, v. 67, n. 2-3, p. 313-6, 1980.

JI, R.R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE**, p. 252, 2004.

JONES, J.K.N; STOODLEY, R.J. Fraction using copper complexes. **Method Carbohydr Chem**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JORDT, S.E. et al.. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, p. 260-5, 2004.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 29, p. 355-84, 2013.

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

KASSUYA, C.A. et al. Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E

receptors and protein kinases. **Br J Pharmacol**, v. 150, n. 6, p.727-37, 2007.

KARUNARATNE, D.N.; JAYALAL, R.G.U.; KARUNARATNE, V. **Lichen Polysaccharides In The Complex World of Polysaccharides**. v. 8, 2012.

KAWABATA, A. Prostaglandin E₂ and pain--an update. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 8, p. 1170-3, 2011.

KEHLET, H.; HOLTE, K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. **Br J Anaesth**, v. 87, n. 1, p. 62-72, 2001.

KENSHALO, D.R.; NAFE, J.P. A quantitative theory of feeling: 1960. **Psychol Rev**, v. 69, p. 17-33, 1962.

KIDD, B.L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, v. 87, p. 3-11, 2001.

KIRKBY, N.S. et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 2, p. 434-9, 2016.

KLAFKE, J.Z. et al. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. **Neuroscience**, v. 222, p. 136-146, 2012.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J Comp Neurol**, v. 493, n. 4, p. 596-606, 2005.

KOSUGI, M. et al. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **J Neurosci**, v. 27, p. 4443-51, 2007.

KWEON, H.J.; SUH, B.C. Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. **BMB Rep**, v. 46, n. 6, p. 295-304, 2013.

LAING, R.J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain.

Neuroscientist, [Epub ahead of print], 2015.

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

LEI, N. et al. Effects of Low Molecular Weight Yeast β -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice. **Int J Mol Sci**, v.16, n. 9, p. 21575-90, 2015.

LENG, S. et al. Excitation and sensitization of the heat response induced by a phorbol ester in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. **Neurosci Lett**, v. 206, n. 1, p. 13-6, 1996.

LIM, P.S.; SUTTON, C.R.; RAO, S. Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. **Immunology**, v. 146, n. 4, p. 508-22, 2015.

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

LUO, Z.D. Mechanistic dissection of pain: from DNA to animal models. **Methods Mol Med**, v. 99, p.1-10, 2004.

MALHOTRA, A.K. et al. Betamethasone oral mini-pulse therapy compared with topical triamcinolone acetonide (0.1%) paste in oral lichen planus: A randomized comparative study. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 4, p. 596-602, 2008.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, n. 1, p. 136-46, 1992.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J Neurosci**, v. 15, n. 4, P. 2768-76, 1995.

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, p. 7462-70, 1997.

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, p. 7462-70, 1997.

MARCELLI, M. P. **Fungos Liquezizados**. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. *Biologia de Liqueus*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 25-74, 2006.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, 2005.

MATTHIJSSEN, R.A. et al. Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 119, n. 16, p. 2188-95, 2009.

MCKEMY, D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v. 416, n. 6876, p. 52-8, 2002.

MENSE, S. et al. Anatomy of nociceptors. In: Bushnell MC, Smith DV, Beauchamp GK, Firestein SJ, eds. **The Senses: A Comprehensive Reference**. New York, New York, USA: Academic Press, p. 11–41, 2008.

MEOTTI, F.C.; COELHO, I. DOS S.; SANTOS, A.R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J Pain**, v. 11, n. 6, p. 570-8, 2010.

MICKLE, A.D.; SHEPHERD, A.J.; MOHAPATRA, D. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v.131, p. 73-118, 2015.

McNAMARA, C.R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, p. 13525-30, 2007.

MĘDRZYCKA-DĄBROWSKA, W.; DĄBROWSKI, S.; BASIŃSKI, A. Problems and Barriers in Ensuring Effective Acute and Post-Operative Pain Management - an International Perspective. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 5, p. 905-10, 2015.

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

MEVES, H. The action of prostaglandins on ion channels. **Curr Neuropharmacol**, v. 4, n. 1, p. 41-57, 2006.

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

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci STKE**, p. 272, 2005.

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

MORIYAMA, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol Pain**, v. 17, p. 1-3, 2005.

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

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 1-2, p. 9-16, 2001.

NAMER, B. et al. Differential sensitization of silent nociceptors to low pH stimulation by prostaglandin E₂ in human volunteers. **Eur J Pain**, v. 19, n. 2, p. 159-66, 2015.

NAMER, B. et al. TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol. **Neuroreport**, v. 16, n. 9, p. 955-9, 2005.

NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. **J Mol Med (Berl)**, v.87, n. 10, p. 1015-22, 2009.

NASH III, T. H. Introduction *In*: Nash III, T. H. **Lichen Biology**. Cambridge: University Press, p.1-7, 1996.

NASH, T.H., et al. (eds.) **Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region**. v. 1, 2001.

NATURA, G. et al. Neuronal prostaglandin E₂ receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 33, p. 13648-53, 2013.

NOVARETTI, M.C.Z. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 2, p. 986-96, 2006.

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, M. Nociception and TRP Channels. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 3, n. 6, p. 479-85, 2004.

OBATA, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2393-2401, 2005.

OHNO, S.; NISHIZUKA, Y. Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue. **J Biochem**, v. 132, n. 4, p. 509-11, 2002.

OLAFSDOTTIR, E.S.; INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med**, v. 67, n. 3, p. 199-208, 2001.

OLAFSDOTTIR, E.S. et al. Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnia subuliformis*. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 273-9, 1999.

OMARSDOTTIR, S.; OLAFSDOTTIR, E.S.; FREYSDOTTIR, J . Immunomodulating effects of lichen-derived polysaccharides on monocyte-derived dendritic cells. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 11, p. 1642-50, 2006.

ORTIZ, M.I. et al. Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 1, p. 32-7, 2008.

PALAZZO, E. et al. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. **Mol Pain**, v. 6, p. 66, 2010.

PEIER, A. M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v.108, n. 5, p. 705-15, 2002.

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

PERL, E.R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Prog Neurobiol**, v. 94, p. 20–38, 2011.

PEREIRA, M.I. **Caracterização estrutural de polissacarídeos dos fungos liquenizados *Heterodermia obscurata* e *Punctelia constantimontiu***. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

PEREIRA, M.I. et al. Chemical structure and selected biological properties of a glucomannan from the lichenized fungus *Heterodermia obscurata*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2132-39, 2010.

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, p. 1-4, 2011.

PETRUS, M. et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Mol Pain**, v. 3, p. 40, 2007.

PIERRE, S. et al. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 4, p. 321-35, 2009.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023-7, 2003.

POGATZKI-ZAHN, E.M. et al. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. **Pain**, v. 115, n. 3, p. 296-307, 2005.

POPP, L. et al. Comparison of nociceptive behavior in prostaglandin E, F, D, prostacyclin and thromboxane receptor knockout mice. **Eur J Pain**, v. 13, n. 7, p. 691-703, 2009.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p.319-25, 2002.

PREMKUMAR, L.S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sci**, v. 92, n. 8-9, p. 415-24, 2013.

PREMKUMAR, L. S. et al. Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C mediated dephosphorylation. **J Neurosci**, v. 25, n. 49, p. 11322-9, 2005.

PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase 2 activity. **Pain**, v. 64, p. 345-355, 1996.

PURVIS, W. Lichens; **Natural History Museum, London**/Smithsonian Institution: Washington D.C., USA, p. 112, 2000.

RATHEE, P.K. et al. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 22, n. 11, p. 4740-5, 2002.

REEH, P.W.; KRESS, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Curr Opin Pharmacol**, v. 1, p. 45-51, 2001.

REICHLING, D.B., LEVINE, J.D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain**, Suppl 6:S, p. 103-9, 1999.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Med**, v. 16, n. 11, p. 1267-76, 2010.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

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

RICHMOND, C. E. et al. Preoperative morphine pre-empts postoperative pain. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 73-5, 1993.

RUTHES, A.C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydr Polym**, v. 98, n. 1, p. 761-9, 2013.

SACHS, D. et al. The role of PKA and PKC epsilon pathways in prostaglandin E₂-mediated hypernociception. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 5, p. 826-34, 2009.

SAMAD, T.A., SAPIRSTEIN, A., WOOLF, C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 8, p. 390-96, 2002.

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

SCHEPELMANN, K.; MESSLINGER, K.; SCHMIDT, R.F. The effects of phorbol ester on slowly conducting afferents of the cat's knee joint. **Exp Brain Res**, v. 92, n. 3, p. 391-8, 1993.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 3, p. 317-33, 2006.

SCHNIZLER, K. et al. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E₂ in mouse sensory neurons. **J Neurosci**, v. 28, n. 19, p. 4904-17, 2008.

SHIELDS, S.D. et al. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 422-9, 2010.

SEIFERT, R. et al. Inhibitors of membranous adenylyl cyclases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 2, p. 64-78, 2012.

SISIGNANO, M. et al. TRP-channels as key integrators of lipid pathways in nociceptive neurons. **Prog Lipid Res**, v. 53, p. 93-107, 2014.

SKALHEGG, B.S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway: differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. **Front Biosci**, v. 2, p. 331-342, 1997.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6) linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **Eur J Pharmacol**, v. 597, n. 1-3, p. 86-91, 2008a.

SMIDERLE, F. R. et al. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, n. 15, p. 2731-6, 2008b.

SMITH, J.A.; DAVIS, C.L.; BURGESS, G.M. Prostaglandin E₂-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 9, p. 3250-8, 2000.

SOUZA, A.L. et al. *In vivo* evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 1, p. 239-47, 2002.

ST-JACQUES, B.; MA, W. Peripheral prostaglandin E₂ prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. **Exp Neurol**, v. 261, p. 354-66, 2014.

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, 2003.

STUCKY, C.L. et al. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Res Rev**, v. 60, p. 2-23, 2009.

TABERNER, F.J. et al. TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, n. 9, p.1818-27, 2015.

TAKASHIMA, Y.; MA, L.; MCKEMY, DD. The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. **Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 828-42, 2010.

TAYLOR, S.S. et al. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, p. 16-26, 2008.

TAYLOR, M.E.; DRICKAMER, K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. **J Biol Chem**, v. 268, n. 1, p. 399-404, 1993.

TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Mannose-containing heteropolysaccharides of lichens: an unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3467-3470, 1992.

TEHLER, A. **Systematics, phylogeny and classification**. In: NASH III, T.H. Lichen biology. Cambridge: University Press, p. 217-239, 1996.

TERMAN, G.W.; BONICA, J.J. **Spinal mechanisms and their modulation**. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3^a ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams and Wilkins; p. 73, 2003.

TESTER, R.F.; AL-GHAZZEWI, F.H. Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan. **J Sci Food Agric**, [Epub ahead of print], 2015.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531-543, 1998.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur J Pharmacol**, v. 251, n. 2-3, p. 173-9. 1994.

TILLEY, S.L.; COFFMAN, T.M.; KOLLER B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J Clin Invest**, v. 108, n.1, p.15-23, 2001.

TURNHAM, R.E.; SCOTT, J.D. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. **Gene**, v. 577, n. 2, p. 101-8, 2016.

UGAWA, S. et al. In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 136, n. 1-2, p. 125-33, 2005.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cycloxygenases] in the spinal cord. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 4, p. 327-63, 2001.

VASKO, M.R. et al. Nerve growth factor mediates a switch in intracellular signaling for PGE2-induced sensitization of sensory

neurons from protein kinase A to Epac. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104529, 2014.

VÁZQUEZ-VELASCO, M. et al. Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker ratsfed atherogenic diets. **J Physiol Biochem**, v. 71, n. 4, p. 611-22, 2015.

VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol Res**, v. 55, p. 578-89, 2007.

VILLARREAL, C.F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: the involvement of distinct signaling pathways. **Life Sci**, v. 85, p. 822-9, 2009.

WANG, S. et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v. 131, p. 1241-51, 2008.

WANG, S. et al. Modality-specific mechanisms of protein kinase C induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is polymodal sensitization site. **Pain**, v. 156, n. 5, p. 931-41, 2015a.

WANG, Y. et al. Two natural glucomannan polymers, from Konjac and Bletilla, as bioactive materials for pharmaceutical applications. **Biotechnol Lett**, v. 37, n.1, p.1-8, 2015b.

WASNER, G. et al. Topical menthol-a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**, v. 127, n. 5, p. 1159-71, 2004.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 12, p. 973-85, 2003.

WEI, H. et al. A. Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 578-84, 2010.

WEMMIE, J.A.; PRICE, M.P.; WELSH, M.J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 578-86, 2006.

WONG, W.; SCOTT, J.D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 12, p. 959-70, 2004.

WOOD, J.N. DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 59, p. 457-82, 1997.

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

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

YOO, S.; LIM, J.Y.; HWANG, S.W. Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4708-44, 2014.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Incision-induced changes in receptive field properties of rat dorsal horn neurons. **Anesthesiology**, v. 91, n. 3, p. 772-85, 1999a.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 90, n. 3, p. 863-72, 1999b.

ZHANG, J. et al. The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociceptive neurons. **J Physiol**, v. 591, n. 4, p.1097-110, 2013.

ZEILHOFER, H.U.; BRUNE, K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 9, p. 467-74, 2006.

ZEILHOFER, H.U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochem Pharmacol**, v. 73, n. 2, p. 165-174, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

ZYLKA, M. J. et al. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 17, p. 10043-8, 2003.

ZYLKA, M. J. Nonpeptidergic circuits feel your pain. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 771-2, 2005.

ANEXO 1

Protocolos de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931c868325702e0075531>

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00682

Título

Análise do envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito terapêutico da glucomanana (GM) em modelos de dor aguda e crônica em camundongos

Data de Entrada

20/06/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

02/12/2011

Considerações

Ofício nº 202/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: 5326 (cinco mil, trezentos e vinte e seis) unidades *Mus musculus* (camundongos).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 08/03/2016

Data 08/12/2011

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#) [Criar Relatório](#)



[Parecer 1_PP_diversos.pdf](#)

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.msF48fc5b9fe9931c868325702e007553/>

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00682

Título

Análise do envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito terapêutico da glucomanana (GM) em modelos de dor aguda e crônica em camundongos

Data de Entrada

20/06/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

02/12/2011

Considerações

Ofício nº 202/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: 5326 (cinco mil, trezentos e vinte e seis) unidades *Mus musculus* (camundongos).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 08/03/2016

Data 08/12/2011

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#)[Criar Relatório](#)

[Parecer 1 PP diversos.pdf](#)