

Cristiane Hatsuko Baggio

Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1→3),(1→6) β-glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.

CURITIBA

2010

Cristiane Hatsuko Baggio

Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1→3),(1→6) β-glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques

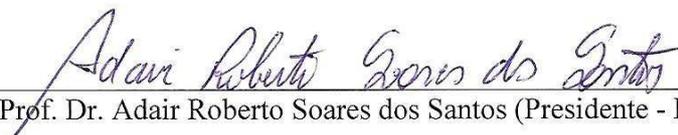
CURITIBA

2010

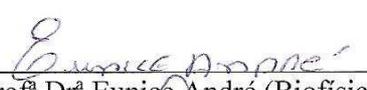
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

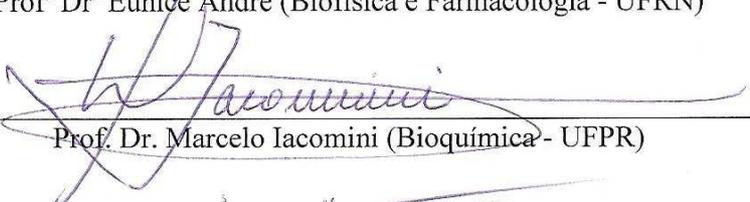
ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

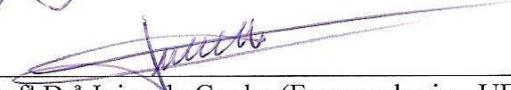
Ao sexto dia do mês de abril do ano de dois mil e dez, às nove horas, no Anfiteatro nº10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia **CRISTIANE HATSUKO BAGGIO** intitulada: "MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA (1→3), (1→6)-B-GLUCANA DO *Pleurotus pulmonarius*", sob orientação do Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e composta pelos professores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Presidente - Dep. Fisiologia - UFSC); Prof. Dr. Carlos Fernando Mello (Fisiologia e Farmacologia - UFSM); Profª Drª Eunice André (Biofísica e Farmacologia - UFRN); Prof. Dr. Marcelo Iacomini (Bioquímica - UFPR); Profª Drª Joice da Cunha (Farmacologia - UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 6 de abril de 2010.


Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Presidente - Dep. Fisiologia - UFSC)


Prof. Dr. Carlos Fernando Mello (Fisiologia e Farmacologia - UFSM)


Profª Drª Eunice André (Biofísica e Farmacologia - UFRN)


Prof. Dr. Marcelo Iacomini (Bioquímica - UFPR)


Profª Drª Joice da Cunha (Farmacologia - UFPR)

*Aos meus pais, **Maria** e **Oswaldo**, pelo
apoio incondicional...*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e Profa. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques, por abrirem as portas do mundo da ciência. Agradeço pela confiança, paciência, respeito e, além disso, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki e Fhernanda Smiderle (Departamento de Bioquímica, UFPR) pelo isolamento e fornecimento da β -glucana.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae (Departamento de Farmacologia, UFSC), pela oportunidade de realizar os experimentos de western blot.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Ao meu amor Giulliano que sempre apoiou minha paixão à farmacologia.

À minha amiga Maria Fernanda pelas “conversas nociceptivas na casinha de floripa” e pela ajuda fundamental, principalmente na reta final deste trabalho.

Às minhas “filhas” Marina e Morgana que sempre estiveram ao meu lado, tanto nas horas boas (com muito JB!!) como nas horas ruins. A amizade e o apoio de vocês foram muito importantes.

À Cristina pela ajuda nos experimentos e o companheirismo desde que entrei no estágio voluntário em 1999.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Débora, Vanessa, Leidi, Daniel, Daniela, Rodrigo, Allisson, Ney, Fran, Tati, Bira, Vini e Serginho. É difícil encontrar em um grupo grande tanta união...

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (UFPR) e do Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSC).

À CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via aferente primária e suas conexões no corno dorsal da medula espinhal.....	20
Figura 2: Resposta inflamatória.....	29
Figura 3: Fotos do <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quel.....	32
Figura 4: Estruturas básicas das β -glucanas.....	34
Figura 5: Estrutura química da (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) β -glucana (GL).....	39
Figura 6: Efeito do GL sobre as contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos por ácido acético 0,6% em camundongos.....	59
Figura 7: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por formalina 2,5% em camundongos.....	60
Figura 8: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo) em camundongos.....	61
Figura 9: Efeito do GL sobre a atividade locomotora espontânea em camundongos.....	62
Figura 10: Efeito do GL sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares induzida pela carragenina.....	63
Figura 11: Efeito do GL sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 induzida pela carragenina.....	64
Figura 12: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por capsaicina (5,2 nmol/pata) em camundongos.....	65
Figura 13: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por cinamaldeído (10 nmol/pata) em camundongos.....	66

Figura 14: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por mentol (1,2 μ mol/pata) em camundongos.....	67
Figura 15: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela salina ácida (2%, pH1,98/pata) em camundongos.....	68
Figura 16: Efeito da administração de capsaicina sobre os movimentos de limpeza dos olhos e efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético 0,6% em camundongos com depleção de fibras sensíveis à capsaicina.....	69
Figura 17: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, <i>i.p.</i>) sobre o efeito antinociceptivo do GL no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina (5,2 nmol/pata) em camundongos.....	70
Figura 18: Efeito do pré-tratamento com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo do GL no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.....	71
Figura 19: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.....	72
Figura 20: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelos AAE (NMDA, AMPA, cainato e trans-ACPD) e SP em camundongos.....	73
Figura 21: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) em camundongos.....	74
Figura 22: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por PMA (500 pmol/pata).....	75
Figura 23: Efeito do GL sobre a translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana em resposta a injeção intraplantar de PMA.....	76
Figura 24: Fotos dos astrócitos da medula espinhal de camundongos	

imunorreativos para GFAP após a injeção de formalina.....	77
Figura 25: Efeito do GL sobre os astrócitos imunorreativos para GFAP na medula espinhal de camundongos após a injeção de formalina.....	78
Figura 26: Efeito do GL sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	79
Figura 27: Efeito do GL administrado diariamente sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	80
Figura 28: Efeito do GL sobre a nocicepção: possíveis alvos de ação.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AAEs	Aminoácidos excitatórios
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ASICs	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BK	Bradicinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DI₅₀	Dose que inibe a resposta em 50%
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
JNK	Proteína quinase c-Jun-N-terminal
NK1	Receptor neurocinina do tipo 1
NKs	Neurocininas
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NO	Óxido nítrico
p38	Proteína quinase p38
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Miristato-acetato de forbol
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PVDF	Membranas de polivinilidenodifluorido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TLR	Recetor do tipo toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
trans-ACPD	Ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório relacionado a proteína anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transitório melastatina 8
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1

RESUMO

A β -glucana é um polissacarídeo isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., um cogumelo comestível conhecido no Japão como “usuhiratake”. Uma variedade de efeitos biológicos tem sido atribuída a essas glucanas, como propriedades antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e imunomodulatória. O presente estudo avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1→3),(1→6) β -glucana (GL), verificando seus possíveis mecanismos de ação. O GL administrado pela via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.) reduziu de forma dependente da dose a nocicepção induzida pelo ácido acético. Além disso, o GL (i.p.) também reduziu a migração de células e extravasamento plasmático após a injeção de ácido acético. A nocicepção induzida pela formalina também foi diminuída com a administração do GL (i.p.). O tratamento com o GL reduziu a migração de leucócitos, neutrófilos e mononucleares induzidos pela carragenina, além de aumentar os níveis de IL-10. Entretanto, a antinocicepção provocada pela GL não foi afetada pelo tratamento dos animais com o antagonista opióide (naloxona) e nem foi associada a uma ação sedativa ou relaxante muscular, observado no teste do campo aberto. A antinocicepção causada pelo GL no teste do ácido acético foi parcialmente revertida pelo pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (inativador da proteína Gi/o). O tratamento (i.p.) dos animais com o GL também preveniram a nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de capsaicina, cinamaldeído, mentol e salina ácida, mas não quando co-administrado na pata com esses agonistas. Além disso, foi demonstrado que as fibras sensoriais do tipo C e A δ sensíveis a capsaicina estão parcialmente envolvidas na atividade antinociceptiva promovida pela glucana. A nocicepção induzida pelo glutamato i.pl., bem como, a nocicepção induzida pela injeção intratecal (i.t.) de AEE para receptores ionotrópicos e da citocina pró-inflamatória, IL-1 β foram reduzidas com a administração do GL. O GL foi efetivo em inibir tanto a nocicepção quanto a ativação da PKC ϵ (através da análise de Western blot) induzida pela injeção i.pl. de PMA (ativador da PKC). O tratamento dos animais com o GL também diminuiu a imunorreatividade para GFAP de astrócitos da medula espinhal após a indução da nocicepção pela formalina. O GL inibiu a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos. Coletivamente, o presente trabalho demonstrou que o GL possui um interessante efeito antinociceptivo quando avaliada em vários modelos de nocicepção aguda química e crônica em camundongos. Além disso, o GL apresentou marcada ação anti-inflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenina. Os mecanismos de ação antinociceptiva e anti-inflamatória do GL ainda estão sob investigação, contudo, neste trabalho pode-se demonstrar que a inibição da PKC e da ativação astrocitária e o aumento dos níveis de IL-10 estão envolvidos na ação antinociceptiva e anti-inflamatória do GL.

Palavras-chave: *Pleurotus pulmonarius*, β -glucana, antinocicepção, anti-inflamatória, PKC e IL-10.

ABSTRACT

β -glucan is a polysaccharide isolated from *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., an edible mushroom known as “usuhiratake” in Japan. A variety of biological effects have been ascribed to β -glucans, namely antitumoral, antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. The present study assessed the possible antinociceptive and anti-inflammatory action of the (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) β -glucana (GL), evaluating its possible mechanisms of action. The oral (*p.o.*) and intraperitoneal (*i.p.*) administration of GL reduced in a dose-dependent manner the nociception induced by acetic acid. Besides, GL (*i.p.*) also reduced the cellular migration and plasmatic extravasation after acetic acid injection. The formalin-induced nociception was inhibited by GL administration (*i.p.*). GL treatment reduced the leukocyte migration, neutrophils and mononuclears induced by carrageenan, and increased the IL-10 levels. However, the antinociception caused by the GL was not affected by intraperitoneal treatment of mice with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist) and was not associated with nonspecific effects such as muscle relaxation or sedation, observed in the open-field test. The antinociception caused by GL in the acetic acid test was partially reverted by Gi/o protein inactivation (pertussis toxin treatment). *I.p.* treatment of animals with GL also prevented the nociception induced by intraplantar (*i.pl.*) injection of capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidified saline, but not when these agonists were co-administered with GL. Therefore, the capsaicin-sensitive C-fibers seem partially play a critical role in the antinociception caused by the glucan. The nociception induced by glutamate (*i.pl.*) and by NMDA, AMPA, kainate and IL-1 β intrathecal (*i.t.*) injections were reduced GL administration. the administration of GL reduced the nociception induced by *i.pl.* injection of PMA. Western blot analysis revealed that GL treatment fully prevented PKC ϵ activation by PMA in mice hindpaw. The treatment with GL also reduced the GFAP immunoreactivity of astrocytes from spinal cord after the formalin-induced nociception. Finally, the GL also reduced mechanical allodynia evaluated by von Frey monofilament fibers, induced by partial sciatic nerve injury neuropathy. Collectively, this present study showed that GL has an interesting antinociceptive and anti-inflammatory effect. The precise mechanisms through which GL exerts its action are currently under investigation, but the present study showed that the inhibition of PKC and astrocytes activation and the increasing IL-10 levels are involved in the antinociceptive and anti-inflammatory action of GL.

Key words: *Pleurotus pulmonarius*, β -glucan, antinociception, antiinflammatory, PKC and IL-10.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Dor.....	18
1.2 Inflamação.....	27
1.3 <i>Pleurotus pulmonarius</i>	31
1.3.1 β -glucanas.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo final.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Polissacarídeo.....	39
4.2 Animais.....	39
4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	40
4.3.1 Contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.....	40
4.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	41
4.3.3 Nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo).....	42
4.3.3.1 Placa quente.....	42
4.3.3.2 Retirada da cauda.....	43
4.3.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	43
4.3.5 Peritonite induzida por carragenina.....	44

4.3.5.1 Contagem dos leucócitos peritoneais.....	44
4.3.5.2 Determinação dos níveis de citocinas.....	45
4.3.6 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo.....	45
4.3.6.1 Participação de receptores de potencial transitório (TRP) e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC).....	45
4.3.6.1.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	45
4.3.6.1.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.....	46
4.3.6.1.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.....	47
4.3.6.1.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida em camundongos.....	47
4.3.6.2 Participação das fibras sensíveis à capsaicina.....	48
4.3.6.3 Participação do sistema opióide.....	48
4.3.6.4 Participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis.....	49
4.3.6.5 Participação do sistema glutamatérgico e substância P.....	50
4.3.6.5.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	50
4.3.6.5.2 Nocicepção induzida pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios e da substância P em camundongos.....	50
4.3.6.6 Participação das citocinas pró-inflamatórias.....	51
4.3.6.7 Participação da proteína quinase C.....	52
4.3.6.7.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de miristato-acetato de forbol (PMA) em camundongos.....	52

4.3.6.7.2 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares.....	52
4.3.6.7.3 Ensaio de Western Blot.....	53
4.3.6.8 Participação dos astrócitos da medula espinhal.....	54
4.3.7 Neuropatia periférica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	55
4.4 Análise Estatística.....	56
5 RESULTADOS	58
5.1 Efeito do GL sobre as contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.....	58
5.2 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	60
5.3 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo).....	61
5.4 Efeito do GL sobre a atividade locomotora espontânea em camundongos.....	62
5.5 Efeito do GL sobre a peritonite induzida por carragenina.....	62
5.6 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	65
5.7 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.....	66
5.8 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.....	67
5.9 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida em camundongos.....	68

5.10 Avaliação da depleção de fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do GL em camundongos.....	69
5.11 Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do GL em camundongos.....	70
5.12 Avaliação da participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis no efeito antinociceptivo do GL em camundongos.....	71
5.13 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	72
5.14 Efeito do GL sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE) e substância P (SP) em camundongos.....	72
5.15 Efeito do GL sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias em camundongos.....	73
5.16 Avaliação da participação da proteína quinase C (PKC) no efeito antinociceptivo do GL em camundongos.....	74
5.17 Ensaios de western blot.....	75
5.18 Efeito do GL sobre os astrócitos ativados na medula espinhal de camundongos.....	76
5.19 Efeito do GL sobre a neuropatia periférica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	78
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

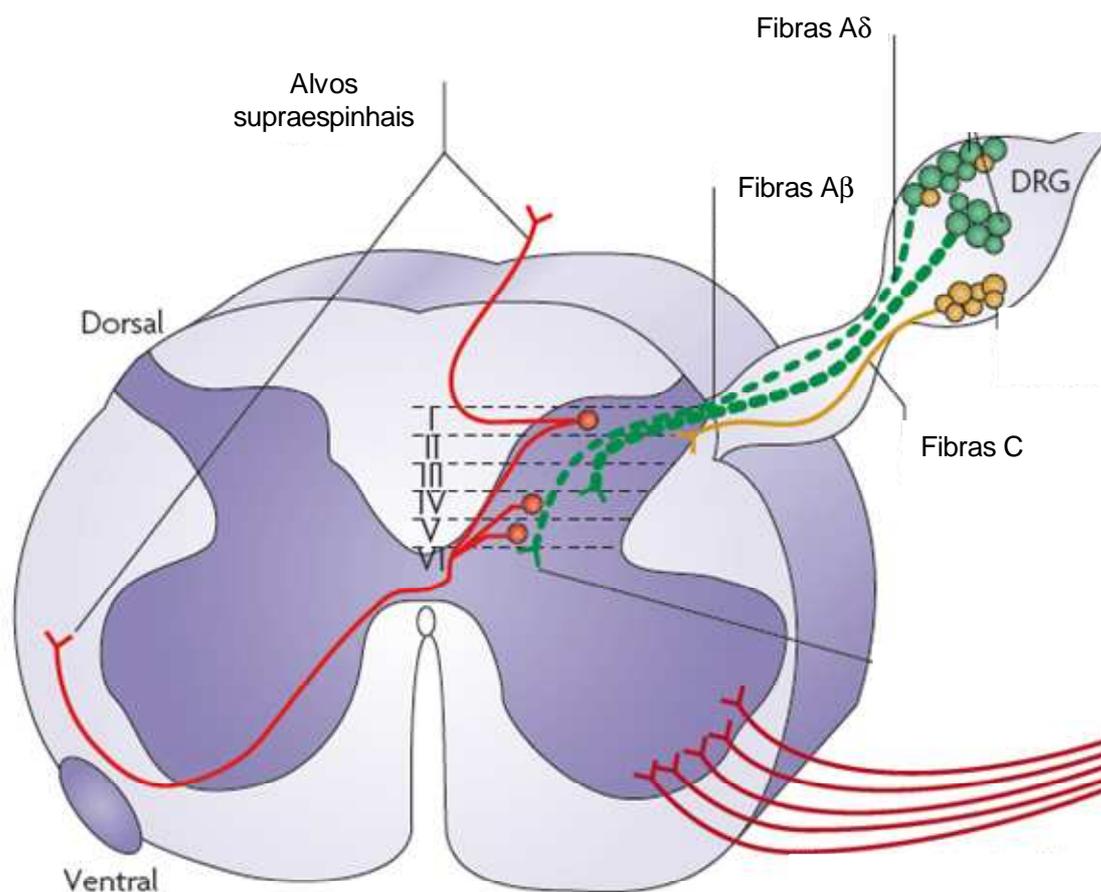
1.1 Dor

A sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo que indica a presença de um estímulo lesivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF, SALTER, 2000; JULIUS, BASBAUM, 2001). Dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Entretanto, sob condições patológicas, este sistema se torna sensibilizado e a dor transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005).

Em 1994, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês International Association for the Study of Pain) definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. Desta forma, a dor possui uma conotação individual e sofre influência de experiências prévias (MERSKEY, BOGDUK, 1994). Precisamente, a dor é um resultado subjetivo da nocicepção, a qual é definida como processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (SCHAIBLE, RICHTER, 2004; LOESER, TREEDE, 2008).

Descrevendo melhor, a nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009). Os nociceptores são extremamente heterogêneos, diferindo quanto aos tipos de

neurotransmissores que contêm, os receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (STUCKY, GOLD, ZHANG, 2001). Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira inclui fibras C não-mielinizadas de pequeno diâmetro e a segunda classe engloba fibras mielinizadas (A δ) de diâmetro médio. Essas fibras aferentes mielinizadas diferem consideravelmente das fibras A β de grande diâmetro de condução rápida que responde à estimulação mecânica inócua (BASBAUM et al., 2009). A velocidade de transmissão do estímulo nocivo pelas fibras C não-mielinizadas é lenta e pelas fibras A δ a velocidade de condução é mais rápida (JULIUS, BASBAUM, 2001; WOOLF, MA, 2007) (Fig. 1). Existem duas principais subclasses de nociceptores A δ ; ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser diferenciadas pela sua responsividade diferenciada ao calor intenso (tipo I são ativadas a ~ 53 °C; e tipo II ativadas a ~ 43 °C) (JULIUS, BASBAUM, 2001). As fibras C também são heterogêneas. Uma população de fibras C, chamada de peptidérgica, contém uma variedade de neuropeptídeos, incluindo substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e expressa receptores de neurotrofina tirosina quinase A (trkA), os quais respondem ao fator de crescimento do nervo (NGF). A população não-peptidérgica expressa o receptor de neurotrofina c-Ret que é alvo do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e expressa um grupo de carboidrato de superfície que se liga seletivamente a uma lectina de planta chamada isolectina B₄ (IB₄) (STUCKY, GOLD, ZHANG, 2001; BASBAUM et al., 2009).



Fonte: modificado de Milligan, Watkins (2009)

Figura 1: Via aferente primária e suas conexões no corno dorsal da medula espinhal. Fibras C não-mielinizadas e fibras A δ mielinizadas transmitem o impulso nociceptivo até o corno da medula espinhal. Ocorre então sinapse com os neurônios de segunda ordem que ascendem para o córtex.

A fibra nervosa aferente primária detecta estímulos ambientais (de natureza térmica, mecânica ou química) e transduz essa informação na linguagem do sistema nervoso, ou seja, corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Na última década, muitas moléculas de transdução da nocicepção têm sido identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos receptores de potencial transitório (TRP) (CHENG, JI, 2008; PATAPOUTIAN, TATE, WOOLF, 2009). Esses canais participam na geração de sensações

dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007). O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), originalmente chamado de receptor vanilóide 1 (VR1) e comumente referido como receptor da capsaicina, foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos; compostos vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo (≥ 43 °C) e pH baixo ($< 5,9$) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Desde então, tem sido reportado que o TRPV1 é ativado pela cânfora, alicina, óxido nítrico (NO), toxinas de aranha e mediadores lipídicos como endovanilóides (anandamida) e produtos da lipoxigenase (leucotrieno B₄, LTB₄); potencializado pelo etanol, nicotina e citocinas pró-inflamatórias e modulado por cátions extracelulares (ZYGMUNT et al., 1999; HWANG et al., 2000; TREVISANI et al., 2002; LIU et al., 2004; AHERN et al., 2005; MACPHERSON et al., 2005; XU, BLAIR, CLAPHAM, 2005; MACPHERSON et al., 2006; SIEMENS et al., 2006; YOSHIDA et al., 2006). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando diferentes mediadores inflamatórios como bradicinina (BK), glutamato, prostaglandinas E₂ (PGE₂) ou fator de crescimento do nervo (NGF) são capazes de sensibilizar e estimular o TRPV1 indiretamente através da ativação da fosfolipase C (PLC), com conseqüente ativação da proteína kinase C (PKC) ou da fosfolipase A₂ (PLA₂), culminando com a ativação da proteína quinase A (PKA) (CHUANG et al., 2001; HU, BHAVE, GEREAU, 2002; FERREIRA, DA SILVA, CALIXTO, 2004).

Similar ao receptor para o calor, TRPV1, existem dois receptores que detectam o frio. O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), chamado anteriormente de ANKTM1, é um canal não-seletivo permeável ao cálcio (STORY et al., 2003) e ativado por temperaturas mais baixas que 17 °C (revisado por

CALIXTO et al., 2005; PATAPOUTIAN, TATE, WOOLF, 2009). Esses receptores também podem ser ativados por substâncias pungentes incluindo compostos presentes nos óleos de mostarda (isotiocianato de alila) e canela (cinamaldeído), alicina, Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), formalina e irritantes ambientais (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; MCNAMARA et al., 2007). Recentemente, foi demonstrada a sensibilização do TRPA1 pela bradicinina e parece envolver as vias da PLC e PKA, enquanto que a sensibilização do TRPA1 pelo receptor ativado por protease 2 (PAR2) ocorre pela via da PLC (DAI et al., 2007; WANG et al., 2008). E finalmente, outro receptor que detecta o frio é o receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8) (MCKEMY, NEUHAUSSER, JULIUS, 2002; PEIER et al., 2002). O TRPM8 é ativado por temperaturas frias moderadas (15 a 25 °C) e por compostos que evocam uma sensação de frescor, como mentol, icilina, eucaliptol e eugenol (REID, FLONTA, 2001; BANDELL et al., 2004; BEHRENDT et al., 2004; CHUANG, NEUHAUSSER, JULIUS, 2004). Estudos prévios demonstraram que a atividade do TRPM8 é diminuída pela ativação da PKC e inibida pelo etanol (PREMKUMAR et al., 2005; BENEDIKT et al., 2007).

Outra família que participa da transdução da nocicepção é a dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), que são canais de cátions insensíveis à voltagem (PETROFF et al., 2008). Os ASICs são ativados por prótons extracelulares e modulados pela PKC (KRISHTAL, PIDOPLICHKO, 1980; BARON et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como NGF, serotonina, interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (VOILLEY et al., 2001; MAMET et al., 2002).

A estimulação dos nociceptores gera potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, ascendendo para o córtex (Fig. 1) (CHENG, JI, 2008). Assim como todos os neurônios sensoriais primários do sistema somatosensorial, os nociceptores possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal e um axônio que se bifurca em um ramo periférico (para inervar o tecido alvo periférico) e um ramo central (o qual entra no SNC para fazer sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem) (WOOLF, MA, 2007). As fibras nervosas aferentes primárias projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, o qual é organizado em lâminas anatomicamente e eletrofisiologicamente distintas. Por exemplo, nociceptores A δ projetam-se para as lâminas I e V, enquanto que as fibras C projetam-se para lâminas mais superficiais I e II (BASBAUM et al., 2009).

Os neurônios sensoriais primários utilizam o aminoácido L-glutamato como seu principal neurotransmissor excitatório e quando liberado na sinapse atua em receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA) pós-sinápticos e em receptores glutamatérgicos acoplados a proteína G (metabotrópicos) (ZEILHOFER, 2005). Nessa sinapse, além do glutamato, ocorre a liberação de outros moduladores sinápticos como SP, neurocinina A e CGRP (SCHAIBLE, RICHTER, 2004).

Os axônios dos neurônios de segunda ordem constituem os feixes aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos a estruturas do tronco cerebral e diencefalo incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo,

entre outros (ALMEIDA, ROIZENBLATT, TUFIK, 2004). A informação nociceptiva é transmitida por vários tratos, entre eles o espinotalâmico e espinoreticulotalâmico que levam essas mensagens para o tálamo e tronco cerebral, respectivamente (BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores não sinalizam somente a dor aguda, mas também contribuem em condições dolorosas persistentes de cunho patológico. Embora a dor aguda possua um papel protetor como um sistema de alerta, a dor crônica como a dor neuropática, é produzida pela disfunção ou lesão do sistema nervoso periférico ou central e pode persistir por dias, meses ou anos após a lesão nervosa (ZIMMERMANN, 2001; SOMERS, CLEMENTE, 2009). A dor neuropática é caracterizada por sintomas de hipersensibilidade dolorosa, representados pela alodínia mecânica (respostas dolorosas a estímulos táteis normalmente inócuos) e hiperalgesia mecânica e térmica (responsividade aumentada a estímulos previamente nocivos) (JI, STRICHARTZ, 2004). Isto é resultado de duas diferentes condições: aumento da responsividade dos neurônios da medula espinhal (sensibilização central) ou diminuição do limiar de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica) (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Atualmente, é incorreto considerar somente a atividade neuronal na indução e manutenção de dores crônicas e neuropáticas. Desta forma, a ativação glial na medula espinhal parece ser um mecanismo envolvido em neuropatias de diferentes etiologias (MILLIGAN, WATKINS, 2009). Tem sido demonstrado recentemente que astrócitos e microglias desempenham importantes papéis na transmissão da dor, podendo modular a função sináptica e a excitabilidade neural por diferentes mecanismos (HALASSA, FELLIN, HAYDON, 2007; POCOCK,

KETTENMANN, 2007), e ambas as células gliais são responsáveis pela resposta imune inata no SNC (NGUYEN, JULIEN, RIVEST, 2002). As células gliais excedem os neurônios em número e compreendem os astrócitos, microglias residentes, microglia perivascular e oligodentrócitos, os quais possuem distintas funções no controle do processamento da dor (EMERY et al., 2006).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC. Seu contato próximo com os neurônios permite a ativação astrocitária por diversos neurotransmissores, além disso, os astrócitos expressam vários receptores de membrana funcionais (PORTER, MCCARTHY, 1997). Dentre estes, pode-se destacar os receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não-NMDA, bem como receptores purinérgicos e receptores da substância P. Na ativação astrocitária, o sinal extracelular promove a ativação das vias de sinalização intracelular ERK/MAPK-1 (proteína quinase ativada por mitógeno 1) e JNK/MAPK-8 (c-Jun-N-terminal quinase). Este processo leva a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α , PGE₂ e NO (MILLIGAN, WATKINS, 2009). Os padrões temporais da ativação enzimática e da liberação de citocinas pró-inflamatórias são diferentes para astrócitos e microglias (ZHUANG et al., 2005). Durante condições de neuropatia crônica, os astrócitos permanecem ativados em resposta aos mediadores pró-inflamatórios derivados das microglias ativadas inicialmente (JI, SUTER, 2007).

As microglias residentes, reconhecidas classicamente como “macrófagos” do SNC são células hematopoiéticas que invadem o SNC durante o período embrionário e não são mais re-substituídas. Por outro lado, as microglias perivascularares são substituídas continuamente durante a vida adulta por

precursores hematopoiéticos (HICKEY, KIMURA, 1988), sendo que sua produção aumenta durante processo inflamatório no SNC ou lesão de nervo periférico. No entanto, o exato papel de cada sub-população de microglia no SNC saudável ou com determinada patologia permanece desconhecido (MILLIGAN, WATKINS, 2009). Sabe-se que as microglias perivasculares alteram a barreira hematoencefálica promovendo efeito anti-inflamatório em resposta a condições inflamatórias. Já as microglias residentes são reconhecidas por exercer ações tanto inflamatórias quanto anti-inflamatórias (ROMERO-SANDOVAL, HORVATH, DELEO, 2008). Geralmente as microglias atuam como a primeira linha de defesa contra invasão de algum patógeno, reconhecendo, seqüestrando e processando antígenos. Entretanto, as microglias (tanto perivascular como as residentes) expressam diversos neurotransmissores que também são encontrados em astrócitos e neurônios (POCOCK, KETTENMANN, 2007).

Assim, a ativação de células microgliais produz subsequente liberação de diversas substâncias e ativação de astrócitos e neurônios vizinhos (sinais neuroexcitatórios que levam ativação neuronal) (MILLIGAN, WATKINS, 2009). Durante condições neuropáticas, a ativação de células gliais promove a liberação dos mesmos sinais neuroexcitatórios que são liberados em condições imunológicas. De fato, os eventos fisiológicos que envolvem o início e a manutenção da dor neuropática em modelos animais envolvem sinais neuroexcitatórios que incluem o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (WATKINS, MILLIGAN, MAIER, 2001; MARCHAND, PERRETTI, MCMAHON, 2005). Além disso, todos os sinais neuroexcitatórios ou neuromodulatórios que as células gliais liberam (como SP, aminoácidos excitatórios, NO e ATP) ou aqueles nos quais as células gliais expressam receptores, desempenham papel fundamental em estados de dor

neuropática (MCMAHON, CAFFERTY, MARCHAND, 2005). A excitabilidade dos neurônios responsivos a dor aumenta rapidamente em resposta a exposição a estes produtos gliais, os quais apresentam efeitos diretos em neurônios (BESSON, 1999). Como discutido anteriormente, um dos eventos que ocorrem seguindo a lesão em nervo periférico é o aumento do Ca^{2+} intracelular, levando a subsequente ativação das vias de p38, MAPK e ERK na microglia. A ativação destas vias promove a ativação de vários fatores de transcrição, como o NF- κ B e secreção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE2, e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Uma possibilidade pela qual as citocinas pró-inflamatórias liberadas contribuem para a dor é por atuar em seus receptores que são expressos em neurônios em regiões responsivas a dor na medula espinhal. Por exemplo, TNF- α e IL-1 β liberados por astrócitos aumentam a excitabilidade neuronal e a força sináptica por aumentar a condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, bem como, por aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN, MALENKA, 2006). Além disso, a IL-1 β aumenta o influxo de íons Ca^{2+} através dos receptores NMDA em neurônios da medula espinhal (VIVIANI et al., 2003).

1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta imune complexa integrada ao dano tecidual/celular causada por estímulos físico, químico, imunológico ou microbiano (HUME, FAIRLIE, 2005). É uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar o

organismo tanto da causa inicial da agressão celular quanto das conseqüências desta agressão (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996).

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por cinco sinais clássicos: o calor, o rubor, o edema, a dor, e conseqüentemente perda da função do membro afetado. As mudanças fisiológicas que acompanham a inflamação aguda local incluem algumas características principais e envolve uma seqüência de eventos, como a vasodilatação, aumento do fluxo sangüíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (HUERRE, GOUNON, 1996; VIVIER, MALISSEN, 2005). A dor aparece devido aos efeitos diretos de mediadores resultantes tanto do dano inicial quanto da resposta inflamatória em si, como pela compressão dos nervos sensoriais ocasionada pelo edema local. As características fisiológicas do processo inflamatório são iniciadas e reguladas pelos mediadores inflamatórios solúveis. São eles: a histamina e serotonina (de mastócitos), proteases plasmáticas (sistema complemento, cininas e proteínas fibrinolíticas e de coagulação), mediadores lipídicos [PGs, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF)], citocinas (de linfócitos ativados e macrófagos), NO, entre outros (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; ROSENBERG, GALLIN, 1999; ROBERTS II, MORROW, 2003) (Fig. 2).

A vasodilatação, responsável pelo calor e rubor, é um fenômeno clássico associado à inflamação que facilita a disponibilidade de mediadores e células inflamatórias para o local lesado. Os principais mediadores envolvidos nesse processo são o NO e PGs vasodilatadoras. Outro sinal da inflamação é o edema,

que ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular, acarretando em extravasamento plasmático (fluido rico em proteínas) para a local. Esse evento é resultado da liberação de histamina, BK, leucotrienos, fatores do complemento, SP e PAF (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

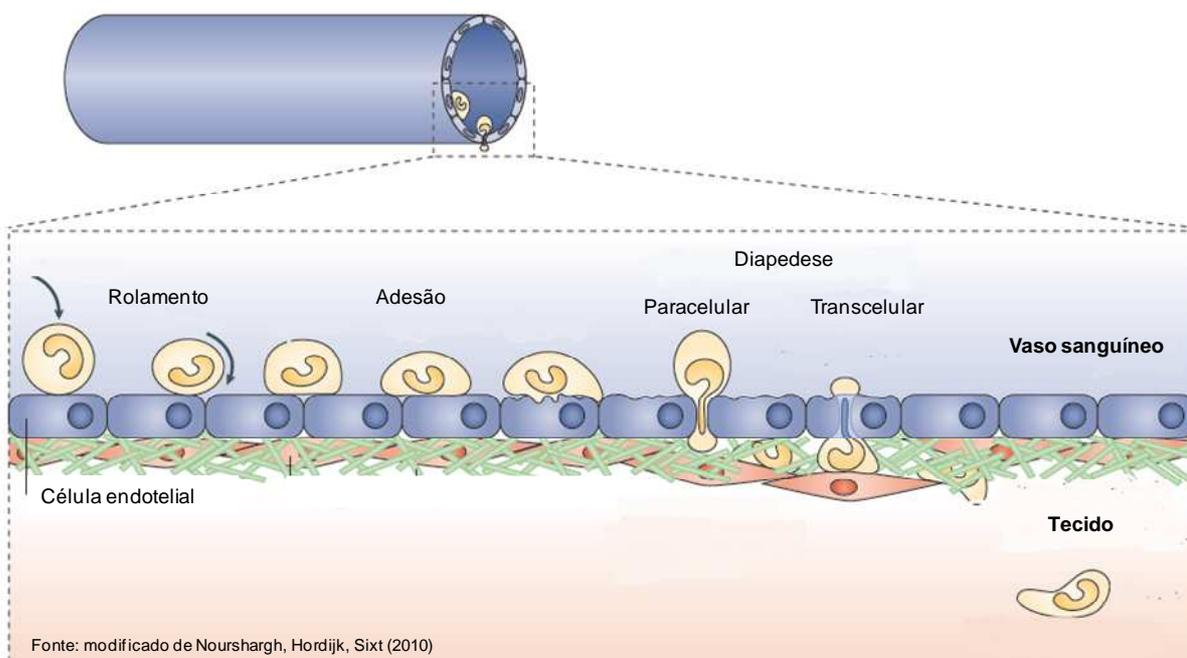


Figura 2: Migração de neutrófilos. Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sangüínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os neutrófilos fagocitam e destroem as bactérias.

Um importante fenômeno atribuído à vasodilatação e ao extravasamento plasmático é o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório. O endotélio ativado dos vasos sanguíneos permite o extravasamento seletivo de neutrófilos através da ligação de selectinas das células endoteliais com integrinas e receptores de quimiocinas dos leucócitos (MEDZHITOV, 2008). A transmigração dos neutrófilos ocorre através da marginação (movimentação do neutrófilo do

centro para a periferia do vaso), rolamento (desaceleração do neutrófilo através da ligação com moléculas de adesão chamadas selectinas), adesão e diapedese (o neutrófilo atravessa o endotélio através de junções entre as células) (MARSHALL et al., 2003).

Os leucócitos necessitam de moléculas quimioatraentes para migrar para o sítio inflamatório. Entre essas moléculas encontram-se: bioprodutos de bactérias, componentes do sistema complemento, quimiocinas, leucotrieno B₄ (LTB₄) e fator de ativação plaquetária (PAF) (SIMON, GREEN, 2005). Quando os neutrófilos atingem o foco inflamatório, tornam-se ativados e tentam eliminar o patógeno liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), proteinases, catepsinas, elastases, mieloperoxidase, entre outros (MEDZHITOV, 2008).

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de resolução e reparo, a qual é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Se a inflamação aguda falha em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e no caso de infecção por linfócitos T. Se o efeito combinado dessas células ainda continua insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas (MEDZHITOV, 2008).

1.3 *Pleurotus pulmonarius*

O reino dos fungos é um grupo bastante heterogêneo e seus representantes são conhecidos popularmente como bolores, mofos, cogumelos alucinógenos e comestíveis (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004). O número de cogumelos na Terra é estimado em 140.000, mas somente 10% dos cogumelos são conhecidos (WASSER, 2002). Os cogumelos têm sido utilizados como alimento ou como materiais flavorizantes de alimentos devido ao seu sabor sutil e único (CHIANG, YEN, MAU, 2006). Os fungos comestíveis são conhecidos por serem utilizados a milhares de anos atrás por civilizações antigas pelos seus poderes de cicatrização bem como por aumentar a longevidade (ROP, MLCEK, JURIKOVA, 2009). Eles são ricos em fibras, minerais, proteínas, carboidratos, vitaminas e pobres em gordura (MANZI, AGUZZI, PIZZOFERRATO, 2001), e recentemente tornaram-se atrativos como fonte para o desenvolvimento de fármacos (MANZI, PIZZOFERRATO, 2000).

Uma grande variedade de compostos bioativos, isolados de várias espécies de cogumelos, tem sido identificados (WASSER, 2002). Muitos desses compostos são terpenóides, esteróis, ácidos graxos, proteínas, lectinas, proteoglicanas e especialmente, polissacarídeos (LIU et al., 2007; MORADALI et al., 2007). Muitos componentes de cogumelos podem reduzir a colesterolemia, modular o sistema imune e inibir o crescimento de tumores (SMITH, ROWAN, SULLIVAN, 2002; WASSER, 2002). Extratos de muitos cogumelos, incluindo *Lentinus edodes*, *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum* e *Grifola frondosa* suprimem o crescimento tumoral por modular o sistema imune (SCHEPETKIN, QUINN, 2006).

O *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. da família Lentinaceae (Fig. 3) é um fungo comestível saboroso, distribuído desde a China até a Índia (ZHUANG et al., 1993) e tem sido cultivado no Japão recentemente (YATSUZUKA et al., 2007). Estudos fitoquímicos deste cogumelo têm relatado a presença de proteínas, várias vitaminas (especialmente a vitamina D) e polissacarídeos (YATSUZUKA et al., 2007).



Figura 3: Imagens do cogumelo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.

Algumas atividades biológicas têm sido descritas para o extrato de *P. pulmonarius* e seus polissacarídeos como a atividade anticarcinogênica contra carcinoma hepatocelular em camundongos (WASONGA et al., 2008) e efeito antiproliferativo sobre células cancerosas de cólon e diminuição da aderência das

células tumorais (LAVI et al., 2010b). Além disso, *P. pulmonarius* foi efetivo em aliviar os sintomas da rinite alérgica através da inibição da liberação de histamina (YATSUZUKA et al., 2007) e seu extrato atenuou o desenvolvimento da inflamação colônica em camundongos com colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) (LAVI et al., 2010a). Outra atividade biológica observada com o extrato do *P. pulmonarius* foi a redução da hiperglicemia induzida pela aloxana em camundongos (BADOLE et al., 2008). Recentemente, nosso grupo demonstrou que uma manogalactana isolada desse cogumelo inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, revelando seu potencial antinociceptivo (SMIDERLE et al., 2008b).

1.3.1 β -Glucanas

As β -glucanas são polissacarídeos que ocorrem naturalmente. Estes polímeros de glicose são produzidos por uma variedade de plantas como a aveia, cevada e algas marinhas. Elas também são constituintes da parede celular de certas bactérias patogênicas (*Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*) e fungos (*Saccharomyces cerevisiae*) (AKRAMIENE et al., 2007).

Nos fungos, as β -glucanas ocorrem como polímeros de glicose ligados por ligações β -1 \rightarrow 3 com cadeias laterais ligadas por ligações β -1 \rightarrow 6 (TSONI, BROWN, 2008). As glucanas diferem na estrutura de suas cadeias laterais, as quais são específicas para espécies individuais de fungos e podem apresentar-se tanto na forma solúvel quanto insolúvel em água (ROP, MLCEK, JURIKOVA, 2009). Essas diferenças estruturais como, por exemplo, diferenças no

comprimento da cadeia polissacarídica, extensão da ramificação e o comprimento dessas ramificações, podem ter grandes implicações para a atividade da β -glucana (AKRAMIENE et al., 2007). A estrutura básica das β -glucanas está demonstrada na Fig. 4.

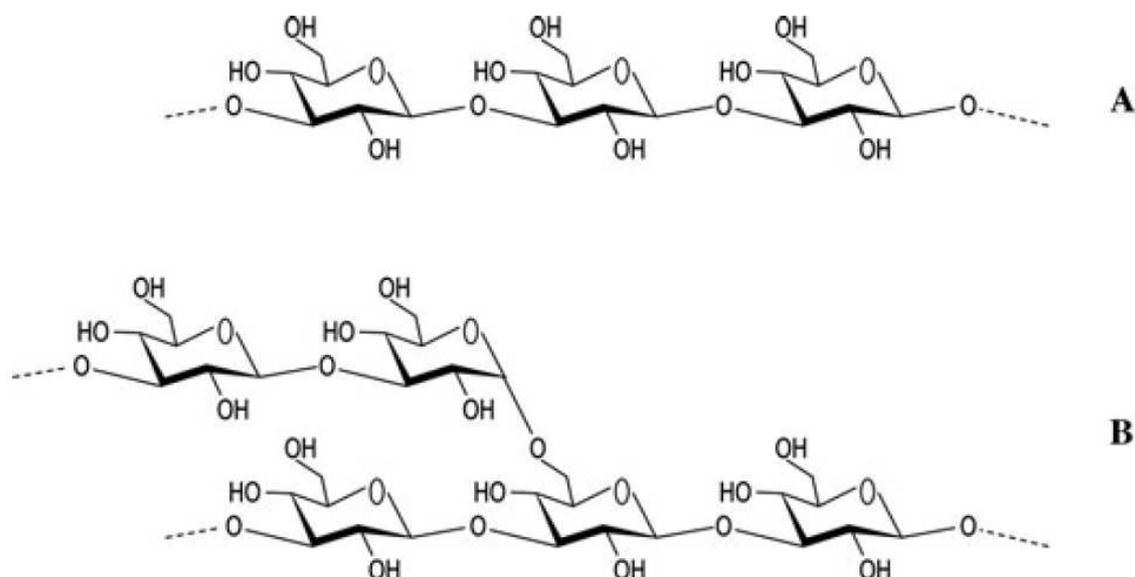


Figura 4: Representação esquemática da estrutura básica das β -glucanas linear (A) e ramificada (B).

As β -glucanas têm sido descritas como ativadoras do sistema imune, estimulando a atividade antitumoral e antimicrobiana; e modificadoras da resposta celular (BROWN, GORDON, 2001; AKRAMIENE et al., 2007; CHEN, SEVIOUR, 2007). A β -glucana também mostrou atividade anticarcinogênica, prevenindo a oncogênese e a metástase (AKRAMIENE et al., 2007; CHEN, SEVIOUR, 2007). Apesar das β -glucanas geralmente serem consideradas seguras, existe alguns efeitos negativos associados com estes carboidratos. O uso intravenoso de β -glucanas pode induzir a formação de granulomas e se administrado em

combinação com agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, as β -glucanas solúveis podem induzir efeitos colaterais letais, incluindo aumento da lesão gastrointestinal e peritonite. As β -glucanas também têm sido implicadas no desencadeamento de doenças auto-imunes como artrite e poderia estar envolvida no desenvolvimento de desordens respiratórias, incluindo alergia e asma (TSONI, BROWN, 2008).

A indução das respostas celulares pelos cogumelos e outras β -glucanas envolve sua interação específica com um ou mais receptores de superfície (AKRAMIENE et al., 2007). Provavelmente, as β -glucanas de fungos atuam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e são reconhecidas por receptores de superfície celular apropriados como os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (CHEN, SEVIOUR, 2007). Estes receptores são conhecidos como receptores seqüestradores, receptor do complemento 3 (CR3), dectina-1, lactosilceramida (LacCer) e receptor do tipo toll (TLR) (AKRAMIENE et al., 2007; CHEN, SEVIOUR, 2007; TSONI, BROWN, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

O manejo da dor é um aspecto essencial da medicina moderna e para a qualidade de vida, no entanto as terapias atuais são freqüentemente insuficientes devido a severos efeitos indesejados ou eficácia limitada. Por essa razão que a descoberta de novas terapias para o tratamento da dor é necessária, especialmente para tratar a proporção de pacientes que não respondem aos analgésicos disponíveis (BOURINET et al., 2005).

Devido às atividades promissoras demonstradas pelas β -glucanas e resultados preliminares positivos obtidos com outros polissacarídeos isolados de cogumelos (CARBONERO et al., 2008; SMIDERLE et al., 2008b), resolveu-se estudar a atividade antinociceptiva da (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) β -glucana isolada do cogumelo *P. pulmonarius*, bem como os mecanismos de ação responsáveis por seus efeitos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1→3),(1→6) β-glucana (GL) isolada do *Pleurotus pulmonarius* e seus possíveis mecanismos de ação.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito antinociceptivo do GL em modelos de nocicepção química e térmica em camundongos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do GL no modelo de peritonite induzida pela carragenina;
- Investigar se no efeito antinociceptivo do GL há a participação de receptores de potencial transitório (TRP) e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC);
- Avaliar se na ação antinociceptiva do GL existe a participação das fibras C sensíveis à capsaicina;
- Verificar se na atividade antinociceptiva do GL há o envolvimento do sistema opióide;
- Investigar se na ação antinociceptiva do GL existe a participação da proteína G_{i/o} sensível à toxina pertussis;

- Avaliar se no efeito antinociceptivo do GL existe o envolvimento do sistema glutamatérgico;
- Investigar se no efeito antinociceptivo do GL há a participação de citocinas pró-inflamatórias;
- Analisar se no efeito antinociceptivo do GL há o envolvimento da proteína quinase C (PKC);
- Verificar se na antinocicepção provocada pelo GL existe a participação dos astrócitos da medula espinhal;
- Avaliar o possível efeito do GL sobre a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Polissacarídeo

A (1→3),(1→6) β-glucana (GL) foi isolada do cogumelo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., purificada e caracterizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcello Iacomini do Departamento de Bioquímica da UFPR, como descrito anteriormente por SMIDERLE (2008a) (Fig. 5).

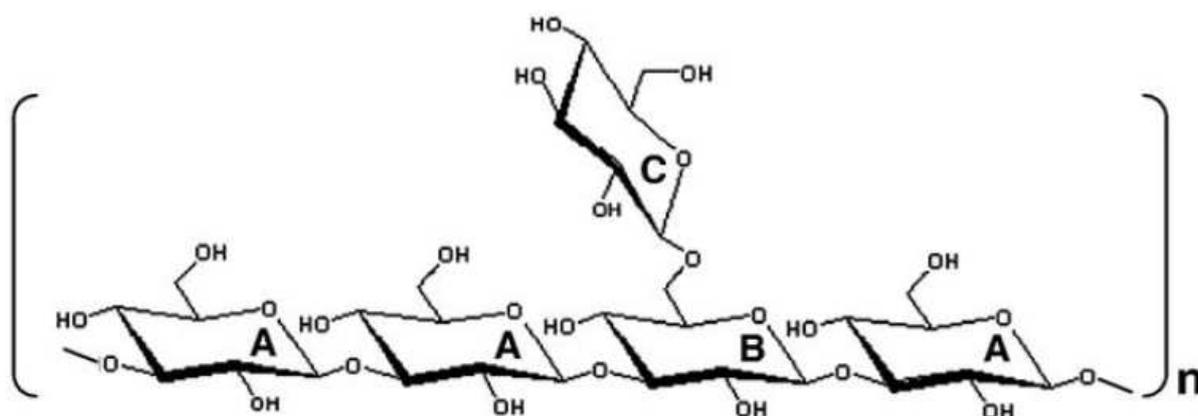


Figura 5: Estrutura química do GL.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos (25 a 35 g) de ambos os sexos, mantidos em temperatura controlada (23 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização

dos experimentos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UFSC, sob o número 303.

4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

4.3.1 Contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos

A injeção intraperitoneal de ácido acético é descrita como um modelo para avaliar a dor visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade, podendo ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Os animais foram pré-tratados com uma solução de azul de Evans pela via intravenosa (25 mg/kg), utilizada como marcador do extravasamento plasmático. Uma hora depois, os animais foram tratados pela via oral (*v.o.*) ou intraperitoneal (*i.p.*) com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (1-30 mg/kg, *v.o.* ou 0,3-3 mg/kg, *i.p.*) e individualmente ambientados em funis de vidro transparentes. Após 60 e 30 min dos tratamentos, respectivamente, administrouse 0,45 ml de ácido acético 0,6% e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente, durante 20 min, (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1999b; LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

Imediatamente após a contagem das contorções abdominais, os animais foram mortos e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de uma solução de salina estéril e heparina (25 UI/ml) seguida da coleta desse volume. A contagem

de leucócitos totais foi feita utilizando-se uma câmara de Neubauer sob microscópio após a diluição da amostra do fluido peritoneal em solução de Turk (1:20). Outra amostra do fluido coletado (700 µl) foi centrifugada a 1000 rpm por 10 min e a absorvância do sobrenadante foi lida a 690 nm em leitor de ELISA. O extravasamento plasmático induzido pelo ácido acético foi determinado por interpolação na curva padrão de azul de Evans e expresso em µg/ml (LUCENA et al., 2007).

4.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

Este modelo é mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios) (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992). Os animais foram pré-tratados com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (3-30 mg/kg) pela via intraperitoneal e após 30 min foi intraplantarmente injetado um volume de 20 µl de solução de formalina 2,5% na superfície ventral da pata direita do animal. A resposta nociceptiva (lambida e/ou mordida da pata) foi observada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina.

4.3.3 Nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo)

Os animais foram submetidos aos testes de placa quente e retirada da cauda para avaliar o possível efeito antinociceptivo do GL sobre as respostas nociceptivas induzidas pelo calor nocivo.

4.3.3.1 Placa quente

O teste de placa quente foi realizado como descrito por Woolfe e MacDonald (1944) com algumas modificações, utilizando um aparato que compreende uma superfície metálica a 50 ± 1 °C, circundada por um cilindro transparente (24 cm de diâmetro, Ugo Basile, modelo DS37). Cada animal foi colocado individualmente dentro do cilindro e o tempo que o animal levou para sacudir ou lambe a pata ou pular foi cronometrado e marcado como índice de latência de resposta térmica.

Os animais foram pré-testados para se obter o valor de latência basal. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado para minimizar danos ao tecido. Após 30 min, os animais foram tratados com o veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, *s.c.*) ou GL (100 mg/kg, *i.p.*) e depois de 30 min foi realizado o teste. O tempo de permanência dos animais foi convertido em percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: porcentagem máxima de efeito (PME%) = $\frac{TF - TB}{30 - TB} \times 100$.

4.3.3.2 Retirada da cauda

O teste de retirada da cauda (tail-flick) foi realizado de acordo com o método descrito por D'AMOUR, SMITH (1941), com algumas modificações, no qual o animal foi colocado dentro de um tubo plástico contensor perfurado e a sua cauda exposta a um estímulo quente radiante (90 W). O tempo para o animal retirar a cauda (período de latência) foi medida automaticamente pelo analgesímetro.

Os animais foram pré-selecionados, sendo que os que permaneceram no aparato, por mais de 8 segundos, foram eliminados do teste. Os animais foram tratados com o veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, *s.c.*) ou GL (100 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da realização do teste. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado para evitar danos teciduais. O tempo de permanência dos animais foi convertido em percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: porcentagem máxima de efeito (PME%) = $\frac{TF(\text{tempo final}) - TB(\text{tempo basal})}{30 - TB(\text{tempo basal})} \times 100$.

4.3.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea

Para excluir a possibilidade de prejuízo no desempenho motor dos animais após o tratamento com o composto, foi avaliada a atividade locomotora espontânea no campo aberto. A atividade locomotora foi avaliada em um campo aberto, que consiste de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm e o fundo desta arena é dividido em 12 quadrados idênticos (MEOTTI et al., 2006).

Os camundongos foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*) ou GL (30 e 100 mg/kg, *i.p.*) 30 min antes de serem colocados individualmente na arena e observados por um período de 6 min. O número de quadrados cruzados com todas as patas foi contado.

4.3.5 Peritonite induzida por carragenina

A carragenina foi utilizada como estímulo para produzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal em camundongos após 4 h, com um grande número de leucócitos no exsudato. Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g), dexametasona (anti-inflamatório esteroide, glicocorticóide, 0,5 mg/kg) ou GL (0,1-10 mg/kg) 30 min antes da injeção de carragenina (750 µg/cavidade) na cavidade peritoneal. O grupo salina recebeu somente uma injeção de salina (0,1 ml/10 g) no peritônio. Quatro horas após a indução da peritonite, os animais foram mortos por inalação de CO₂ e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de solução salina heparinizada (20 UI/ml). A seguir, o líquido peritoneal foi coletado e processado para posterior análise (PAGANO et al., 2002).

4.3.5.1 Contagem dos leucócitos peritoneais

A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer após a diluição do fluido peritoneal com líquido de Türk (1:20). Uma alíquota do exsudato foi citocentrifugado utilizando uma citocentrífuga Cytospin

(Tharmac, Germany) e corado com May-Grünwald Giemsa para a contagem diferencial dos leucócitos (MONTANHER et al., 2007).

4.3.5.2 Determinação dos níveis de citocinas

Quatro horas após a peritonite induzida pela carragenina, o fluido peritoneal foi utilizado para determinar os níveis de citocinas pelo método de ELISA (MIZGERD, SPIEKER, DOERSCHUK, 2001). Alíquotas de 100 μ l de amostra foram usadas para quantificar os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 através dos kits de ELISA para citocinas R&D Systems (Minneapolis, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas a 450 nm e 550 nm.

4.3.6 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo

4.3.6.1 Participação de receptores de potencial transitório (TRP) e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC)

4.3.6.1.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

Para investigar se na atividade antinociceptiva do GL existe a participação dos receptores TRPV1, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de capsaicina (agonista de receptor TRPV1). Os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), GL (3-30 mg/kg, *i.p.*) ou vermelho

de rutênio (antagonista TRP não seletivo, VR, 3 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de capsaicina (5,2 nmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como índice de nocicepção (SANTOS, CALIXTO, 1997). Em outro grupo de experimento, o GL (30 µg/pata, *i.pl.*) foi co-administrado com capsaicina (5,2 nmol/pata) na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi determinada como mencionado acima.

4.3.6.1.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos

Com o objetivo de avaliar se na antinocicepção promovida pelo GL há o envolvimento dos receptores TRPA1, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1). Os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), GL (3-30 mg/kg, *i.p.*) ou cânfora (antagonista TRPA1, CAN, 7,6 mg/kg, *s.c.*), 30 min antes da injeção intraplantar 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 nocicepção (ANDRADE et al., 2008). Em outro grupo de experimento, o GL (30 µg/pata, *i.pl.*) foi co-administrado com cinamaldeído (10 nmol/pata) na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi determinada como mencionado acima.

4.3.6.1.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos

Para avaliar se no efeito antinociceptivo do GL existe o envolvimento dos receptores TRPM8, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de mentol (agonista de receptor TRPM8). Os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*) ou GL (0.1-10 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da injeção intraplantar 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 índice de nocicepção. Em outro grupo de experimento, o GL (30 µg/pata, *i.pl.*) foi co-administrado com mentol (1,2 µmol/pata) na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi determinada como mencionado acima.

4.3.6.1.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida em camundongos

Para avaliar se no efeito antinociceptivo do GL há a participação dos receptores ASIC, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de salina ácida (ativador de receptor TRPV1 e ASIC). Os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), GL (0.1-10 mg/kg, *i.p.*) ou amilorida (bloqueador de canais de Na⁺ epiteliais, AML, 100 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de salina ácida (ácido acético 2%, pH 1,98/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com salina ácida foi cronometrado por um período

de 20 min e considerado como índice de nocicepção (MEOTTI, COELHO, SANTOS, *in press*). Em outro grupo de experimento, o GL (30 µg/pata, *i.pl.*) foi co-administrado com salina ácida (ácido acético 2%, pH 1,98/pata) na pata posterior direita e a resposta nociceptiva foi determinada como mencionado acima.

4.3.6.2 Participação das fibras sensíveis à capsaicina

Para avaliar se as fibras sensíveis à capsaicina constituem um alvo relevante para o efeito antinociceptivo do GL, camundongos com dois dias de vida foram tratados com capsaicina (50 mg/kg, *s.c.*) com o propósito de induzir a degeneração irreversível de neurônios aferentes não mielinizados, especialmente fibras C e algumas Aδ (HOLZER, 1991). Animais controle receberam o veículo (etanol 10% em salina 0,9%). A eficiência do tratamento dos camundongos com capsaicina neonatal foi confirmada, após 6 semanas, pela aplicação tópica de 10 µl de capsaicina (10 µg/ml) no olho direito e foi observado o número de movimentos de limpeza do olho durante 1 min (IKEDA et al., 2001). Depois, os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*) ou GL (3 mg/kg, *i.p.*) 30 min antes da administração do ácido acético 0,6% como observado no modelo de contorções abdominais descrito anteriormente.

4.3.6.3 Participação do sistema opióide

Para determinar se mecanismos opióides contribuem para a antinocicepção induzida pelo GL, os camundongos foram pré-tratados com

naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, *i.p.*) ou veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*) e após 20 min os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, *s.c.*) ou GL (10 mg/kg, *i.p.*). Trinta minutos depois, os animais receberam uma injeção *i.pl.* de capsaicina (5,2 nmol/pata) e a resposta nociceptiva foi avaliada como descrito anteriormente.

4.3.6.4 Participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

A fim de verificar o envolvimento da proteína $G_{i/o}$ na antinocicepção induzida pelo GL, os animais foram pré-tratados com toxina pertussis intratecal, a qual ribosila e conseqüentemente inativa a subunidade catalítica da proteína $G_{i/o}$.

As injeções intratecais foram administradas nos camundongos totalmente acordados conforme o método previamente descrito (HYLDEN, WILCOX, 1980). Os animais foram imobilizados manualmente, e uma agulha conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa de 25 μ l foi inserida através da pele entre as vértebras no espaço subdural dos segmentos espinhais L5-L6. As injeções foram administradas por um período de 5 s. Os animais foram pré-tratados com toxina pertussis (1 μ g/sítio, *i.t.*) ou solução salina (5 μ l/site, *i.t.*), 7 dias antes da administração do veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*), morfina (2,5 mg/kg, *s.c.*) ou GL (3 mg/kg, *i.p.*). Após 30 min, os animais foram avaliados no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, conforme descrito anteriormente (SANTOS et al., 1999a).

4.3.6.5 Participação do sistema glutamatérgico e substância P

4.3.6.5.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

O principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos é o glutamato (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002). Por essa razão, investigou-se se na antinocicepção produzida pelo GL há o envolvimento do sistema glutamatérgico. Os animais foram tratados intraperitonealmente com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (1-10 mg/kg). Após 30 min, os animais receberam por via intraplantar 20 µl de solução de glutamato (20 µmol/pata preparada em solução salina com pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio) na pata posterior direita. A resposta nociceptiva (tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada) foi cronometrada por um período de 15 min (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002).

4.3.6.5.2 Nocicepção induzida pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios e da substância P em camundongos

Para determinar se a antinocicepção induzida pelo GL depende da estimulação do SNC, os aminoácidos excitatórios (AAE) e SP foram administrados intratecalmente. A resposta nociceptiva foi definida como o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen) e foi causada pela administração intratecal (5 µl) de NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do

subtipo NMDA, 74,3 ng/sítio), AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA, 25 ng/sítio), cainato (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo cainato, 23,5 ng/sítio), trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 1,9 µg/sítio) e SP (agonista preferencial de receptores NK1, 135 ng/sítio) (SCHEIDT et al., 2002). O tempo que o animal lambeu/mordeu a região posterior foi cronometrado dentro do tempo padronizado para cada agonista (NMDA: 5 min, AMPA: 1 min, cainato: 4 min, trans-ACPD: 15 min e SP: 6 min, após sua administração) e considerado como índice de nocicepção. Os animais receberam pela via *i.p.* veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (1 mg/kg) 30 min antes da injeção intratecal.

4.3.6.6 Participação das citocinas pró-inflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , também estão envolvidas na modulação de processos nociceptivos, e a capacidade das citocinas induzirem nocicepção quando administrados *i.t.* tem sido atribuída à indução de liberação de glutamato e SP dos terminais nervosos (TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Por esta razão, foi investigado o efeito do GL na resposta nociceptiva induzida pelo TNF- α e pela IL-1 β em camundongos.

O procedimento para a administração *i.t.* de TNF- α (0,1 pg/sítio) e IL-1 β (1 pg/sítio) foi semelhante ao descrito anteriormente e o tempo de resposta nociceptiva foi cronometrado dentro do tempo padronizado das citocinas: 15 min (CHOI et al., 2003; MEOTTI et al., 2007). Os animais foram tratados com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (1 mg/kg) 30 min antes da injeção intratecal.

4.3.6.7 Participação da proteína quinase C

4.3.6.7.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de miristato-acetato de forbol (PMA) em camundongos

Para avaliar a influência do GL sobre a nocicepção dependente de proteína quinase C (PKC), a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção *i.pl.* de PMA (500 pmol/pata), um ativador da PKC (FERREIRA et al., 2005). Os animais foram intraperitonealmente tratados com veículo (C: salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (10-100 mg/kg) e 30 min após, receberam 20 μ l de PMA (500 pmol/pata) na superfície ventral da pata direita. A resposta nociceptiva (tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrada por um período de 15 a 45 min.

4.3.6.7.2 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares

A fim de verificar se o GL promove atividade antinociceptiva através da inibição da ativação da PKC ϵ , a superfície ventral da pata foi coletada após 15 min da administração intraplantar de PMA (animais tratados com veículo ou GL e animais não manipulados: naive). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com processador de tecidos (Tissue tearor; Biospec Products, INC., OK, EUA) em tampão de lise A gelado [Tampão A: HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: MgCl₂ (1,5 mM), KCl (10 mM), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF, 0,5 mM), ditioneitol (DTT, 0,5 mM), NaF (50 mM), Na₃VO₄ (2 mM), inibidor de tripsina (1,5 μ g/ml), pepstatina A (7 μ g/ml), leupeptina (5 μ g/ml) e aprotinina (10 μ g/ml),

incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 14000 rpm por 60 min a 4 °C. O sobrenadante resultante coletado correspondeu ao extrato citosólico. Para obtenção das proteínas de membrana, o pellet foi re-suspenso em tampão de lise contendo de triton-X 100 1%, homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado como extrato rico em membrana. A concentração de proteínas das amostras foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit) segundo recomendações do fabricante. As frações celulares foram armazenadas em freezer a -70 °C até o momento do uso.

4.3.6.7.3 Ensaio de Western Blot

Aproximadamente 50 µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membranas de polivinilideno difluorido (PVDF). Para bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas “overnight” em solução de TBS-T, contendo leite desnatado (5%) a 4 °C, lavadas em tampão TBS-T e então incubadas overnight com os anticorpos primários anti-PKCε (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) ou β-tubulina (controle). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de

quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

4.3.6.8 Participação dos astrócitos da medula espinhal

Com o objetivo de avaliar se na atividade antinociceptiva do GL (30 mg/kg, *i.p.*) existe a participação dos astrócitos, a nocicepção foi induzida pela formalina como descrito anteriormente. Após a contagem da resposta nociceptiva, os animais foram sacrificados e as medulas rapidamente removidas, emblocadas em meio de congelamento (Tissue Teck®, Sakura Finetek, EUA, contendo 10,24% de álcool polivinílico; 4,26% de polietilenoglicol e 85,5% de ingredientes não reativos), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -70 °C até o momento do uso. Os blocos foram cortados em criostato (modelo CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha) resfriado a -20 °C. As secções de 12 µm de medula foram montadas em lâminas de vidro transparente, previamente gelatinizadas (0,1 g gelatina incolor; 0,01 g CrK(SO₄)₂ dissolvidos em 100 ml água mili-Q aquecida), as quais foram armazenadas a -20 °C até o momento do processamento para imunofluorescência. Primeiramente, os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica, incubados com PBS por 10 minutos a temperatura ambiente e então fixados com acetona P.A. por 20 minutos a 4 °C. Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente com glicina (0,1 M) por 10 minutos para bloquear grupamentos aldeídicos e incubadas por 1 hora em tampão de bloqueio (contendo 0,3% de Triton X-100 e 2% de BSA em PBS) para permeabilizar a membrana e bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo. Os cortes de medula foram incubados

overnight com anticorpo monoclonal anti-proteína fibrilar ácida glial (GFAP, 1:50, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) para marcação de astrócitos. Após a incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado ao fluoróforo Alexa Flúor 488 (1:100) no escuro, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram intensamente lavadas com PBS, e então lamínulas contendo uma gota de Fluormount-G[®] (EMS Science, EUA) diluído em PBS (2:1) foram colocadas sobre os cortes. O material pronto foi armazenado a 4 °C, observado no microscópio de fluorescência para análise da estrutura e do padrão de expressão do marcador acima descrito e as imagens obtidas foram analisadas com o programa Image Tool.

4.3.7 Neuropatia periférica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos

O modelo experimental de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático mimetiza sintomas importantes observados em pacientes com neuropatia periférica e é muito empregado na pesquisa comportamental (SELTZER, DUBNER, SHIR, 1990). Os animais foram intraperitonealmente anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Uma incisão lateral na perna direita foi realizada para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (SELTZER, DUBNER, SHIR, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG, BASBAUM, 1998). A ligadura de aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi realizada com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) que

também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond).

Os camundongos operados receberam veículo (salina, 0,1 ml/10 g) ou GL (30 mg/kg) pela via *i.p.* 7 dias após a cirurgia. O grupo falso operado (sofreu o procedimento cirúrgico sem a constrição) recebeu veículo (salina, 0,1 ml/10 g, *i.p.*). A alodínia mecânica foi avaliada imediatamente antes (0) e depois (0,5, 1, 2, 4 e 6 h) do tratamento para avaliar o efeito temporal do GL. Para investigar os efeitos do tratamento prolongado, o GL foi administrado 2 x ao dia (a cada 12 h) e a alodínia mecânica foi avaliada 0,5 h após o primeiro tratamento do dia. O tratamento repetido foi administrado do 7^o ao 14^o dia depois da ligadura, sendo interrompido por 3 dias. O tratamento foi re-iniciado para avaliar o desenvolvimento de uma possível tolerância ao GL.

A alodínia mecânica foi avaliada segundo BORTOLANZA et al. (2002), onde a frequência de retirada da pata a 10 aplicações dos filamentos de von Frey (0,4 g) sob a região plantar da pata que sofreu a constrição foi expressa como porcentagem. A frequência de retirada foi determinada antes e depois da constrição.

4.4 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto os valores de DI_{50} (doses do GL que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de

confiança em nível de 95%. Os valores de DI_{50} foram obtidos através do método de regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Para a análise de dois grupos independentes, a diferença estatística foi determinada através do teste t de Student. Os dados do tratamento prolongado com o GL (constricção parcial do nervo ciático) foram analisados utilizando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do GL sobre as contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos

A administração do GL (1-30 mg/kg, *p.o.*) inibiu de forma dose dependente as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% com DI_{50} de 15,6 (8,6-28,0) mg/kg e inibição de $55 \pm 5\%$ (Fig. 6A). O GL nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, reduziu a infiltração de leucócitos em 73, 85, 69 e 91%, respectivamente (Fig. 6C). No entanto, o GL não inibiu o extravasamento plasmático (Fig. 6E).

O tratamento *i.p.* dos animais com o GL (0,3-3 mg/kg) reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% com DI_{50} de 1,3 (0,6-2,6) mg/kg e inibição de $88 \pm 4\%$ (Fig. 6B). A migração de leucócitos e o extravasamento plasmático também foram inibidos com DI_{50} de 1,2 (0,7-1,9) mg/kg e inibição de 100% (Fig. 6D) e DI_{50} maior que 3 mg/kg e inibição de $45 \pm 7\%$ (Fig. 6F), respectivamente.

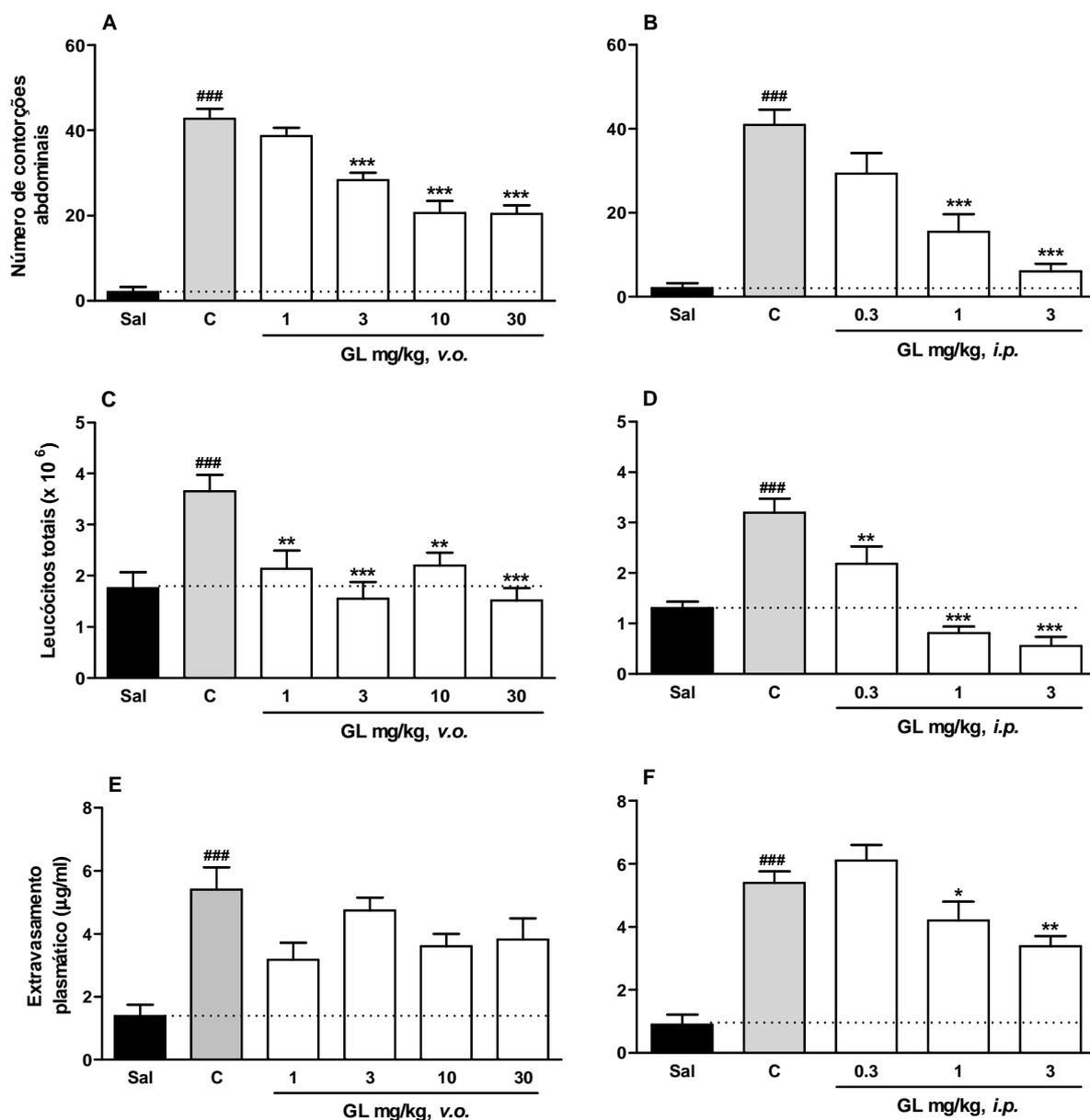


Figura 6: Efeito do GL sobre as contorções abdominais, infiltração de leucócitos e extravasamento plasmático induzidos por ácido acético 0,6% em camundongos. Painel A, C e E: tratamento com GL via oral (*v.o.*) e Painel B, D e F: tratamento com GL via intraperitoneal (*i.p.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo salina para ### $P < 0,001$. Diferente do grupo controle para * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.2 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

O GL administrado pela via *i.p.*, na dose de 30 mg/kg, inibiu tanto a primeira fase (neurogênica) quanto a segunda fase (inflamatória) da nocicepção induzida pela formalina com inibições de $43 \pm 5\%$ e $96 \pm 4\%$, respectivamente (Fig. 7A e B). A DI_{50} foi de 12,9 (6,7-24,6) mg/kg na segunda fase da resposta nociceptiva induzida pela formalina (Fig. 7B).

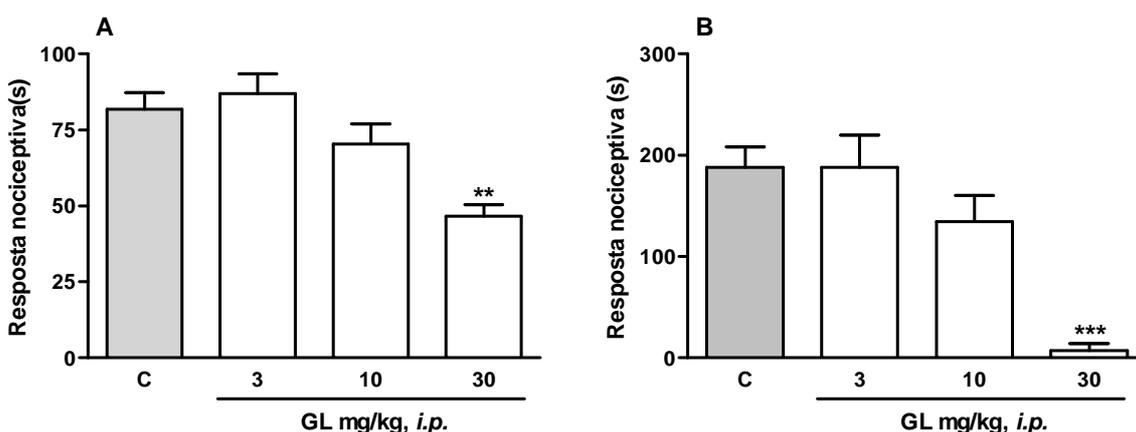


Figura 7: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por formalina 2,5% em camundongos. A nocicepção foi avaliada na primeira fase (0-5 min, painel A) e na segunda fase (15-30 min, painel B). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.3 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo)

Os resultados da Fig. 8A e B demonstram que o GL (100 mg/kg, *i.p.*) não altera o período de latência tanto no teste da placa quente quanto no teste de retirada da cauda. No entanto, o tratamento com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, *s.c.*) aumentou o período de latência de resposta dos animais nos dois testes avaliados (Fig. 8A e B).

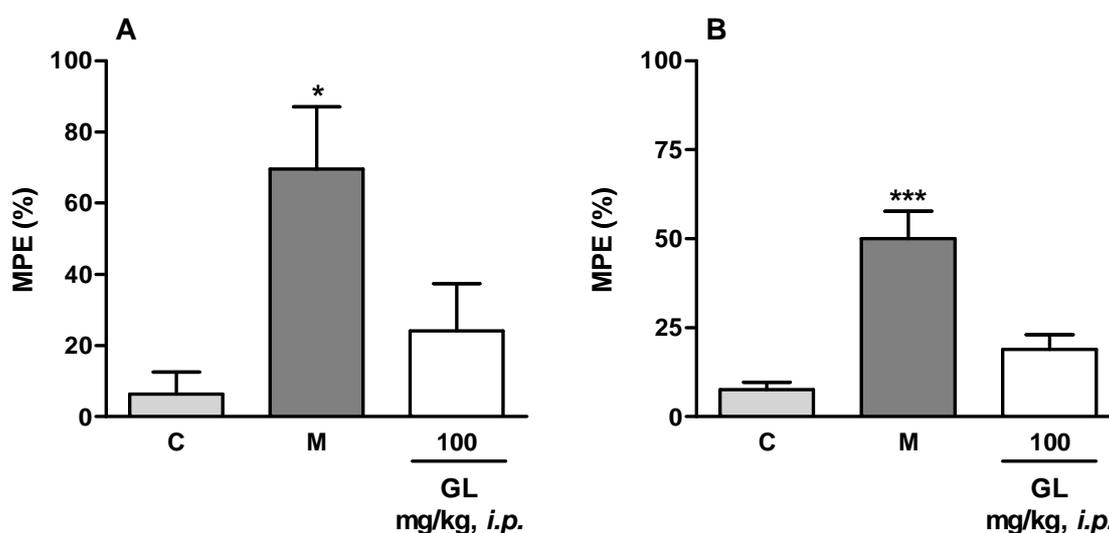


Figura 8: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo estímulo térmico (calor nocivo) em camundongos. Teste da placa quente (painel A) e retirada da cauda (painel B). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Diferente do grupo controle para *** $P < 0,001$.

5.4 Efeito do GL sobre a atividade locomotora espontânea em camundongos

O tratamento *i.p.* dos animais com o GL, nas maiores doses (30 e 100 mg/kg) utilizadas nos modelos de nocicepção química e térmica, não alterou a atividade locomotora espontânea dos camundongos quando avaliados durante 6 min no teste do campo aberto e comparados com o grupo controle (Fig. 9).

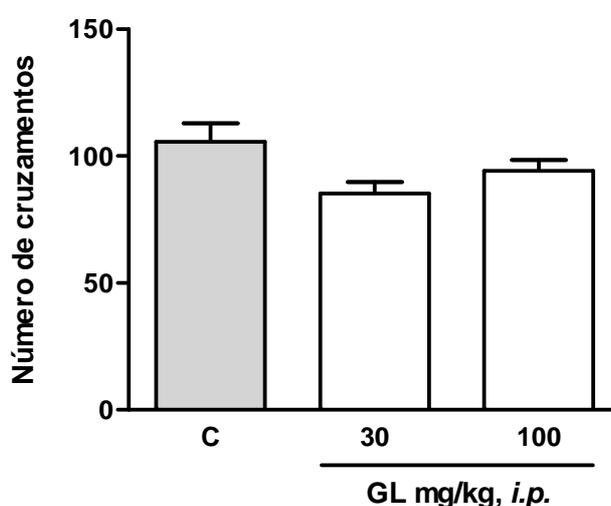


Figura 9: Efeito do GL sobre a atividade locomotora espontânea em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

5.5 Efeito do GL sobre a peritonite induzida por carragenina

A administração da carragenina aumentou a migração de leucócitos, neutrófilos e mononucleares para $5,2$; $2,6$ e $2,9 \times 10^6$ na cavidade peritoneal (Fig. 10A-C). O tratamento *i.p.* dos animais com o GL ($0,1$ - 10 mg/kg) reduziu a

migração de leucócitos totais com DI_{50} de 0,4 (0,1-0,9) mg/kg e inibição de $89 \pm 5\%$ (Fig. 10A). A migração de neutrófilos e mononucleares foram inibidos com DI_{50} de 0,6 (0,1-2,4) e 0,2 (0,1-0,4) mg/kg, respectivamente. A inibição foi de 75 ± 6 e $99 \pm 1\%$, respectivamente (Fig. 10B e C). O controle positivo, dexametasona, inibiu os leucócitos totais, os neutrófilos e os mononucleares em 69 ± 7 , 100 e $74 \pm 11\%$, respectivamente.

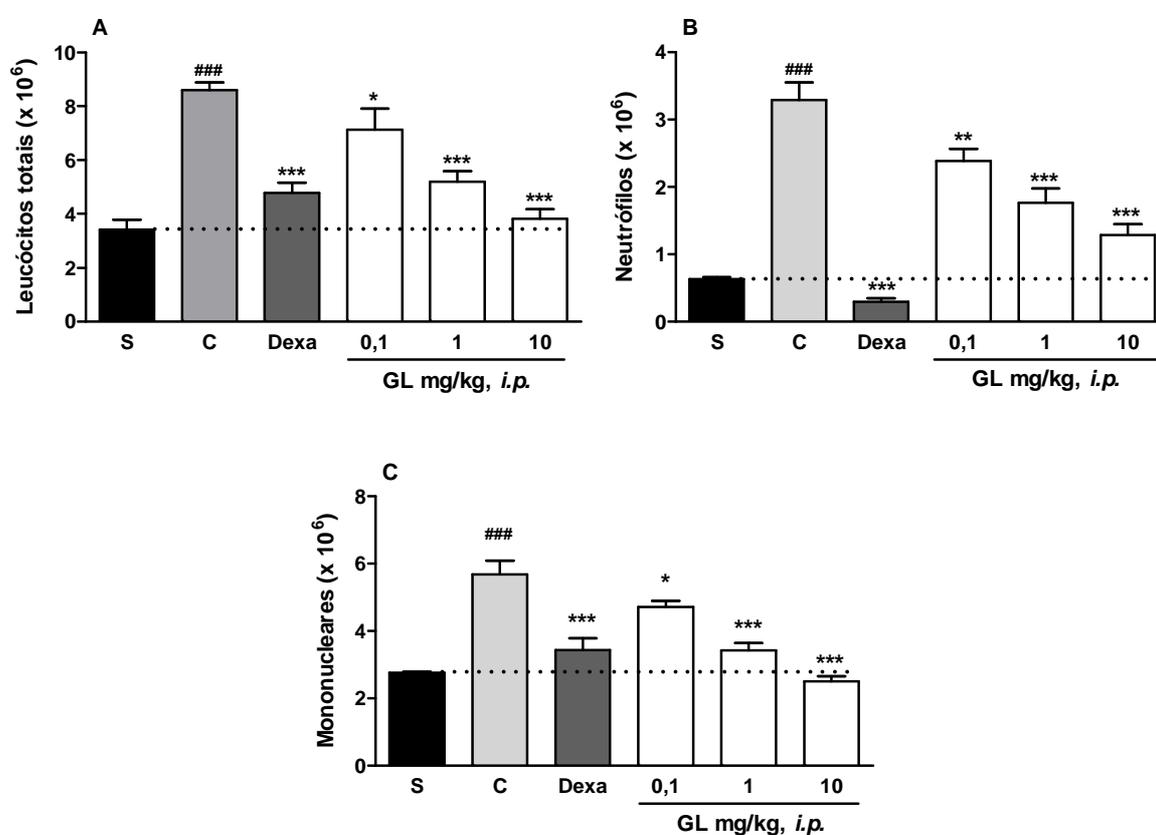


Figura 10: Efeito do GL sobre a migração de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B) e mononucleares (painel C) induzida pela carragenina (750 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) por 4 h. A comparação entre os grupos ($n = 6$ a 8) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Diferente para o grupo salina para ### $P < 0,001$.

A injeção de carragenina também aumentou os níveis de TNF- α e IL-1 β para 142 e 1740 pg/ml e reduziu os níveis de IL-10 para 1041 pg/ml (Fig. 11A-C). A dose de 10 mg/kg, *i.p.* do GL aumentou os níveis de IL-10 em 97 \pm 37% (Fig. 11C), mas não alterou os níveis de TNF- α e IL-1 β (Fig. 11A e B). A dexametasona inibiu significativamente os níveis de TNF- α e IL-1 β em 61 \pm 7 e 69 \pm 15%, respectivamente, mas não alterou os níveis de IL-10.

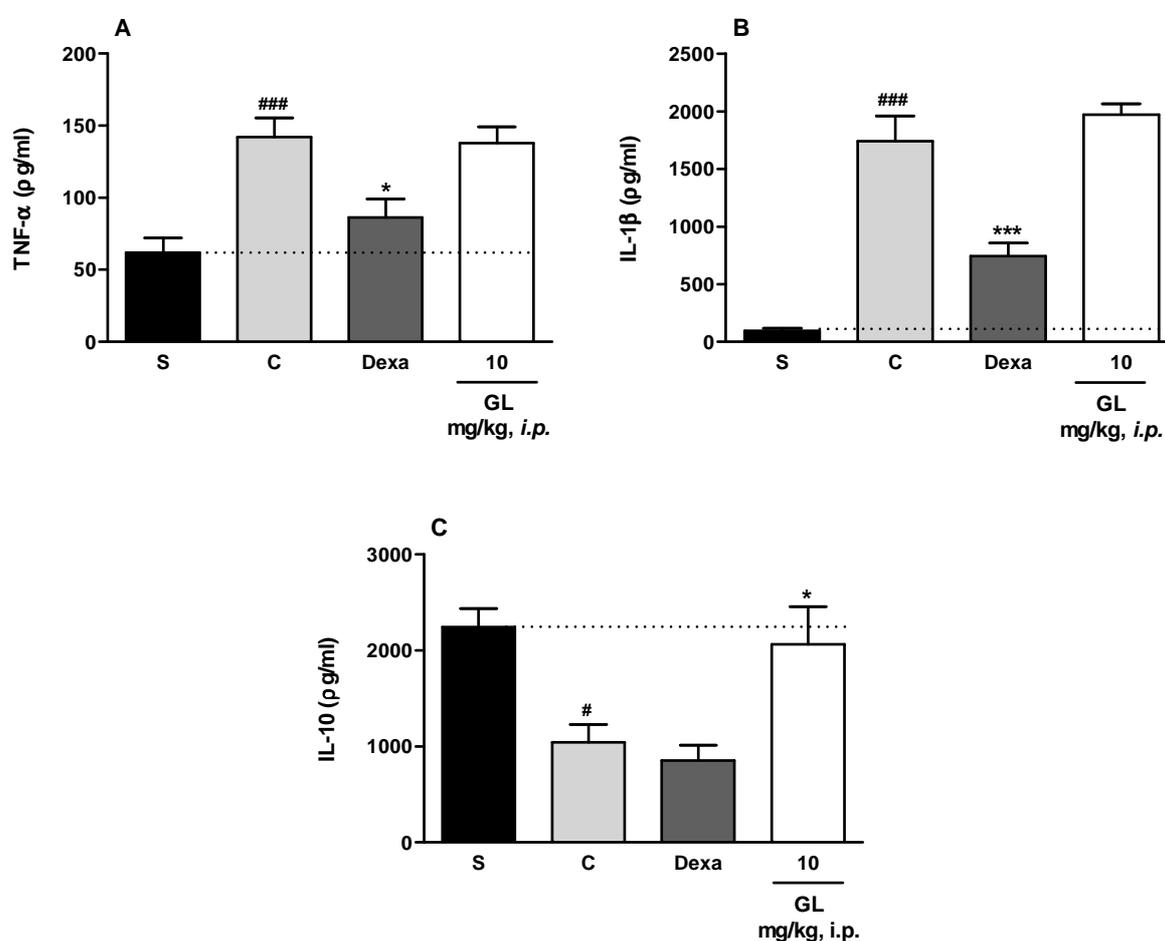


Figura 11: Efeito do GL sobre os níveis de TNF- α (painel A), IL-1 β (painel B) e IL-10 (painel C) induzida pela carragenina (750 μ g/cavidade) por 4 h. A comparação entre os grupos (n = 6 a 8) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para * P < 0,05 e *** P < 0,001. Diferente para o grupo salina para # P < 0,05 e ### P < 0,001.

5.6 Efeito do GL sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

A administração do GL (3-30 mg/kg, *i.p.*) inibiu de forma dose dependente a nociceção induzida por capsaicina (5,2 nmol/pata) com DI_{50} de 8,1 (5,9-11,3) mg/kg e inibição de $92 \pm 4\%$ (Fig. 12A). O vermelho de rutênio (3 mg/kg, *i.p.*), controle positivo do teste, inibiu a resposta nociceptiva causada pela capsaicina em $87 \pm 2\%$.

Quando o GL (10 e 30 μ g/pata) foi co-administrado com a capsaicina (5,2 nmol/pata), não houve alteração da resposta nociceptiva (Fig. 12B).

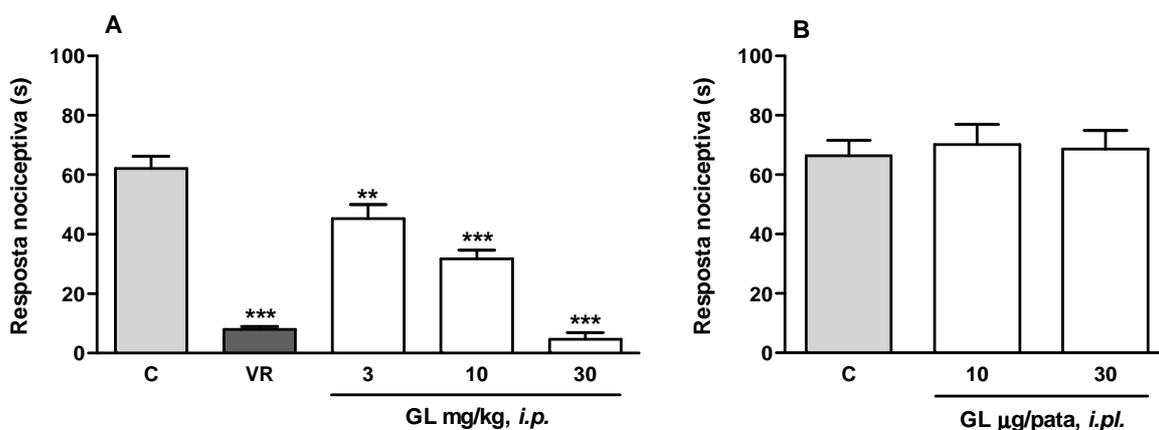


Figura 12: Efeito do GL sobre a nociceção induzida por capsaicina (5,2 nmol/pata) em camundongos. Painel A: tratamento intraperitoneal (*i.p.*) e painel B: tratamento intraplantar (*i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.7 Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos

A administração intraperitoneal do GL (3-10 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida por cinamaldeído (10 nmol/pata) com DI_{50} de 13,8 (9,6-19,8) mg/kg e inibição de $67 \pm 12\%$ (Fig. 13A). O controle positivo, cânfora (7,6 mg/kg, s.c.), inibiu a resposta nociceptiva em $57 \pm 6\%$.

Quando o GL (10 e 30 μ g/pata) foi injetado em conjunto com o cinamaldeído (10 nmol/pata), não houve alteração da resposta nociceptiva (Fig. 13B).

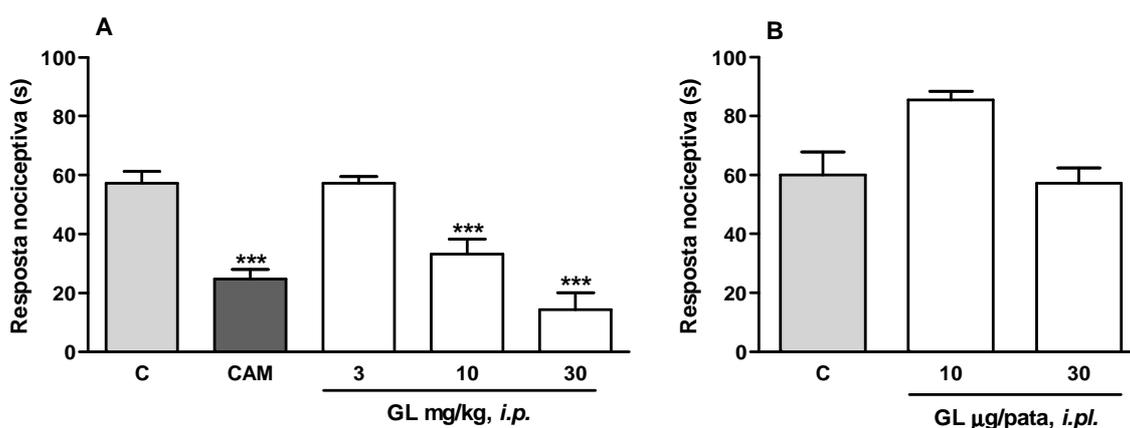


Figura 13: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida por cinamaldeído (10 nmol/pata) em camundongos. Painel A: tratamento intraperitoneal (*i.p.*) e painel B: tratamento intraplantar (*i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para *** $P < 0,001$.

5.8 Efeito do GL sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos

O tratamento *i.p.* dos animais com o GL (0,1-10 mg/kg) reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo mentol (1,2 $\mu\text{mol/pata}$) com DI_{50} de 0,19 (0,10-0,37) mg/kg e inibição de $97 \pm 1\%$ (Fig. 14A).

A co-administração do GL (10 e 30 $\mu\text{g/pata}$) com o mentol (1,2 $\mu\text{mol/pata}$) não alterou a resposta nociceptiva (Fig. 14B).

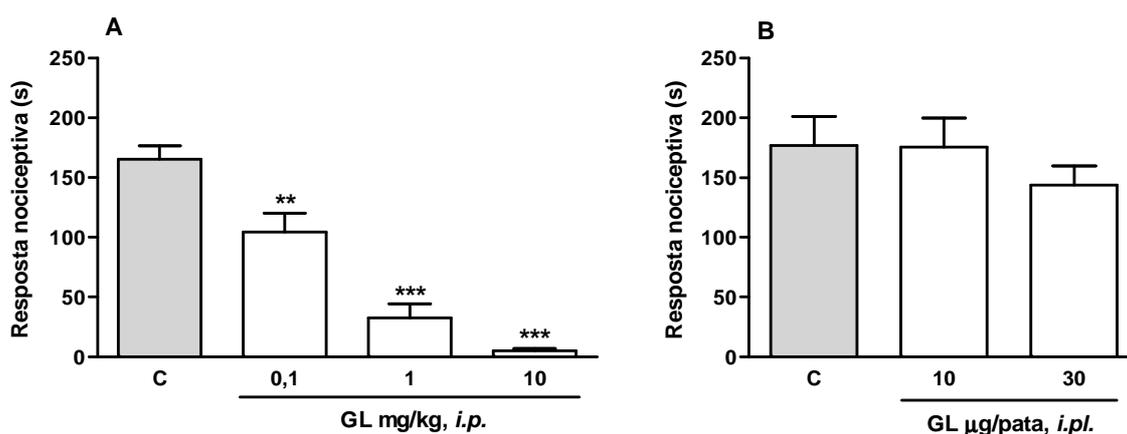


Figura 14: Efeito do GL sobre a nociceção induzida por mentol (1,2 $\mu\text{mol/pata}$) em camundongos. Painel A: tratamento intraperitoneal (*i.p.*) e painel B: tratamento intraplantar (*i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.9 Efeito do GL sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida em camundongos

A administração intraperitoneal do GL (10-100 mg/kg) reduziu a nociceção induzida pela salina ácida (2%, pH 1,98/pata) com DI_{50} de 29,8 (20,0-44,4) mg/kg e inibição de $89 \pm 4\%$ (Fig. 15A). O controle positivo, amilorida (100 mg/kg, *i.p.*), inibiu a resposta nociceptiva em $65 \pm 5\%$.

Quando o GL (10 e 30 μ g/pata) foi co-administrado com a salina ácida (2%, pH1,98/pata), não houve alteração da resposta nociceptiva (Fig. 15B).

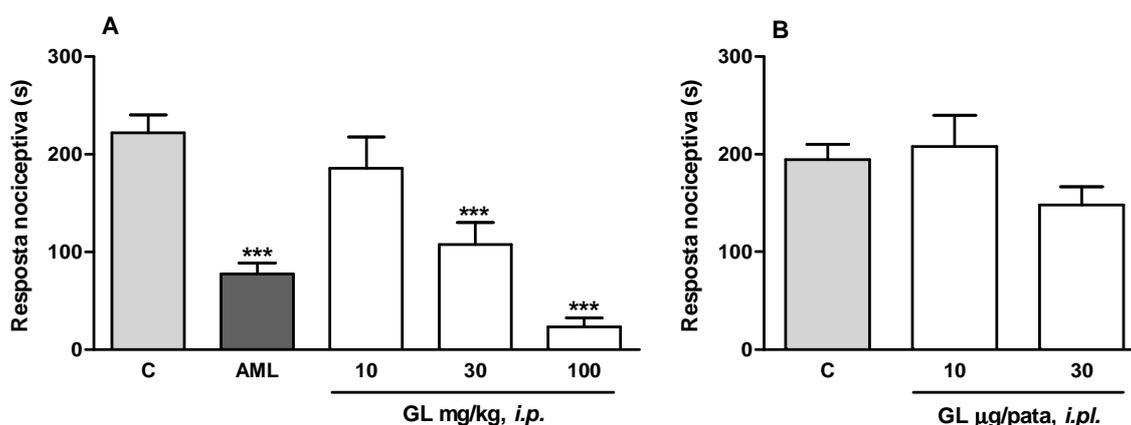


Figura 15: Efeito do GL sobre a nociceção induzida pela salina ácida (2%, pH 1,98/pata) em camundongos. Painel A: tratamento intraperitoneal (*i.p.*) e painel B: tratamento intraplantar (*i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para *** $P < 0,001$.

5.10 Avaliação da depleção de fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do GL em camundongos

A administração tópica de 10 μ l de capsaicina (10 μ g/ml) no olho direito de camundongos que foram tratados com capsaicina no período neonatal reduziu os movimentos de limpeza do olho em $81 \pm 5\%$ (Fig. 16A).

O tratamento com capsaicina neonatal (50 mg/kg, s.c.) reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético em $55 \pm 6\%$ quando comparado com os animais tratados com salina. O GL (3 mg/kg, i.p.) inibiu a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético em 86 ± 4 e $92 \pm 3\%$ quando comparado ao grupo controle que recebeu salina e capsaicina neonatal, respectivamente (Fig. 16B).

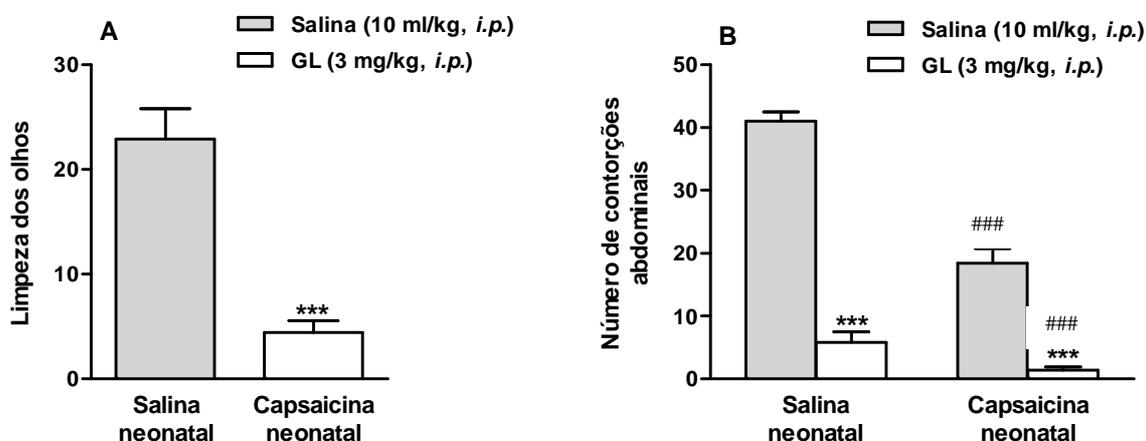


Figura 16: Efeito da administração de capsaicina sobre os movimentos de limpeza dos olhos (painel A) e efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético 0,6% em camundongos com depleção de fibras sensíveis à capsaicina (painel B). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste t de Student ou do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle que não recebeu capsaicina neonatal para ### $P < 0,001$. Diferente do grupo salina e controle para *** $P < 0,001$.

5.11 Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do GL em camundongos

Os resultados da Fig. 17 demonstram que pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, *i.p.*, antagonista de receptores opióides), administrada 20 min antes do veículo, morfina ou GL reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (1 mg/kg, *s.c.*) no modelo de resposta nociceptiva induzida capsaicina. No entanto, a naloxona não reverteu a antinocicepção causada pelo GL (10 mg/kg, *i.p.*).

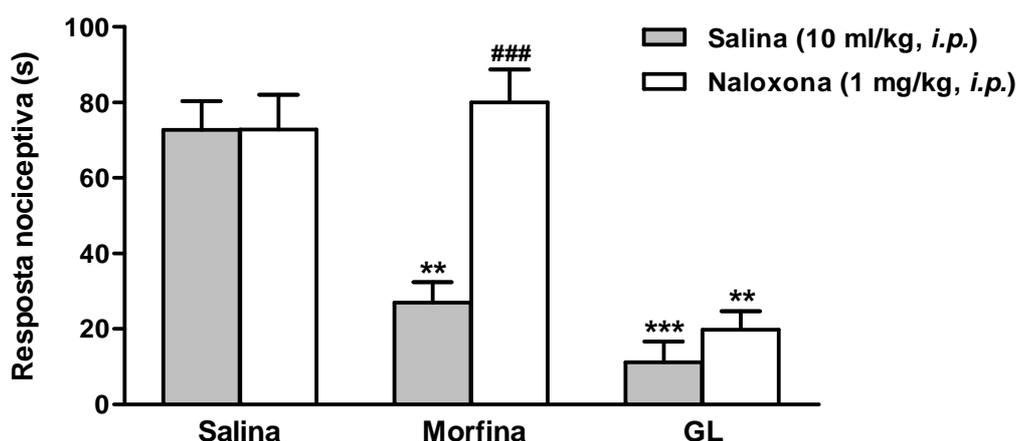


Figura 17: Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, *i.p.*) sobre o efeito antinociceptivo do GL no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina (5,2 nmol/pata) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo salina + salina para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ e diferente do grupo salina + morfina para ### $P < 0,001$.

5.12 Avaliação da participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis no efeito antinociceptivo do GL em camundongos

O pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (1 $\mu\text{g}/i.t.$, 7 dias antes do experimento), a qual é capaz de produzir a inativação da proteína $G_{i/o}$, não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético. No entanto, o mesmo tratamento com a toxina pertussis reverteu total e parcialmente os efeitos antinociceptivos causados pela morfina (2,5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo) e pelo GL (3 mg/kg, *i.p.*), respectivamente, no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Fig. 18).

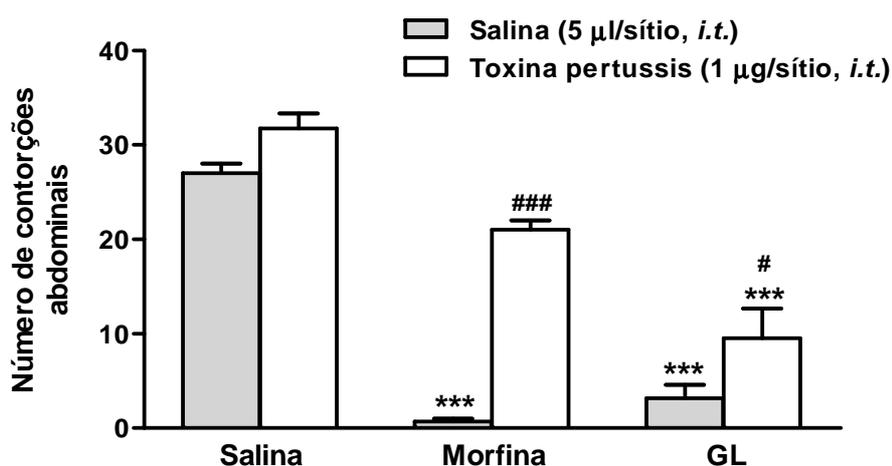


Figura 18: Efeito do pré-tratamento com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo do GL no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo salina + salina para *** $P < 0,001$ e diferente do grupo salina + morfina e salina + GL para # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$.

5.13 Efeito do GL sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

A administração do GL (0,1-10 mg/kg, *i.p.*) inibiu de forma dose dependente a nociceção induzida por glutamato (20 μ mol/pata) com DI_{50} de 0,34 (0,15-0,74) mg/kg e inibição de $96 \pm 3\%$ (Fig. 19).

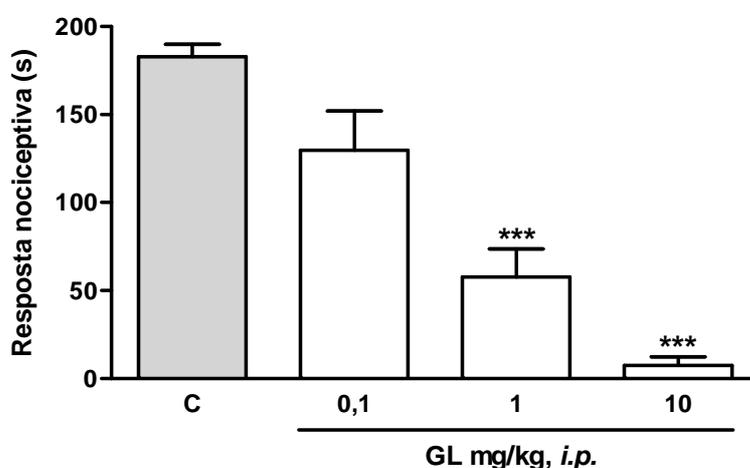


Figura 19: Efeito do GL sobre a nociceção induzida pelo glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo salina para *** $P < 0,001$.

5.14 Efeito do GL sobre a nociceção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE) e substância P (SP) em camundongos

O GL (1 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal, inibiu a nociceção induzida pela injeção intratecal dos agonistas de receptores ionotrópicos

glutamatérgicos NMDA, AMPA e cainato em 67 ± 13 , 89 ± 11 e $74 \pm 9\%$, respectivamente. No entanto, o GL (1 mg/kg, *i.p.*) não teve efeito antinociceptivo quando a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intratecal de trans-ACPD (agonista de receptor metabotrópico glutamatérgico) e SP (Fig. 20).

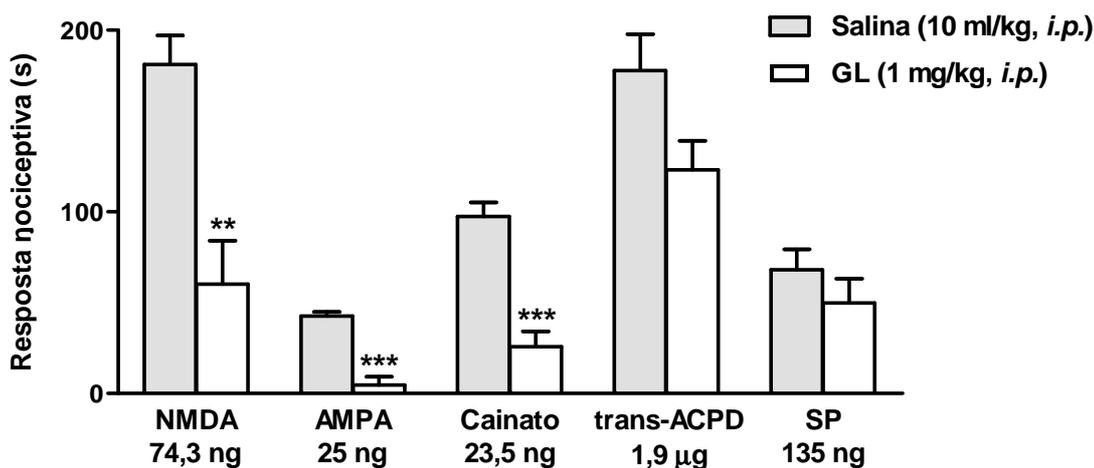


Figura 20: Efeito do GL sobre a nocicepção induzida pelos AAE (NMDA, AMPA, cainato e trans-ACPD) e SP em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo salina para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.15 Efeito do GL sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias em camundongos

A administração do GL (1 mg/kg), pela via *i.p.*, inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de IL-1 β em $75 \pm 7\%$, mas não a resposta nociceptiva induzida pelo TNF- α (Fig. 21).

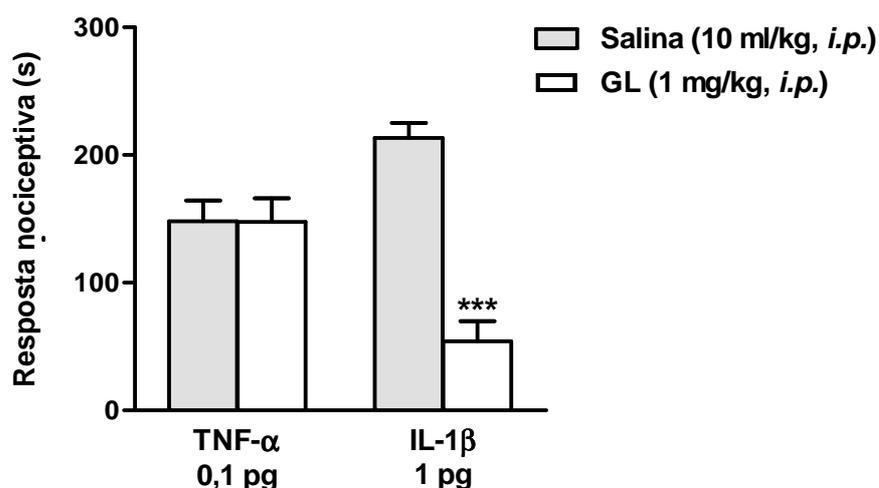


Figura 21: Efeito do GL sobre a nociceção induzida pelas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo salina para *** P < 0,001.

5.16 Avaliação da participação da proteína quinase C (PKC) no efeito antinociceptivo do GL em camundongos

A administração *i.p.* do GL (10-100 mg/kg) produziu uma inibição dose-dependente da resposta nociceptiva induzida pelo PMA (500 pmol/pata), com uma DI_{50} de 17,5 (11,0-28,0) mg/kg e inibição de 100% (Fig. 22).

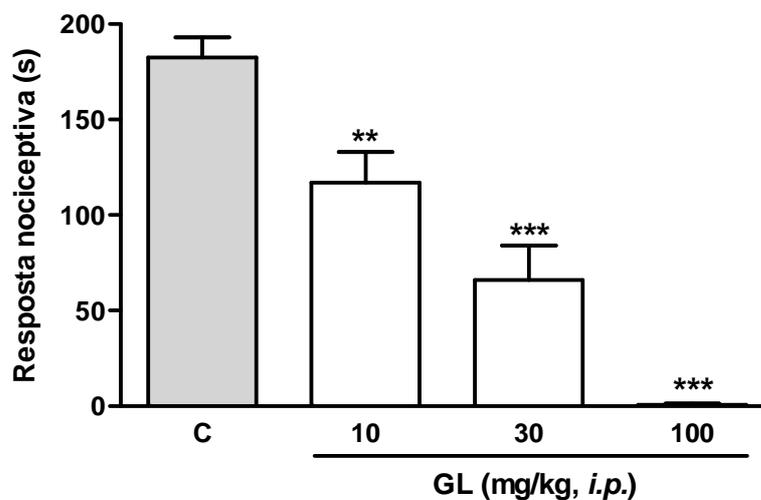


Figura 22: Efeito do GL sobre a nociceção induzida por PMA (500 pmol/pata). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo controle para ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5.17 Ensaaios de western blot

As análises do western blot das patas confirmaram que a administração *i.pl.* de PMA (500 pmol/pata) ativou a PKC ϵ , observada através da translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana (Fig. 23A e B). O tratamento com GL (100 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da injeção do PMA, inibiu a translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana (Fig. 23A e B).

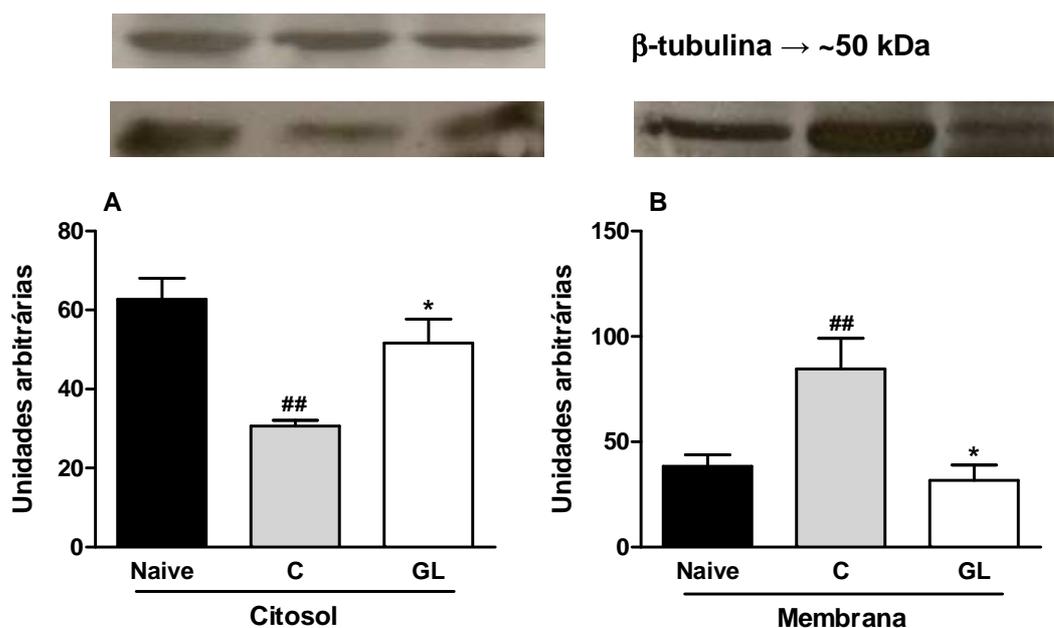


Figura 23: Efeito do GL sobre a translocação da PKC ϵ do citosol (painel A) para a membrana (painel B) em resposta a injeção intraplantar de PMA. Os níveis de PKC ϵ citosólicos e da membrana foram determinados usando-se anticorpos específicos. O grupo Naive representa o grupo de animais que não foram manipulados. A comparação entre os grupos (n = 6 a 8) foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo naive para $^{##}$ P < 0,01 e diferente do grupo controle para * P < 0,05.

5.18 Efeito do GL sobre os astrócitos ativados na medula espinhal de camundongos

As figuras 24A-D e 25 mostram que a formalina induz a ativação dos astrócitos, representada pela maior imunorreatividade para GFAP, quando comparado com o grupo naive (sem formalina). O tratamento dos animais com GL (30 mg/kg, *i.p.*) diminuiu a marcação imunofluorescente do GFAP em $82 \pm 5\%$ (Fig. 24E-F e 25).

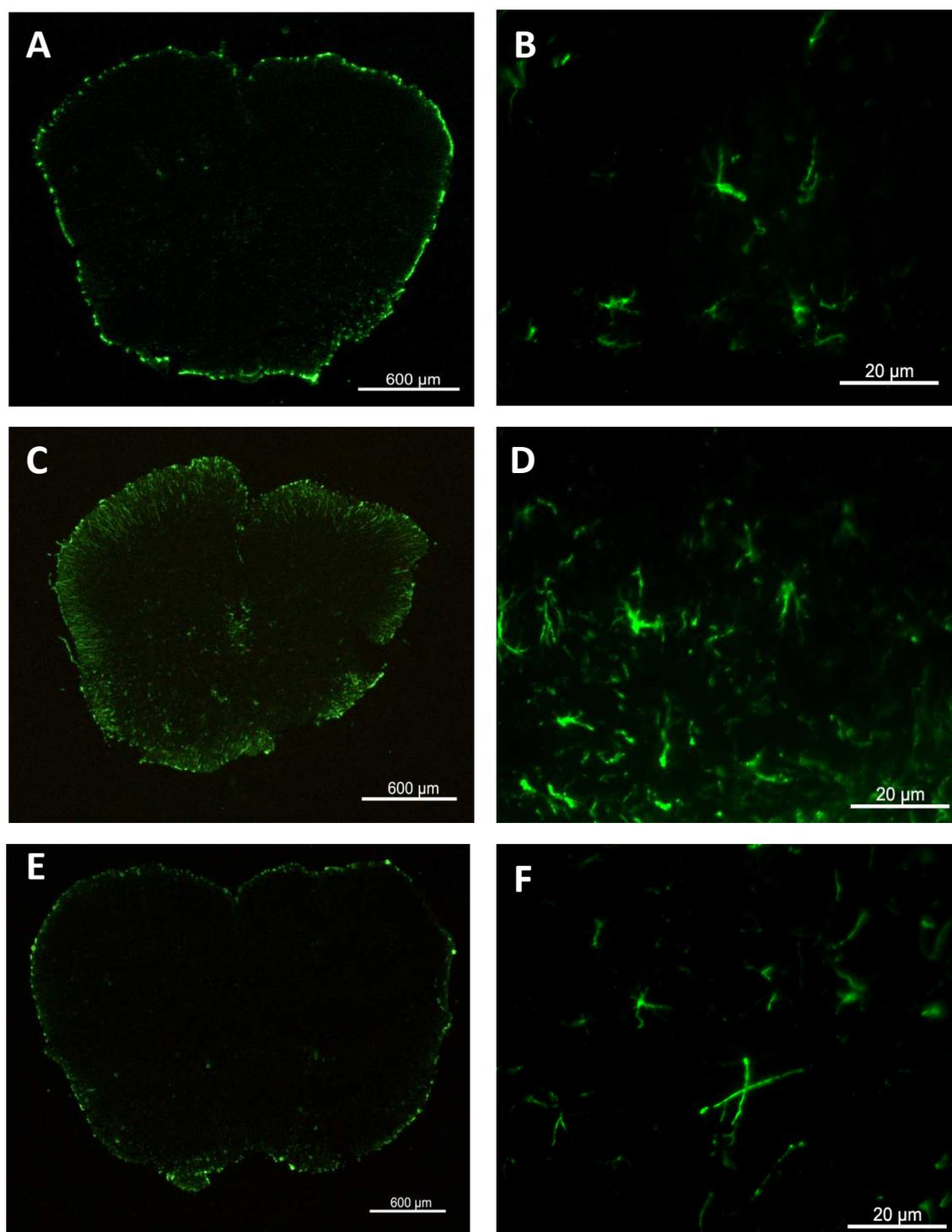


Figura 24: Fotos dos astrócitos da medula espinhal de camundongos imunorreativos para GFAP após a injeção intraplantar de formalina. As medulas de animais naive (Painéis A e B), controle – formalina (Painéis C e D) e GL (Painéis E e F) foram preparados para imunohistoquímica de fluorescência. Imagens representativas da secção de medulas de 2 a 3 animais (aumento de 4x, escala 600 μm e aumento de 40x, escala 20 μm).

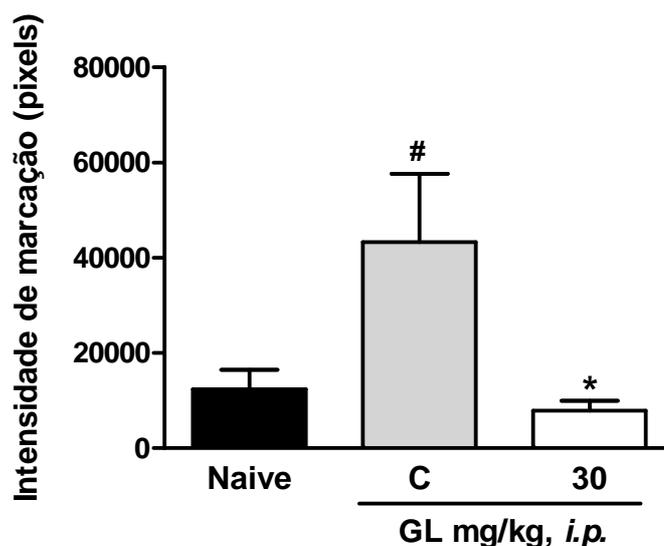


Figura 25: Efeito do GL sobre os astrócitos imunorreativos para GFAP na medula espinhal de camundongos após a injeção de formalina. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 2$ a 3). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Diferente do grupo naive para [#] $P < 0,05$ e do controle para ^{*} $P < 0,05$.

5.19 Efeito do GL sobre a neuropatia periférica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos

A administração de uma única dose do GL (30 mg/kg, *i.p.*) diminuiu significativamente a alodínia mecânica avaliada através do filamento de von Frey (0,4 g) na pata dos animais operados, com inibição de $47 \pm 10\%$ após 30 min do tratamento, um efeito que permaneceu significativo até 2 h (Fig. 26).

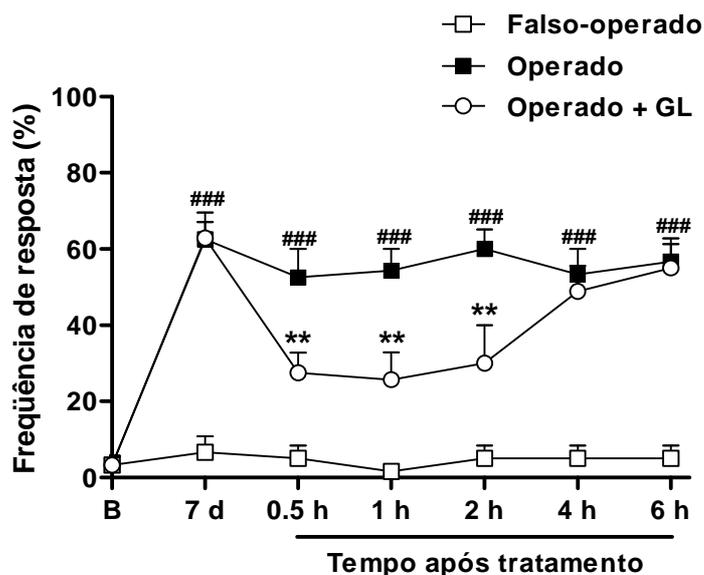


Figura 26: Efeito do GL sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O tratamento com o GL (30 mg/kg, *i.p.*) foi realizado 7 dias após a cirurgia e a antinocicepção foi avaliada por até 6 h após o tratamento (B: freqüência de resposta basal). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo falso-operado para # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$; diferente do grupo operado para * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Quando administrado diariamente (2 x ao dia) por um período de 7 dias, o GL (30 mg/kg, *i.p.*), reduziu a alodínia mecânica com inibições entre 45 ± 13 e $60 \pm 8\%$. Além disso, a suspensão do tratamento com o GL por 3 dias não afetou a sua eficácia nos dias subseqüentes (Fig. 27).

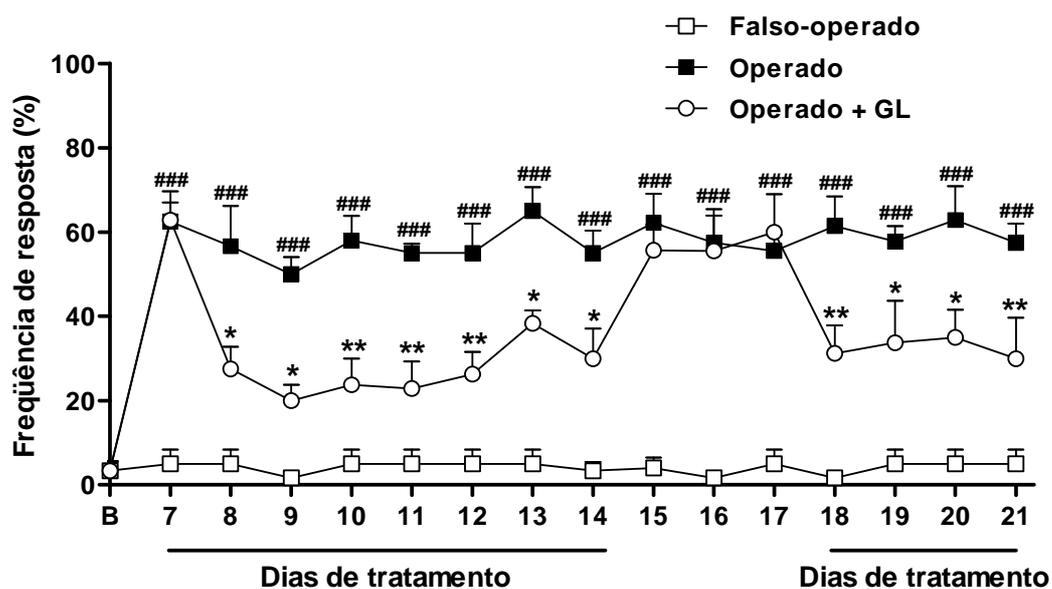


Figura 27: Efeito do GL sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O tratamento com o GL (30 mg/kg, *i.p.*) foi realizado por 7 dias, 2x ao dia e a antinocicepção foi avaliada 30 min após o tratamento (B: frequência de resposta basal). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo falso-operado para # $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$; diferente do grupo operado para * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

6 DISCUSSÃO

A dor está freqüentemente associada a muitas doenças. Apesar dos principais avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na dor e investimento considerável na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento nessa área, ainda existem poucas classes de drogas analgésicas, principalmente para o controle da dor crônica (WOODCOCK, WITTER, DIONNE, 2007). Além disso, as terapias atuais são usualmente insuficientes por possuírem efeitos colaterais severos e efetividade limitada (BOURINET et al., 2005). Por essa razão, a busca por novas moléculas que sejam eficazes e com efeitos adversos menores é contínua e necessária.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a atividade antinociceptiva do GL em modelos de nocicepção aguda induzida por agentes químicos e térmico e em modelo de nocicepção crônica representada pela neuropatia periférica. Além disso, alguns possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do GL foram investigados. Outro objetivo deste estudo foi verificar a atividade anti-inflamatória do através do modelo de peritonite.

Recentemente, foi relatado que a administração intraperitoneal do GL reduziu significativamente as contorções abdominais, o número de leucócitos e o extravasamento plasmático induzidos pelo ácido acético, bem como também foi efetivo em reduzir a resposta nociceptiva produzida pela administração intraplantar de formalina, em camundongos (SMIDERLE et al., 2008a).

Entre os modelos de nocicepção química utilizados nesse trabalho, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é descrito como típico

modelo de dor inflamatória, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes (VINEGAR et al., 1979; TJOLSEN, HOLE, 1997). Desta maneira, estes dados confirmam que o tratamento intraperitoneal dos animais com o GL (0,3-3 mg/kg) produz um efeito antinociceptivo de forma dependente da dose. Além disso, a atividade antinociceptiva do GL (1-30 mg/kg) quando administrado pela via oral apresentou o mesmo perfil de inibição. No entanto, neste modelo, a administração intraperitoneal do GL apresentou um efeito 10 vezes mais potente que o tratamento via oral. A irritação local promovida pelo ácido acético induz a liberação de vários mediadores endógenos como bradicinina, prostaglandinas e citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-8) que estimulam os neurônios nociceptivos (COLLIER et al., 1968; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Além de ser influenciada por esses mediadores inflamatórios, a nocicepção promovida pelo ácido acético também pode ser mediada pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam os canais TRPV1 e ASICs localizados nos neurônios aferentes primários (IKEDA et al., 2001; JULIUS, BASBAUM, 2001; COUTAUX et al., 2005). Considerando os resultados obtidos, é possível sugerir que o efeito antinociceptivo do GL pode estar relacionado com a inibição da liberação desses mediadores ou dos canais TRPV1 e ASIC.

A redução da migração celular promovida pelo GL observada no modelo de nocicepção inflamatória visceral induzida pelo ácido acético pode ser resultado da diminuição dos níveis de citocinas e de mediadores lipídicos na cavidade peritoneal. Além disso, a inibição do extravasamento plasmático observada pela administração intraperitoneal do GL também pode estar associada à redução dos níveis dos mediadores inflamatórios (DOHERTY et al., 1985; KOLACZKOWSKA

et al., 2002). Devido a estes resultados obtidos, pode-se sugerir que, além do efeito antinociceptivo, o GL também apresenta uma atividade anti-inflamatória.

A fim de estender os estudos sobre a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do GL, utilizou-se o modelo de nocicepção induzida pela formalina. O teste da formalina é constituído por duas fases distintas. A nocicepção neurogênica (fase inicial) resulta do efeito irritante direto sobre os nociceptores ativando as fibras aferentes primárias, acarretando na liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP em terminais periféricos e centrais. Já a nocicepção inflamatória (fase tardia) é mediada pela combinação de estímulos periféricos e sensibilização da medula espinhal (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992; MCCALL, TANNER, LEVINE, 1996; PUIG, SORKIN, 1996). Vários trabalhos têm demonstrado que a injeção de formalina libera diferentes mediadores, como PGE₂, NO, glutamato, cininas, entre outros peptídeos, sendo que recentemente foi relatado que a formalina também ativa os canais TRPA1 (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992; SANTOS, CALIXTO, 1997; SANTOS, VEDANA, DE FREITAS, 1998; MCNAMARA et al., 2007). Outros dados importantes foram demonstrados por Yashpal et al. (1995), onde inibidores inespecíficos da proteína quinase C (PKC) atenuam a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina e houve aumento da ativação e translocação da PKC em neurônios do corno dorsal após a administração periférica da formalina. O GL reduziu a fase neurogênica sendo seu efeito mais pronunciado na fase inflamatória da formalina. Estes dados reforçam os indícios de que a glucana em questão possui um importante efeito antinociceptivo e também anti-inflamatório. A modulação da liberação de mediadores pró-

inflamatórios, bem como a inibição da ativação do TRPA1 e da PKC podem estar envolvidos nessas atividades.

O teste do campo aberto foi utilizado para excluir a possibilidade da ação antinociceptiva do GL estar relacionada a distúrbios não-específicos da atividade locomotora dos animais. Os resultados mostraram que as doses do GL que tiveram ação antinociceptiva não alteraram o desempenho motor dos camundongos. Nesse contexto, foi relatado que várias drogas analgésicas com ação depressora sobre o sistema nervoso central e muscular podem reduzir a coordenação motora em animais bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOJA et al., 2002).

Como o GL apresentou uma boa eficácia nos modelos de ácido acético, inibindo a migração de leucócitos e extravasamento plasmático, reconhecidamente características da inflamação; e no modelo da formalina, reduzindo a segunda fase (inflamatória) da resposta nociceptiva, foi investigada a atividade anti-inflamatória do composto utilizando o modelo de peritonite induzida por carragenina.

A peritonite induzida por carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda empregado largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificação e correlação da migração celular e do exsudato inflamatório (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Quando a inflamação aguda peritoneal foi induzida por carragenina em camundongos, o tratamento com GL reduziu a migração de leucócitos e o extravasamento plasmático 4 h após a administração de carragenina. Esses

dados corroboram os resultados anteriores obtidos nos modelos de ácido acético e formalina.

Vários mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na inflamação aguda induzida por carragenina como neuropeptídeos, prostaglandinas, NO e citocinas (DE CASTRO FRANCA et al., 2007). Em relação à participação de citocinas pró-inflamatórias neste modelo, está bem estabelecido que os leucócitos, entre outras células, produzem IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (PEREIRA, MEDEIROS, FRODE, 2006). Por outro lado, os macrófagos produzem IL-10, uma citocina anti-inflamatória que possui mecanismos importantes no controle da inflamação (MOSSER, ZHANG, 2008). A indução da peritonite com carragenina aumentou os níveis de IL-1 β e TNF- α , e ao contrário, reduziu os níveis de IL-10 no fluido peritoneal. A administração do GL aumentou os níveis de IL-10, mas não modificou os níveis de IL-1 β e TNF- α . O resultado obtido está de acordo com os dados de Queiroz et al. (2010), os quais também observaram que glucanas extraídas do cogumelo *Caripia montagnei* aumentaram os níveis de IL-10 após a indução da peritonite com tioglicolato. Inclusive, foi relatado que a IL-10 também possui uma potente ação analgésica, onde a sua administração reduz as respostas hiperalgésicas induzidas pela injeção de carragenina e citocinas pró-inflamatórias na pata (POOLE et al., 1995). Este efeito também é observado quando há uma lesão do nervo (WAGNER, JANJIGIAN, MYERS, 1998). Assim, o aumento dos níveis de IL-10 pode ser um dos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do GL.

Como o GL apresentou um interessante efeito antinociceptivo, o próximo passo deste trabalho foi avaliar o(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido (s) nessa ação.

Primeiramente, avaliou-se a participação dos receptores TRPs e ASIC na atividade antinociceptiva do GL. Sabe-se que esses receptores possuem um importante papel na detecção de estímulos nocivos (MCCLESKEY, GOLD, 1999; TOMINAGA, 2007). Neste estudo, foi observado que o GL administrado *i.p.* inibe efetivamente as respostas nociceptivas induzidas pelas injeções *i.pl.* de capsaicina ou cinamaldeído, os quais são agonistas altamente seletivos dos canais TRPV1 e TRPA1, respectivamente, bem como a nocicepção induzida pelo mentol (agonista preferencial do canal TRPM8 que também pode ativar canais TRPA1 em altas concentrações) ou salina acidificada (a qual ativa canais TRPV1 e ASIC). Além disso, a potência do GL em inibir a nocicepção induzida pelo cinamaldeído está de acordo com os resultados obtidos no modelo de formalina, especialmente considerando que a formalina também ativa canais TRPA1 (MCNAMARA et al., 2007). No entanto, quando o GL foi co-administrado na pata com os agonistas dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASIC, o mesmo não reduziu as respostas nociceptivas (Fig. 28). Esses resultados indicam que provavelmente o GL não atue diretamente nos receptores que estão presentes nas fibras aferentes primárias. No entanto, pode-se sugerir que a glucana estaria atuando em vias de sinalização subseqüentes à ativação desses receptores ou modulando a liberação de mediadores pelo terminal central da fibra aferente na sinapse com os neurônios presentes na medula. De fato, a fosforilação do TRPV1 pela PKC sensibiliza o canal para sua ativação frente à capsaicina e o bloqueio desse processo poderia contribuir para o efeito analgésico do GL contra a

nocicepção induzida pela capsaicina (BHAVE et al., 2003). No entanto, esta não seria uma explicação para suas ações inibitórias na nocicepção produzida pelo mentol, cinamaldeído ou salina ácida, já que a PKC desfosforila e inibe os canais TRPM8, não contribui para a sensibilização dos canais TRPA1 e parece fosforilar e sensibilizar somente canais ASIC contendo subunidades de ASIC2, os quais são pobremente expressos por neurônios do GRD (BARON et al., 2002; DEVAL et al., 2004; PREMKUMAR et al., 2005; UGAWA et al., 2005; WANG et al., 2008).

Tem sido mostrado que o TRPM8 é expresso no conjunto de fibras C e A δ negativas para o TRPV1, enquanto que o TRPA1 é expresso em fibras C positivas para o TRPV1 de camundongos e gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos (STORY et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005). Além disso, UGAWA et al. (2005) avaliaram a co-expressão de transcritos de subtipos ASIC distintos e TRPV1 em neurônios de GRD de ratos, usando hibridização *in situ*. Eles reportaram que grandes proporções (~30-45%) dos neurônios de pequeno diâmetro TRPV1-positivo também expressam transcritos de ASIC1a e/ou ASIC3, mas dificilmente algum dos neurônios que expressam ASIC1b são TRPV1-positivo. Alguns estudos demonstraram que uma proporção apreciável dos neurônios sensoriais do GRD que expressam canais ASIC e todos aqueles que expressam TRPM8 não expressam canais TRPV1 (e também TRPA1) (MAMET et al., 2002). Realmente, o fato das respostas de contorções abdominais de camundongos ao ácido acético serem somente parcialmente atenuadas depois do tratamento neonatal com capsaicina, um procedimento que causa degeneração permanente de fibras sensoriais C e A δ que expressam canais TRPV1 (JANCSO, KIRALY, JANCSO-GABOR, 1977), dá suporte a esse achado. Nossos resultados mostraram que as fibras sensíveis a capsaicina participam parcialmente do efeito antinociceptivo do

GL, já que o composto praticamente aboliu a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético em camundongos que receberam capsaicina neonatal.

Por outro lado, o GL não aumentou o tempo de latência nos teste da placa quente e retirada da cauda. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do composto não envolve mecanismos centrais relacionados a modelos que dependem de reflexos espinhais. Sabe-se que estes testes são bem eficientes em revelar a atividade de analgésicos opióides (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001) e essa observação foi confirmada pelo fato da morfina (agonista dos receptores opióides) aumentar o tempo de latência nos dois modelos. Foi demonstrado também que a ação antinociceptiva do GL não foi revertida pela naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, confirmando assim que o sistema opióide parece não participar da analgesia provocada pela glucana.

Vários estudos demonstraram que muitos receptores, incluindo os opióides, efetivamente se acoplam a seus efetores através da proteína Gi/o (JIANG, BAJPAYEE, 2009). Interessantemente, a antinocicepção produzida pela administração do GL foi parcialmente revertida nos animais previamente tratados com a toxina pertussis (uma proteína que catalisa a ribosilação das subunidades α da proteína Gi/o e por isso a desacopla de seus receptores). Enquanto que o efeito antinociceptivo da morfina, que atua em receptores opióides, foi completamente revertido. Esse resultado está de acordo com o dado anterior, reforçando a não participação do sistema opióide na atividade analgésica do GL. No entanto, não se pode excluir totalmente a participação dos receptores acoplados a proteína Gi/o do efeito antinociceptivo do GL por causa da reversão

parcial da antinocicepção (Fig. 28). Estudos demonstraram que os receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos e muscarínicos também utilizam a proteína Gi/o para a sua sinalização (JIANG, BAJPAYEE, 2009).

Já foi demonstrado que a liberação de neuropeptídeos, como SP e CGRP, dos terminais periféricos dos neurônios sensoriais primários é mediada pela ativação do TRPV1 pela capsaicina (CATERINA, JULIUS, 2001). Além disso, a estimulação dos terminais centrais dos aferentes primários pela capsaicina também libera SP e CGRP e induz a transmissão sináptica glutamatérgica, sendo que nesse caso, a ativação do TRPV1 é mediada por PKC (LABRAKAKIS, MACDERMOTT, 2003; SWEITZER et al., 2004).

Desta forma, para fornecer mais evidência sobre a participação do sistema glutamatérgico na antinocicepção causada pelo GL, foi investigado o efeito do GL na nocicepção induzida pelo glutamato administrado via intraplantar. Sabe-se que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos. Além disso, tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de glutamato libera aminoácidos excitatórios, PGE₂, NO, cininas, prótons, glutamato e SP no corno dorsal (MILLAN, 1999; BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002; SAKURADA et al., 2003). Nesse trabalho, foi observado que o GL inibe efetivamente a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato intraplantar.

O glutamato induz uma resposta nociceptiva através da sua atuação em receptores glutamatérgicos que estão presentes em sítios de ação periférica, espinhal e supra-espinhal (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002). Existem 2 famílias de receptores glutamatérgicos, os ionotrópicos e os metabotrópicos. O receptores ionotrópicos são canais permeáveis a cátions e subdivididos em 3

grupos: AMPA, cainato e NMDA (OZAWA, KAMIYA, TSUZUKI, 1998). Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G e operam liberando segundos mensageiros ou influenciando canais iônicos através da interação das subunidades da proteína G (MELDRUM, 2000). Então, os animais foram tratados pela via intraperitoneal com a DI_{50} (~1 mg/kg) do GL obtida na nocicepção induzida pelo glutamato e a resposta nociceptiva foi induzida pelos agonistas dos receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e pelo agonista do receptor metabotrópico (trans-ACPD). Nossos resultados demonstraram que o GL inibe a nocicepção causada por NMDA, AMPA e cainato, mas não inibe aquela causada por trans-ACPD (Fig. 28). Apesar dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos deflagrarem vias de sinalização intracelular diferentes, ambos ativam a PKC. No entanto, apenas os receptores NMDA estão envolvidos na translocação da PKC e na nocicepção em modelos de dor aguda (YASHPAL et al., 2001).

Em estudos anteriores foi descrito que tanto o glutamato quanto a capsaicina, quando administrados periféricamente, provocam a liberação do próprio glutamato, SP e prótons em sinapses no corno dorsal (MILLAN, 1999). Além disso, há evidência indicando a interação da SP e glutamato em nível espinhal. Mudanças comportamentais observadas após a administração espinhal de SP é potenciada pela co-administração de NMDA e cainato (MJELLEM-JOLY et al., 1991; 1992). Nesse estudo, foi observado que o GL não reduz a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de SP. No entanto, foi demonstrado que as respostas biológicas provocadas pela SP são rapidamente atenuadas na presença continuada do agonista, indicando que o receptor para SP [receptor de neurocinina 1 (NK1-R)] sofre dessensibilização rapidamente (BOWDEN et al.,

1994; GARLAND et al., 1996; MCCONALOGUE et al., 1998). Essa dessensibilização do NK1-R é mediada pela PKC, já que foi observado que ativadores da PKC induzem a fosforilação do receptor e inibem a sinalização da SP (ROUSH, WARABI, KWATRA, 1999; VIGNA, 1999; DERY, DEFEA, BUNNETT, 2001). Essas observações sugerem que o efeito antinociceptivo do GL poderia ser regulado pela via dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos que modulam a transmissão nociceptiva na medula. Isso explicaria a falta de ação da glucana quando co-administrada com os agonistas/ativadores dos receptores TRPs, ASICs e NK1-R. Estudos adicionais serão realizados para verificar se o efeito do GL também ocorre por ação direta nos receptores glutamatérgicos.

Outros mediadores que estão envolvidos na modulação de processos nociceptivos são as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β . Sabe-se que essas citocinas, quando administradas intratecalmente, promovem um comportamento nociceptivo por induzir a liberação de glutamato e SP dos terminais nervosos (TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que o TNF- α e a IL-1 β aumentam as correntes induzidas pelos receptores para NMDA e AMPA nos neurônios da lâmina II superficial do corno dorsal (KAWASAKI et al., 2008). Por esta razão, foi investigado o efeito do GL na resposta nociceptiva induzida por TNF- α e IL-1 β . O tratamento dos animais com GL inibiu a resposta nociceptiva induzida por IL-1 β , mas não por TNF- α (Fig. 28). É descrito na literatura a ativação de diferentes quinases pelo TNF: a aplicação tópica de TNF em raízes nervosas de ratos aumenta a fosforilação da quinase relacionada a sinais extracelulares (ERK) com um tempo de início de várias horas, enquanto que a aplicação aguda (5-15 min) de TNF em cultura de neurônios do GRD induz a fosforilação da quinase terminal c-Jun (JNK) e proteína

quinase p38 (p38), mas não a ERK (POLLOCK et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2006). Com os resultados obtidos pode-se sugerir que o GL não interfere no receptor de TNF- α ou na via de sinalização deste receptor. No entanto, a IL-1 β pode facilitar a ativação do receptor para NMDA nos neurônios e essa ativação é devido à fosforilação do receptor pela PKC (VIVIANI et al., 2003; YANG et al., 2005; GUO et al., 2007). Outra explicação para a ação antinociceptiva do GL na nocicepção induzida pela IL-1 β seria a inibição da via de sinalização dependente de moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM). Essas moléculas ligam-se no domínio intracelular do receptor Toll-IL-1 que é um domínio comum na superfamília de receptores Toll-IL-1. Essa superfamília compreende receptores para a IL-1 β (IL-1R) e Toll-like (TLR) (LI, QIN, 2005). Os TLRs são receptores que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos, e junto com o receptor dectina-1 reconhecem β -glucanas (que formam as paredes celulares de fungos) (UNDERHILL, 2007). No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar essa ação.

Existem evidências extensas implicando a proteína quinase C (PKC) nos mecanismos de sinalização que levam à nocicepção e hiperalgesia (SOUZA et al., 2002). A PKC é uma família de quinases de serina/treonina que estão divididas em 3 grupos: as convencionais (c), isoenzimas (α , β I, β II e γ) que são dependentes de cálcio e diacilglicerol (DAG); as originais (n), isoenzimas (δ , ϵ , η e θ) que são independentes de cálcio mas dependente de DAG; e as atípicas (a), isoenzimas (ξ e λ/ι) que são independentes de cálcio e DAG) (VELAZQUEZ, MOHAMMAD, SWEITZER, 2007). Por esta razão, foi testada a hipótese de que a PKC poderia constituir um alvo potencialmente relevante para a ação

antinociceptiva do GL e foi observado que o composto inibe efetivamente as respostas nociceptivas induzidas pela injeção *i.pl.* de PMA (Fig. 28), um ativador direto da PKC (FERREIRA et al., 2005).

Quando um ativador da PKC, como o PMA, é injetado intraplantarmente, ocorre a translocação das isoformas α e ϵ da PKC do citoplasma para a membrana (FERREIRA et al., 2005). Desta forma, foram utilizadas as análises de Western blot para se obter evidências *ex vivo* de que o PMA *i.pl.* promove a translocação da PKC ϵ da fração citosólica para membrana em homogenatos da pele da pata. Interessantemente, o tratamento *i.p.* prévio com GL, em uma dose que promoveu analgesia, preveniu a translocação da PKC ϵ induzida pelo PMA.

Nas fibras aferentes primárias periféricas, a PKC é ativada por um grande número de substâncias que são liberadas em resposta a uma lesão, entre elas estão bradicinina, endotelina-1, prostaglandinas, citocinas, entre outras. E uma vez ativada, a PKC pode fosforilar os canais TRPs e ASIC. Já nos terminais aferentes primários centrais na medula espinha, a PKC influencia na liberação de neurotransmissores e nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal e regula a atividade de receptores de NK-1, glutamatérgicos e CGRP (VELAZQUEZ, MOHAMMAD, SWEITZER, 2007). Devido a essas evidências, pode-se sugerir que o mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do GL parece envolver a inibição da PKC ϵ .

Atualmente tem-se demonstrado que células não-neuronais da medula espinhal, como a microglia e os astrócitos, também participam da geração e manutenção da nocicepção após a inflamação e lesões dos nervos periféricos e espinhas e da medula espinhal (WATKINS, MAIER, 2003). Sabe-se que na

neuropatia crônica, as microglias são ativadas primariamente e estas liberam citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , que irão ativar os astrócitos (WATKINS, MILLIGAN, MAIER, 2001; MARCHAND, PERRETTI, MCMAHON, 2005; JI, SUTER, 2007). Além disso, os astrócitos expressam receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não-NMDA (PORTER, MCCARTHY, 1997). Como o GL apresentou uma efetiva atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção induzida por IL-1 β , NMDA, AMPA e cainato, avaliou-se o efeito do GL sobre a ativação de astrócitos no modelo de nocicepção induzida pela formalina. Os resultados obtidos mostram que o GL, administrado pela via *i.p.*, reduziu a ativação dos astrócitos induzida pela formalina, evidenciado pela redução da marcação com GFAP, um marcador específico para astrócitos. Esses resultados sugerem que a inibição da ativação astrocitária pode estar envolvida no efeito antinociceptivo do GL (Fig. 28). A modulação da atividade glial pelo GL pode reduzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α , PGE₂ e NO, que por isso inibir a transmissão da informação nociceptiva pelas células neuronais, promovendo a antinocicepção.

Como comentado anteriormente, a dor aguda serve como um sistema de alerta para impedir algum possível dano ao organismo (SCHOLZ, WOOLF, 2002). No entanto, a dor crônica prejudica enormemente a qualidade de vida dos pacientes e é uma dos principais problemas econômicos de saúde. Estimativas mostraram que a prevalência da dor neuropática é acima de 5% na população geral, onde um quarto desses sofre com uma intensidade severa (BARON, 2009). Por esta razão, a identificação dos mecanismos da dor e das possíveis aplicações terapêuticas em modelos animais de dor se torna extremamente necessária (DECOSTERD, BERTA, 2009).

Então, o próximo passo deste trabalho foi utilizar um modelo experimental de mononeuropatia produzida pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos. A lesão do nervo periférico é freqüentemente acompanhada pela inflamação local transitória a qual provavelmente contribui para a estimulação da dor neuropática. Vários mediadores inflamatórios, como PGE_2 , bradicinina, fator de crescimento do nervo, histamina, serotonina, interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), glutamato, endotelina-1 e quimiocinas, podem ser liberados de axônios ou células de Schwann danificados, ou células satélites, mastócitos e leucócitos infiltrados (JI, STRICHARTZ, 2004). Além disso, Mao et al. (1992) demonstraram que há um aumento da translocação da PKC para a membrana na medula espinhal após a lesão por constrição do nervo. Os resultados obtidos mostram que o GL reverte significativamente a alodínia mecânica causada pela LPNC, além disso, a resposta antialodínica causada pelo GL não foi susceptível a tolerância. Esta conclusão é baseada nos dados que mostram que a interrupção do tratamento com o GL foi seguida pelo retorno completo da alodínia e que o tratamento com o GL duas vezes por dia produziu efeitos anti-alodínicos pronunciados. Desta forma, pode-se sugerir que a glucana estaria inibindo a liberação de mediadores inflamatórios ou a ativação da PKC.

Assim, neste trabalho foi demonstrado que o GL possui um importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda e crônica em camundongos. Além disso, o GL apresentou uma interessante atividade anti-inflamatória. Os prováveis alvos para a ação do composto estão mostrados na figura 28.

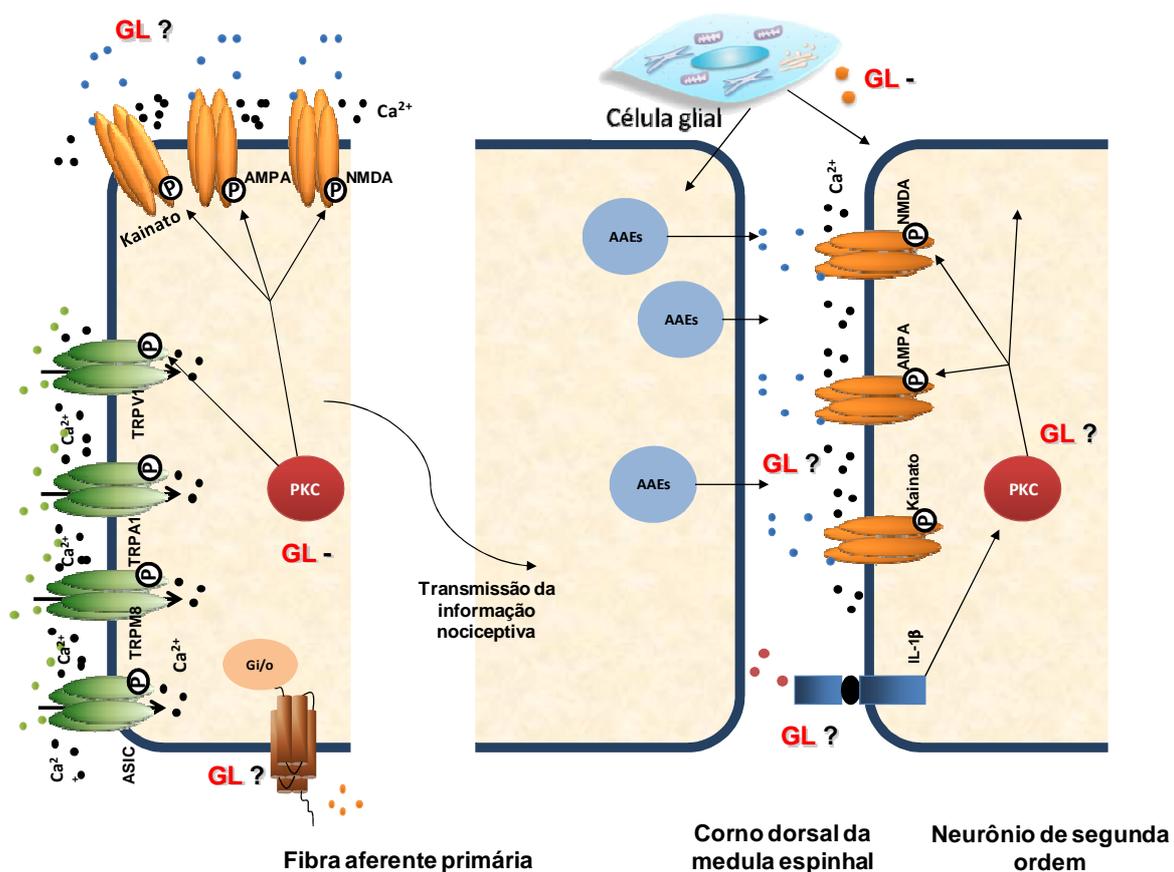


Figura 28: Efeito da (1→3),(1→6) β-glucana (GL) sobre a nocicepção: possíveis alvos de ação. AAEs (aminoácidos excitatórios); AMPA, Kainato, NMDA (receptores glutamatérgicos ionotrópicos); ASIC (canais iônicos sensíveis ao ácido); Gi/o (proteína Gi/o); IL-1β (receptor para interleucina 1β); PKC (proteína quinase C); TRPA1 (receptor de potencial transitório sensível ao frio lesivo); TRPM8 (receptor de potencial transitório sensível ao frio não lesivo); TRPV1 (receptor de potencial transitório sensível ao calor lesivo e à capsaicina).

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- A administração oral e intraperitoneal do GL promoveu antinocicepção no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, e quando administrado pela via i.p. apresentou efeitos anti-inflamatórios representados pela inibição da migração de leucócitos e do extravasamento plasmático para o peritônio após a injeção de ácido acético;
- O tratamento intraperitoneal com o GL inibiu a resposta nociceptiva da primeira e segunda fase induzida pela formalina;
- Os efeitos antinociceptivos observados com o GL não parecem envolver sedação ou comprometimento da atividade locomotora, uma vez que esses parâmetros não foram alterados no teste do campo aberto;
- O tratamento intraperitoneal com o GL apresentou atividade anti-inflamatória com redução da migração de leucócitos, neutrófilos e mononucleares e aumento dos níveis de IL-10 no modelo de peritonite induzida pela carragenina.
- O GL apresentou efeito antinociceptivo, quando administrado pela via intraperitoneal, mas não pela via intraplantar, na nocicepção induzida pelos agonistas/ativadores dos receptores TRPs e ASICs;
- A antinocicepção causada pelo GL depende parcialmente das fibras sensoriais sensíveis à capsaicina;
- O sistema opióide não participa do efeito antinociceptivo do GL;

- A ativação de mecanismos dependentes da proteína Gi/o participa parcialmente do efeito antinociceptivo do GL;
- Na atividade antinociceptiva do GL tem a participação do sistema glutamatérgico e da citocina pró-inflamatória, IL-1 β ;
- O efeito antinociceptivo produzido pela administração intraperitoneal do GL parece envolver a inibição da PKC ϵ ;
- A inibição da ativação dos astrócitos está envolvida no efeito antinociceptivo do GL;
- A administração de uma única dose ou o tratamento prolongado por 7 dias com GL reduziram a alodínia mecânica nos animais com ligadura parcial do nervo ciático, evidenciando seu efeito antinociceptivo em um modelo de dor neuropática;

Coletivamente, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) β -glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. apresentou um importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, G. P.; BROOKS, I. M.; MIYARES, R. L.; WANG, X. B. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **J Neurosci**, v. 25, n. 21, p. 5109-16, 2005.

AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.

ANDRADE, E. L.; LUIZ, A. P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 511-20, 2008.

BADOLE, S. L.; PATEL, N. M.; THAKURDESAI, P. A.; BODHANKAR, S. L. Interaction of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel-Champ. with glyburide in alloxan induced diabetic mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 2, p. 159-64, 2008.

BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849-57, 2004.

BARON, A.; DEVAL, E.; SALINAS, M.; LINGUEGLIA, E.; VOILLEY, N.; LAZDUNSKI, M. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. **J Biol Chem**, v. 277, n. 52, p. 50463-8, 2002.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BEHRENDT, H. J.; GERMANN, T.; GILLEN, C.; HATT, H.; JOSTOCK, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 4, p. 737-45, 2004.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res**, v. 924, n. 2, p. 219-28, 2002.

BENEDIKT, J.; TEISINGER, J.; VYKLIČKY, L.; VLACHOVA, V. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **J Neurochem**, v. 100, n. 1, p. 211-24, 2007.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-5, 1999.

BHAVE, G.; HU, H. J.; GLAUNER, K. S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D. J.; OXFORD, G. S.; GEREAU, R. W. T. 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, n. 21, p. 12480-5, 2003.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 453, n. 2-3, p. 203-8, 2002.

BOURINET, E.; ALLOUI, A.; MONTEIL, A.; BARRERE, C.; COUETTE, B.; POIROT, O.; PAGES, A.; MCRORY, J.; SNUTCH, T. P.; ESCHALIER, A.; NARGEOT, J. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory

neurons demonstrates its major role in nociception. **EMBO J**, v. 24, n. 2, p. 315-24, 2005.

BOWDEN, J. J.; GARLAND, A. M.; BALUK, P.; LEFEVRE, P.; GRADY, E. F.; VIGNA, S. R.; BUNNETT, N. W.; MCDONALD, D. M. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, p. 8964-8, 1994.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-7, 2001.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A.; ANDRE, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chem**, v. 111, p. 531-37, 2008.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 487-517, 2001.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-24, 1997.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. **Mycol Res**, v. 111, n. Pt 6, p. 635-52, 2007.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochem Res**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.

CHIANG, P. D.; YEN, C. T.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of canned mushrooms. **Food Chem**, v. 97, p. 431-37, 2006.

CHOI, S. S.; HAN, K. J.; LEE, J. K.; LEE, H. K.; HAN, E. J.; KIM, D. H.; SUH, H. W. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sci**, v. 73, n. 4, p. 471-85, 2003.

CHUANG, H. H.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. **Neuron**, v. 43, n. 6, p. 859-69, 2004.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 957-62, 2001.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Doenças da imunidade. In: SCHOEN, F. J. (Ed.). **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 72, p. 74-9, 1941.

DAI, Y.; WANG, S.; TOMINAGA, M.; YAMAMOTO, S.; FUKUOKA, T.; HIGASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest**, v. 117, n. 7, p. 1979-87, 2007.

DE CASTRO FRANCA, S.; CORREA, M. M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; GARCIA LEME, J.; GIGLIO, J. R. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, n. 3-4, p. 87-96, 2007.

DERY, O.; DEFEA, K. A.; BUNNETT, N. W. Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 5, p. C1097-106, 2001.

DEVAL, E.; SALINAS, M.; BARON, A.; LINGUEGLIA, E.; LAZDUNSKI, M. 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.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-89, 1985.

EMERY, B.; BUTZKUEVEN, H.; SNELL, C.; BINDER, M.; KILPATRICK, T. J. Oligodendrocytes exhibit selective expression of suppressor of cytokine signaling genes and signal transducer and activator of transcription 1 independent inhibition of interferon-gamma-induced toxicity in response to leukemia inhibitory factor. **Neuroscience**, v. 137, n. 2, p. 463-72, 2006.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, 2004.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 5, p. 787-94, 2004.

FERREIRA, J.; TRICHES, K. M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 171-81, 2005.

GARLAND, A. M.; GRADY, E. F.; LOVETT, M.; VIGNA, S. R.; FRUCHT, M. M.; KRAUSE, J. E.; BUNNETT, N. W. Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors. **Mol Pharmacol**, v. 49, n. 3, p. 438-46, 1996.

GUO, W.; WANG, H.; WATANABE, M.; SHIMIZU, K.; ZOU, S.; LAGRAIZE, S. C.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6006-18, 2007.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.

HICKEY, W. F.; KIMURA, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. **Science**, v. 239, n. 4837, p. 290-2, 1988.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 3-16, 1991.

HU, H. J.; BHAVE, G.; GEREAU, R. W. T. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7444-52, 2002.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res Immunol**, v. 147, n. 7, p. 417-34, 1996.

HUME, D. A.; FAIRLIE, D. P. Therapeutic targets in inflammatory disease. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 25, p. 2925-9, 2005.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 11, p. 6155-60, 2000.

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.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v. 69, n. 24, p. 2911-9, 2001.

JANCSO, G.; KIRALY, E.; JANCSO-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, v. 270, n. 5639, p. 741-3, 1977.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE**, v. 2004, n. 252, p. reE14, 2004.

JI, R. R.; SUTER, M. R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 3, p. 33, 2007.

JIANG, M.; BAJPAYEE, N. S. Molecular mechanisms of G-protein signaling. **Neurosignals**, v. 17, n. 1, p. 23-41, 2009.

JORDT, S. E.; BAUTISTA, D. M.; CHUANG, H. H.; MCKEMY, D. D.; ZYGMUNT, P. M.; HOGESTATT, E. D.; MENG, I. D.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 260-5, 2004.

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

KAWASAKI, Y.; ZHANG, L.; CHENG, J. K.; JI, R. R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J Neurosci**, v. 28, n. 20, p. 5189-94, 2008.

KOBAYASHI, K.; FUKUOKA, T.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. 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.

KOLACZKOWSKA, E.; SHAHZIDI, S.; SELJELID, R.; VAN ROOIJEN, N.; PLYTYCZ, B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. **Inflammation**, v. 26, n. 2, p. 61-71, 2002.

KRISHTAL, O. A.; PIDOPLICHKO, V. I. A receptor for protons in the nerve cell membrane. **Neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 2325-7, 1980.

LABRAKAKIS, C.; MACDERMOTT, A. B. Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. **Neurosci Lett**, v. 352, n. 2, p. 121-4, 2003.

LAVI, I.; LEVINSON, D.; PERI, I.; NIMRI, L.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. Orally administered glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* reduce acute inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Br J Nutr**, v. 103, n. 3, p. 393-402, 2010a.

LAVI, I.; LEVINSON, D.; PERI, I.; TEKOAH, Y.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of

polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1977-90, 2010b.

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

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 8, p. 989-1003, 2007.

LI, X.; QIN, J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. **J Mol Med**, v. 83, n. 4, p. 258-66, 2005.

LIU, D. Z.; LIANG, H. J.; CHEN, C. H.; SU, C. H.; LEE, T. H.; HUANG, C. T.; HOU, W. C.; LIN, S. Y.; ZHONG, W. B.; LIN, P. J.; HUNG, L. F.; LIANG, Y. C. Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. **J Ethnopharmacol**, v. 113, n. 1, p. 45-53, 2007.

LIU, L.; ZHU, W.; ZHANG, Z. S.; YANG, T.; GRANT, A.; OXFORD, G.; SIMON, S. A. Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. **J Neurophysiol**, v. 91, n. 4, p. 1482-91, 2004.

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

LUCENA, G. M.; GADOTTI, V. M.; MAFFI, L. C.; SILVA, G. S.; AZEVEDO, M. S.; SANTOS, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 1, p. 19-25, 2007.

MACPHERSON, L. J.; GEIERSTANGER, B. H.; VISWANATH, V.; BANDELL, M.; EID, S. R.; HWANG, S.; PATAPOUTIAN, A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr Biol**, v. 15, n. 10, p. 929-34, 2005.

MACPHERSON, L. J.; HWANG, S. W.; MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A.; STORY, G. M. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Mol Cell Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 335-43, 2006.

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

MAMET, J.; BARON, A.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **J Neurosci**, v. 22, n. 24, p. 10662-70, 2002.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chem**, v. 73, p. 321-25, 2001.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta glucans in edible mushrooms. **Food Chem**, v. 68, p. 315-18, 2000.

MAO, J.; PRICE, D. D.; MAYER, D. J.; HAYES, R. L. Pain-related increases in spinal cord membrane-bound protein kinase C following peripheral nerve injury. **Brain Res**, v. 588, n. 1, p. 144-9, 1992.

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.

MARSHALL, B. T.; LONG, M.; PIPER, J. W.; YAGO, T.; MCEVER, R. P.; ZHU, C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 190-3, 2003.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, v. 208, n. 1, p. 45-8, 1996.

MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 835-56, 1999.

MCCONALOGUE, K.; CORVERA, C. U.; GAMP, P. D.; GRADY, E. F.; BUNNETT, N. W. Desensitization of the neurokinin-1 receptor (NK1-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK1-R, Galphaq/11, G-protein receptor kinase-2/3, and beta-arrestin-1/2. **Mol Biol Cell**, v. 9, n. 8, p. 2305-24, 1998.

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.

MCCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v. 192, n. 2, p. 444-62, 2005.

MCCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 33, p. 13525-30, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000.

MEOTTI, F. C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J Pain**, *in press*.

MEOTTI, F. C.; LUIZ, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; KASSUYA, C. A.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin:

evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 2, p. 789-96, 2006.

MEOTTI, F. C.; POSSER, T.; MISSAU, F. C.; PIZZOLATTI, M. G.; LEAL, R. B.; SANTOS, A. R. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 6, p. 924-31, 2007.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. Seattle: IASP Press, 1994.

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

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

MIZGERD, J. P.; SPIEKER, M. R.; DOERSCHUK, C. M. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 4042-8, 2001.

MJELLEM-JOLY, N.; LUND, A.; BERGE, O. G.; HOLE, K. Potentiation of a behavioural response in mice by spinal coadministration of substance P and excitatory amino acid agonists. **Neurosci Lett**, v. 133, n. 1, p. 121-4, 1991.

_____. Intrathecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 195-8, 1992.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 2, p. 281-8, 2007.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 6, p. 701-24, 2007.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev**, v. 226, p. 205-18, 2008.

NGUYEN, M. D.; JULIEN, J. P.; RIVEST, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 216-27, 2002.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 5, p. 366-78, 2010.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 4, p. 203-10, 2002.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; REEVE, A. J.; ANDERSSON, D. A.; STORY, G. M.; EARLEY, T. J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 705-15, 2002.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRODE, T. S. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. **Transpl Immunol**, v. 16, n. 2, p. 105-11, 2006.

PETROFF, E. Y.; PRICE, M. P.; SNITSAREV, V.; GONG, H.; KOROVKINA, V.; ABBOUD, F. M.; WELSH, M. J. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 8, p. 3140-4, 2008.

POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 527-35, 2007.

POLLOCK, J.; MCFARLANE, S. M.; CONNELL, M. C.; ZEHAVI, U.; VANDENABEELE, P.; MACEWAN, D. J.; SCOTT, R. H. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 1, p. 93-106, 2002.

POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 4, p. 684-8, 1995.

PORTER, J. T.; MCCARTHY, K. D. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 4, p. 439-55, 1997.

PREMKUMAR, L. S.; RAISINGHANI, M.; PINGLE, S. C.; LONG, C.; PIMENTEL, F. 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, n. 2, p. 345-55, 1996.

QUEIROZ, L. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K.; CASTRO, A. J.; MOURA MDE, F.; BASEIA, I. G.; ARAUJO, R. M.; BENEVIDES, N. M.; LIMA, L. F.; LEITE, E. L. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2010.

REID, G.; FLONTA, M. L. Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**, v. 413, n. 6855, p. 480, 2001.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 387, n. 1, p. 111-8, 2000.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; HORVATH, R. J.; DELEO, J. A. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 7, p. 726-34, 2008.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. **Nutr Rev**, v. 67, n. 11, p. 624-31, 2009.

ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

ROUSH, E. D.; WARABI, K.; KWATRA, M. M. Characterization of differences between rapid agonist-dependent phosphorylation and phorbol ester-mediated phosphorylation of human substance P receptor in intact cells. **Mol Pharmacol**, v. 55, n. 5, p. 855-62, 1999.

SAKURADA, T.; MATSUMURA, T.; MORIYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO, S.; SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 1, p. 115-21, 2003.

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

SANTOS, A. R.; DE CAMPOS, R. O.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **Eur J Pharmacol**, v. 379, n. 1, p. 7-17, 1999a.

SANTOS, A. R.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 1, p. 417-26, 1999b.

SANTOS, A. R.; VEDANA, E. M.; DE FREITAS, G. A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm Res**, v. 47, n. 7, p. 302-7, 1998.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**, v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimanial. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 3, p. 340-7, 2002.

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

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1062-7, 2002.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIEMENS, J.; ZHOU, S.; PISKOROWSKI, R.; NIKAI, T.; LUMPKIN, E. A.; BASBAUM, A. I.; KING, D.; JULIUS, D. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208-12, 2006.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, p. 151-85, 2005.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. 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.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. R.; TORRI, G.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, n. 15, p. 2731-6, 2008b.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol Lett**, v. 24, p. 1845-1938, 2002.

SOJA, P. J.; TAEPAVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B. E.; MCERLANE, S. A.; FRAGOSO, M. C. Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p. 1178-88, 2002.

SOMERS, D. L.; CLEMENTE, F. R. Contralateral high or a combination of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. **J Pain**, v. 10, n. 2, p. 221-9, 2009.

SOUZA, A. L.; MOREIRA, F. A.; ALMEIDA, K. R.; BERTOLLO, C. M.; COSTA, K. A.; COELHO, M. M. 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.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054-9, 2006.

STORY, G. M.; PEIER, A. M.; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. 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.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 11845-6, 2001.

SWEITZER, S. M.; ALLEN, C. P.; ZISSEN, M. H.; KENDIG, J. J. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 269-80, 2004.

TADANO, T.; NAMIOKA, M.; NAKAGAWASAI, O.; TAN-NO, K.; MATSUSHIMA, K.; ENDO, Y.; KISARA, K. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sci**, v. 65, n. 3, p. 255-61, 1999.

TAKAHASHI, N.; KIKUCHI, S.; SHUBAYEV, V. I.; CAMPANA, W. M.; MYERS, R. R. TNF-alpha and phosphorylation of ERK in DRG and spinal cord: insights into mechanisms of sciatica. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 31, n. 5, p. 523-9, 2006.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. (Ed.). **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 1-20.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handb Exp Pharmacol**, n. 179, p. 489-505, 2007.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-43, 1998.

TREVISANI, M.; SMART, D.; GUNTHORPE, M. J.; TOGNETTO, M.; BARBIERI, M.; CAMPI, B.; AMADESI, S.; GRAY, J.; JERMAN, J. C.; BROUGH, S. J.; OWEN, D.; SMITH, G. D.; RANDALL, A. D.; HARRISON, S.; BIANCHI, A.; DAVIS, J. B.; GEPPETTI, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 546-51, 2002.

TSONI, S. V.; BROWN, G. D. beta-glucans and dectin-1. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 45-60, 2008.

UGAWA, S.; UEDA, T.; YAMAMURA, H.; SHIMADA, S. 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.

UNDERHILL, D. M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. **Immunol Rev**, v. 219, p. 75-87, 2007.

VELAZQUEZ, K. T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S. M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 578-89, 2007.

VIGNA, S. R. Phosphorylation and desensitization of neurokinin-1 receptor expressed in epithelial cells. **J Neurochem**, v. 73, n. 5, p. 1925-32, 1999.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Antiinflammatory drugs. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 208-222.

VIVIANI, B.; BARTESAGHI, S.; GARDONI, F.; VEZZANI, A.; BEHRENS, M. M.; BARTFAI, T.; BINAGLIA, M.; CORSINI, E.; DI LUCA, M.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **J Neurosci**, v. 23, n. 25, p. 8692-700, 2003.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.

VOILLEY, N.; DE WEILLE, J.; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J Neurosci**, v. 21, n. 20, p. 8026-33, 2001.

WAGNER, R.; JANJIGIAN, M.; MYERS, R. R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 35-42, 1998.

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v. 131, n. Pt 5, p. 1241-51, 2008.

WASONGA, C. G.; OKOTH, S. A.; MUKURIA, J. C.; OMWANDHO, C. O. Mushroom polysaccharide extracts delay progression of carcinogenesis in mice. **J Exp Ther Oncol**, v. 7, n. 2, p. 147-52, 2008.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 258-74, 2002.

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.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 8, p. 450-5, 2001.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 9, p. 703-10, 2007.

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

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. L. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 80, p. 300-7, 1944.

XU, H.; BLAIR, N. T.; CLAPHAM, D. E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **J Neurosci**, v. 25, n. 39, p. 8924-37, 2005.

YANG, S.; LIU, Z. W.; WEN, L.; QIAO, H. F.; ZHOU, W. X.; ZHANG, Y. X. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. **Brain Res**, v. 1034, n. 1-2, p. 172-9, 2005.

YASHPAL, K.; FISHER, K.; CHABOT, J. G.; CODERRE, T. J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, v. 94, n. 1, p. 17-29, 2001.

YASHPAL, K.; PITCHER, G. M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T. J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **J Neurosci**, v. 15, n. 5 Pt 1, p. 3263-72, 1995.

YATSUZUKA, R.; NAKANO, Y.; JIANG, S.; UEDA, Y.; KISHI, Y.; SUZUKI, Y.; YOKOTA, E.; RAHMAN, A.; ONO, R.; KOHNO, I.; KAMEI, C. Effect of Usuhiratake (*Pleurotus pulmonarius*) on sneezing and nasal rubbing in BALB/c mice. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 8, p. 1557-60, 2007.

YOSHIDA, T.; INOUE, R.; MORII, T.; TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, S.; HARA, Y.; TOMINAGA, M.; SHIMIZU, S.; SATO, Y.; MORI, Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 11, p. 596-607, 2006.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 154, p. 73-100, 2005.

ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; SHIMADA, A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y.; LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sings. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 57, n. 6, p. 901-6, 1993.

ZHUANG, Z. Y.; GERNER, P.; WOOLF, C. J.; JI, R. R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 149-59, 2005.

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

ZYGMUNT, P. M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D. A.; CHUANG, H.; SORGARD, M.; DI MARZO, V.; JULIUS, D.; HOGESTATT, E. D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 452-7, 1999.