

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

Leidiane Mazzardo Martins

**INIBIÇÃO DA GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3 COMO
NOVA ABORDAGEM NO CONTROLE DA DOR AGUDA E
CRÔNICA: ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO**

Florianópolis
2013

Leidiane Mazzardo Martins

**INIBIÇÃO DA GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3 COMO
NOVA ABORDAGEM NO CONTROLE DA DOR AGUDA E
CRÔNICA: ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutora em Neurociências.

Orientador: Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr.

Florianópolis
2013

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

Martins, Leidiane Mazzardo

Inibição da glicogênio sintase cinase 3 como nova
abordagem no controle da dor aguda e crônica: análise dos
mecanismos de ação / Leidiane Mazzardo Martins ;
orientador, Adair Roberto Soares dos Santos -
Florianópolis, SC, 2013.

197 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. GSK3. 3. AR-A014418. 4. dor aguda.
5. Dor crônica. I. Santos, Adair Roberto Soares dos . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. III. Título.

LEIDIANE MAZZARDO MARTINS

**“INIBIÇÃO DA GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3
COMO NOVA ABORDAGEM NO CONTROLE DA DOR
AGUDA E CRÔNICA: ANÁLISE DOS MECANISMOS DE
AÇÃO”.**

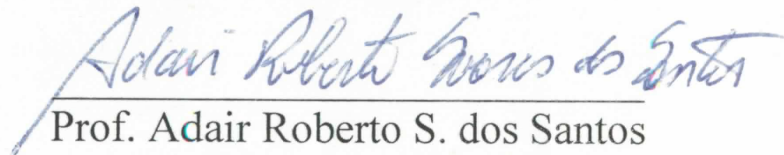
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 16 de agosto de 2013.

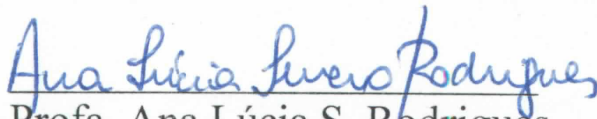


Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

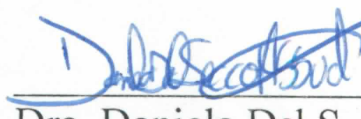
Banca Examinadora:



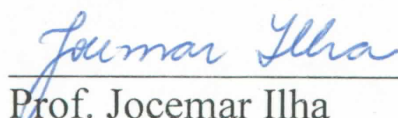
Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC



Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC



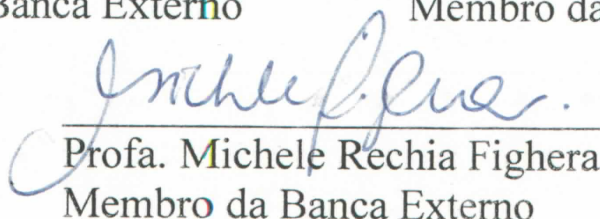
Dra. Daniela Dal S. Abbud
Membro - UFSC



Prof. Jocemar Ilha
Membro da Banca Externo



Prof. Luiz F. Freire Royes
Membro da Banca Externo



Profa. Michele Rechia Figuera
Membro da Banca Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela minha vida e pessoas que fazem parte dela.

Em especial agradeço ao meu marido Daniel Fernandes Martins, pelo companheirismo, pela vida maravilhosa que temos, pelas ideias e pelo apoio incondicional. Foi graças a um sonho seu que tive a oportunidade de cursar Mestrado e Doutorado na UFSC. Muito obrigada por demonstrar que tudo seria possível.

À minha família que me deu condições de estudar em um ambiente favorável, com muito amor, me ensinou valores que acredito serem imprescindíveis para o bom convívio.

Pela ideia inicial deste trabalho sou grata a Angelo O. Rosa e, principalmente, a Vinícius de Maria Gadotti, que nos auxiliou nos primeiros experimentos.

À todas as pessoas com as quais tive a oportunidade de realizar colaborações, aprendi muito com todos vocês: Juliana, Vanessinha, Cris Setim, Cris Baggio, Catarine, André, Ari, Bira, Catharina, Chico, Daniela, Franciane, Josiel, Laudir, Nayara e Wladmir.

Ao meu orientador Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por me aceitar em seu laboratório para realização de estágio, preparação para a prova do Mestrado e, posteriormente, Doutorado. Aprendi muito com o Senhor, obrigada pelo carinho, apoio e conversas.

Ao Professor Dr. Hamilton Emídio Duarte, pela oportunidade de assistir suas aulas de Anatomia Topográfica. És um exemplo para minha

formação, espero que um dia eu consiga transmitir o conhecimento de forma semelhante. Às Professoras Dra. Carla Gabrielli e Rosane Heizen pelos ensinamentos e aprendizado. Pela oportunidade de ministrar aulas de Anatomia Sistêmica para os cursos de Biologia e Farmácia agradeço às Professoras Doutoras Elisa C. Winkelmann Duarte, Juçara Loli de Oliveira e Mabel M. Rodríguez Cordeiro.

Ao pessoal do laboratório pela ajuda, em especial a Ana e ao Ney sempre dispostos a repassar o conhecimento que possuem.

Aos funcionários da UFSC, destacando: Nivaldo, Dona Vilma e Seu Carlos.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

RESUMO

A glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) é uma cinase serina/treonina que foi primeiramente isolada e purificada como uma enzima capaz de fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase. Dentre as diversas funções reguladas pela GSK3 a inflamação é uma das mais importantes. O presente estudo investigou o efeito do N-(4-metoxibenzil)-N0-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)uréia (AR-A014418), um inibidor específico da GSK3, na nocicepção aguda e crônica e os mecanismos neurobiológicos envolvidos nesse efeito. O pré-tratamento dos animais com AR-A014418 (0,01-1 mg/kg, intraperitoneal, i.p., 30 minutos antes) diminuiu a nocicepção aguda induzida pelo ácido acético e a inflamatória (segunda fase) causada pela formalina, sem afetar a nocicepção neurogênica (primeira fase) deste teste; e o AR-A014418 (0,1-10 µg/sítio) co-injetado intraplantarmente (i.pl.) com a formalina também inibiu a segunda fase deste modelo. Além disso, o AR-A014418 (0,1-100 ng/sítio) injetado intratecalmente (i.t.) foi capaz de diminuir a nocicepção aguda nas duas fases do teste da formalina. A co-administração de AR-A014418 intratecalmente (10 ng/sítio) reduziu a nocicepção induzida pelo glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA); (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-ácido dicarboxílico (trans-ACPD), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β). Em outro grupo experimental, o AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) também diminuiu a nocicepção crônica, caracterizada pela hiperalgesia ao estímulo mecânico (filamento de von Frey) e térmico ao frio (placa fria) causada pela ligação parcial do nervo isquiático (PSNL), um modelo de dor neuropática. O efeito antinociceptivo do AR-A014418 foi

significativamente reduzido pelo pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., um inibidor da síntese de serotonina) e AMPT (100 mg/ kg, i.p., um inibidor da tirosina hidroxilase), mas não pela administração de L-arginina (600 mg/kg, i.p., um precursor do óxido nítrico). Além disso, o AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) preveniu o aumento dos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β na medula espinal de camundongos submetidos à PSNL. Finalmente, a administração de AR-A014418 (0,1-1 mg/kg, i.p.) não afetou a atividade locomotora dos animais. Coletivamente, estes resultados fornecem evidências de que o AR-A014418, administrado pelas vias sistêmica, periférica e central; diminuiu a nocicepção aguda e crônica em camundongos. O mecanismo da ação antinociceptiva do AR-A014418 está relacionado, direta ou indiretamente, com a inibição dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos e/ou pela inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), bem como pela ativação de vias de controle inibitório descendentes da dor (serotoninérgicas e catecolaminérgicas). Assim, o presente trabalho demonstra que a inibição da GSK3 pode ser um novo e interessante alvo farmacológico no tratamento da dor aguda e crônica.

Palavras-chave: GSK3, AR-A014418, nocicepção, glutamato, citocinas.

ABSTRACT

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase that was first isolated and purified as an enzyme capable of phosphorylating and inactivating the enzyme glycogen synthase. Among the diverse functions that are regulated by GSK3, inflammation has recently emerged as one of the most important. The present study investigated the antinociceptive effects of N-(4-methoxybenzyl)-N'-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)urea (AR-A014418), a specific inhibitor of GSK3 in acute and chronic nociception and the neurobiological mechanisms involved. A 30-minute pretreatment with AR-A014418 (0.01-1 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) inhibited the nociception induced by an i.p. injection of acetic acid and also decreased the late (inflammatory) phase of formalin-induced licking, without affecting the responses of the first (neurogenic) phase. In a different set of experiments, AR-A014418 (0.1-10 µg/site) coinjected intraplantarly (i.pl.) with formalin inhibited the late phase of formalin-induced nociception. Furthermore, AR-A014418 intrathecal (i.t.) administration (0.1-100 ng/site) inhibited both phases of formalin-induced licking. In addition, AR-A014418 coinjection (i.t.) inhibited the nociception induced by glutamate, NMDA, (±)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interleukin-1beta (IL-1 β). AR-A014418 also presented an antihyperalgesic effect on the partial ligation of the sciatic nerve (PSNL), a neuropathic pain model. AR-A014418 administered i.p. (0.3 mg/kg) inhibited mechanical (von Frey filament) and cold hyperalgesia (cold plate) induced by PSNL. Pre-administration of PCPA (100 mg/kg, i.p., inhibitor of serotonin synthesis) and AMPT

(100 mg/ kg, i.p., inhibitor of tyrosine hydroxylase), but not L-arginine (600 mg/kg, i.p., a nitric oxide precursor), significantly reduced the mechanical anti-hyperalgesia elicited by AR-A014418 (0.3 mg/kg, i.p.). Furthermore, the administration of AR-A014418 (0,3 mg/kg) significantly prevented the increase of TNF- α and IL-1 β levels. Finally, intraperitoneal administration of AR-A014418 (0.1-1 mg/kg, i.p.) did not affect locomotor activity in the open-field test. Collectively, these results provide convincing evidence that AR-A014418, given by peripheral, systemic, and central routes, produces antinociception in acute and chronic pain models. The AR-A014418-dependent antinociceptive effects were induced by modulation of the glutamatergic system through metabotropic and ionotropic receptors and the inhibition of the proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β), as well as increases in serotonergic and catecholaminergic pathways. The present study suggests that the inhibition of GSK3 may be a novel pharmacological target for the treatment of acute and chronic pain.

Key words: GSK3, AR-A014418, nociception, glutamate, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Neurônio aferente primário.....	23
Figura 2 -	Nocicepção.....	25
Figura 3 -	Principais componentes funcionais dos neurônios glutamatérgicos.....	27
Figura 4 -	Classificação dos receptores e transportadores para o glutamato.....	28
Figura 5 -	Receptor NMDA.....	29
Figura 6 -	Representação dos receptores metabotrópicos para o glutamato.....	32
Figura 7 -	Representação esquemática do circuito modulatório da dor.....	34
Figura 8 -	Ilustração da lesão periférica e do terminal periférico e central do neurônio aferente primário	36
Figura 9 -	Influência das monoaminas na nocicepção no corno dorsal da medula espinal.....	39
Figura 10 -	Mecanismos da sensibilização central e periférica na dor neuropática.....	53
Figura 11 -	Representação esquemática da GSK3 α e GSK3 β de mamíferos.....	58
Figura 12 -	Mecanismos que regulam as ações da GSK3.....	61
Figura 13 -	A GSK3 é um importante componente de numerosas doenças inflamatórias.....	64
Figura 14 -	Estrutura molecular do AR-A014418.....	68

Figura 15 -	Esquema demonstrando o experimento das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	75
Figura 16 -	Esquema demonstrando a administração intraperitoneal do AR-A014418 ou veículo no teste de nocicepção induzido pela formalina.....	77
Figura 17 -	Esquema demonstrando a administração sistêmica do NP031115 ou veículo no teste de nocicepção induzido pela formalina.....	78
Figura 18 -	Esquema demonstrando a administração conjunta de AR-A014418 ou veículo e formalina na pata posterior de camundongos.....	80
Figura 19 -	Esquema demonstrando a administração no espaço subaracnóideo lombar de AR-A014418 ou veículo 15 minutos antes da injeção de formalina na pata de camundongos.....	81
Figura 20 -	Esquema da co-administração de AR-A014418 ou veículo e agonistas dos receptores glutamatérgicos ou citocinas pró-inflamatórias no espaço subaracnóideo.....	84
Figura 21 -	Figura demonstrando o modelo da ligação parcial do nervo isquiático.....	87
Figura 22 -	Esquema demonstrando como foi realizada a avaliação ao estímulo mecânico.....	89
Figura 23 -	Esquema demonstrando a curva dose-resposta do AR-A014418 no teste de hiperalgesia ao estímulo mecânico.....	90

Figura 24 -	Esquema de tratamento diário com AR-A014418 ou veículo após a PSNL.....	91
Figura 25 -	Esquema dos experimentos realizados para mensuração da hiperalgesia ao estímulo ao calor e ao frio.....	93
Figura 26 -	Experimento realizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.....	95
Figura 27 -	Experimento realizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do AR-A014418 em reduzir a nocicepção.....	97
Figura 28 -	Avaliação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.....	99
Figura 29 -	Dosagem do nível de citocinas espinais.....	101
Figura 30 -	Efeito do pré-tratamento i.p. com o AR-A014418 na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	105
Figura 31 -	Efeito do AR-A014418 administrado intraperitonealmente na nocicepção induzida pela formalina.....	106
Figura 32 -	Efeito do NP031115 administrado intraperitonealmente na nocicepção induzida pela formalina.....	107
Figura 33 -	Efeito do AR-A014418 co-administrado intraplantarmente com a formalina.....	109

Figura 34 -	Efeito da administração subaracnóidea de AR-A014418 na nocicepção induzida pela formalina....	110
Figura 35 -	Efeito da co-administração intratecal de AR-A014418 com agonistas de receptores glutamatérgicos ou citocinas pró-inflamatórias.....	113
Figura 36 -	Efeito do AR-A014418 na hiperalgesia ao estímulo mecânico no modelo da PSNL.....	116
Figura 37 -	Efeito do AR-A014418 na hiperalgesia ao estímulo térmico no modelo da PSNL.....	118
Figura 38 -	Participação do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.....	120
Figura 39 -	Participação do sistema catecolaminérgico no efeito antinociceptivo do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.....	121
Figura 40 -	Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico na diminuição da nocicepção ocasionada pelo AR-A014418.....	122
Figura 41 -	Efeito do AR-A014418 sobre a concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias na medula espinal de camundongos submetidos a PSNL.....	124
Figura 42 -	Participação do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do AR-A014418.....	132
Figura 43 -	Participação das citocinas pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo do AR-A014418.....	139
Figura 44 -	Participação das catecolaminas no efeito antinociceptivo do AR-A014418.....	151

Figura 45 -	Influência das citocinas sobre as enzimas do metabolismo do triptofano- serotonina-cinurenina na depressão.....	156
Figura 46 -	Desenho esquemático que sugere os mecanismos antinociceptivos do AR-A014418.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPT- α -metil- ρ -tirosina;

AR-A014418- N-(4-Metoxibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)uréia;

AUC- área sob a curva;

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais;

CGRP- peptídeo relacionado ao gene da calcitonina;

CNS- sistema nervoso central;

DI₅₀- doses necessárias para reduzir a resposta nociceptiva em 50%;

DMSO- dimetilsulfóxido

DRG- gânglio da raiz dorsal;

E.P.M.- erro padrão da média;

GABA- ácido γ - aminobutírico;

Gi- proteínas G inibitórias;

Gln- glutamina;

Glu- glutamato;

GSK3-glicogênio sintase cinase 3;

5-HT- 5-hidroxitriptamina; serotonina;

IASP- Associação Internacional para o Estudo da Dor;

IL- interleucina;

KA- cainato;

KCC2- transportador potássio-cloreto;

L-NOARG- N^ω-nitro-L-arginina;

MAPK- proteína cinase ativada por mitógeno;

mGLURs- receptores metabotrópicos para o glutamato;

NE- norepinefrina;

NMDA- N-metil-D-aspartato;

NO- óxido nítrico;

NP031115- 4(4-cloro-fenil)-2-metil-[1,2,4]tiadiazolidina-3,5-diona;

PKA- proteína cinase A;

PKC- proteína cinase C;

PSNL- ligação parcial do nervo isquiático;

SPA- antinocicepção produzida por estimulação

SP- substância P;

TG- gânglio do nervo trigêmeo;

TNF- α - fator de necrose tumoral alpha;

trans-ACPD- (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3- ácido dicarboxílico;

TRPM8- canal TRP sensível ao frio e ao mentol;

TRPV1- receptores vanilóides.

SUMÁRIO

1 DESENVOLVIMENTO	21
1.1 NOCICEPÇÃO E DOR.....	21
1.1.1 Neurotransmissão glutamatérgica	26
1.1.1.1 Receptores NMDA.....	29
1.1.1.2 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos sensíveis ao trans-ACPD.....	30
1.1.2 Sistemas endógenos de controle da dor	33
1.1.2.1 Vias modulatórias descendentes serotoninérgicas.....	37
1.1.2.2 Vias modulatórias descendentes noradrenérgicas.....	39
1.1.2.3 Vias modulatórias descendentes dopaminérgicas.....	41
1.1.3 Modelos de nocicepção aguda	42
1.1.3.1 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	42
1.1.3.2 Nocicepção induzida pela formalina.....	43
1.1.3.3 Nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato, NMDA, trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β	44
1.1.4 Nocicepção crônica	45
1.1.4.1 Prevalência da dor persistente.....	46
1.1.4.2 Dor neuropática.....	47
<i>1.1.4.2.1 Fisiopatologia da dor neuropática</i>	48
<i>1.1.4.2.2 Ligação parcial do nervo isquiático</i>	56
1.2 GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3.....	57
1.3 AR-A014418.....	67
1.4 JUSTIFICATIVA.....	71
1.5 OBJETIVOS.....	72
1.5.1 Objetivo geral	72

1.5.2 Objetivos específicos.....	72
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1 ANIMAIS.....	73
2.2 MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA.....	74
2.2.1 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	74
2.2.2 Nociceção induzida pela formalina.....	76
2.2.3 Nociceção induzida pela administração no espaço subaracnóideo de glutamato, NMDA, Trans-ACPD, TNF-α e IL-1β.....	83
2.2.4 Análise estatística dos experimentos de nociceção aguda.....	85
2.2.5 Substâncias utilizadas nos experimentos de nociceção aguda.....	85
2.3 MODELO DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA.....	86
2.3.1 Ligação parcial do nervo isquiático (PSNL).....	86
2.3.1.1 Mensuração da hiperalgesia ao estímulo mecânico.....	88
2.3.1.2 Mensuração da hiperalgesia ao estímulo térmico.....	92
2.3.1.2.1 Teste da placa quente.....	92
2.3.1.2.2 Teste da placa fria.....	92
2.3.1.3 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nociceção.....	94
2.3.1.4 Envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nociceção.....	96
2.3.1.5 Participação da via do óxido nítrico no efeito do AR-A014418 em reduzir a nociceção.....	97
2.3.1.6 Mensuração dos níveis de citocinas na medula espinal.....	99
2.3.1.7 Avaliação da atividade locomotora.....	101

2.3.1.8	Análise estatística dos experimentos de nociceção crônica....	102
2.3.1.9	Substâncias utilizadas nos experimentos de nociceção crônica.....	102
3	RESULTADOS	104
3.1	AR-A014418 REDUZ AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	104
3.2	ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE AR-A014418 OU NP031115 DIMINUI A NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA.....	105
3.3	SÍTIO PERIFÉRICO ESTÁ ENVOLVIDO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AR-A014418.....	108
3.4	SÍTIO ESPINAL ESTÁ ENVOLVIDO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AR-A014418.....	110
3.5	AR-A014418 REDUZ NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS OU DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	111
3.6	AR-A014418 DIMINUI A HIPERALGESIA AO ESTÍMULO MECÂNICO INDUZIDA PELA PSNL.....	114
3.7	AR-A014418 REDUZ A HIPERALGESIA AO ESTÍMULO TÉRMICO INDUZIDA PELA PSNL.....	117
3.8	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ANTINOCICEÇÃO INDUZIDA PELO AR-A014418.....	119
3.9	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO NA ANTINOCICEÇÃO INDUZIDA PELO AR-A014418.....	120
3.10	ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO NA ANTINOCICEÇÃO OCASIONADA PELO AR-A014418.....	121

3.11 AR-A014418 DIMINUI OS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO.....	123
3.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	125
4 DISCUSSÃO	126
4.1 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3.....	126
4.2 ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3.....	133
4.3 ENVOLVIMENTO DAS CATECOLAMINAS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3.....	140
4.3.1 GSK3 e serotonina	140
4.3.2 GSK3 e dopamina	143
4.3.3 GSK3 e norepinefrina	149
4.4 RELAÇÃO ENTRE CATECOLAMINAS, GLUTAMATO E CITOCINAS.....	152
5 CONCLUSÕES	160
6 PERSPECTIVAS	162
7 ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS RELACIONADOS COM A TESE	163
8 ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	163
REFERÊNCIAS	166

1 DESENVOLVIMENTO

1.1 NOCICEPÇÃO E DOR

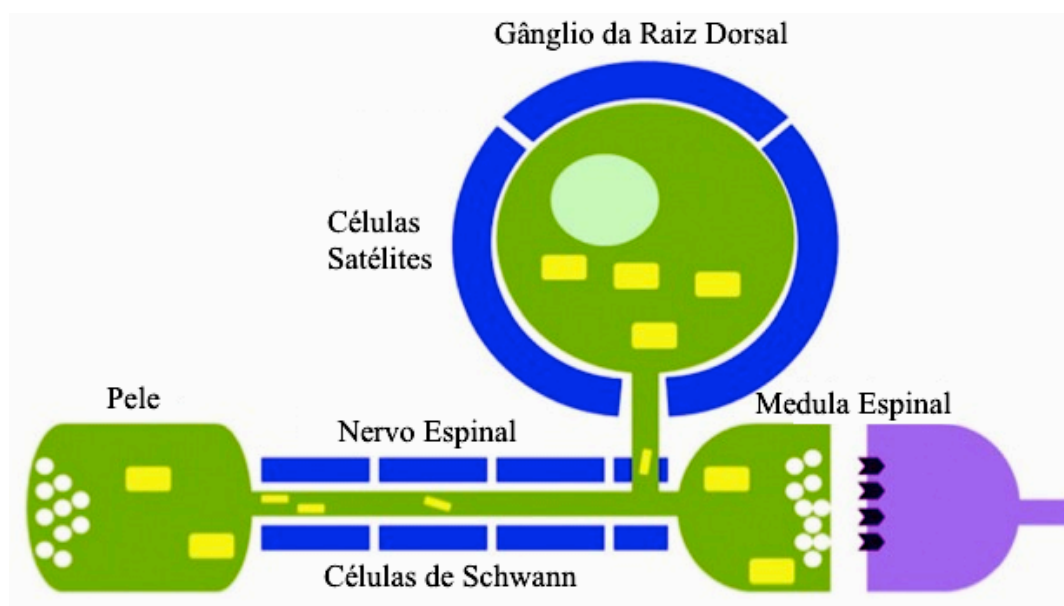
É importante a distinção conceitual entre nocicepção e dor quando se utiliza modelos animais como ferramenta de estudo. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a nocicepção é definida como “o processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo”, enquanto a dor é “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (LOESER; TREEDE, 2008).

Desta forma, a nocicepção inclui os mecanismos pelos quais os estímulos são detectados pela parte periférica do sistema nervoso, codificados, transmitidos, e inconscientemente modulados pelo sistema nervoso. A detecção é assegurada pelos transdutores moleculares específicos presentes em neurônios nociceptivos (BARROT, 2012). Em contraste, a dor é uma experiência consciente que requer participação cortical e informação aversiva da nocicepção. É uma experiência complexa e subjetiva, com um forte componente afetivo, acompanhado por elementos sensoriais-discriminativos, autonômicos e cognitivos. Embora a nocicepção e a dor pareçam intimamente ligadas, evidências clínicas provaram que uma pode ser dissociada da outra. Em pacientes, a dor é avaliada e quantificada pela expressão verbal, que não é possível em roedores. Assim, o que é referido como testes de dor em roedores são, de fato, testes nociceptivos; e a avaliação de dor em modelos

animais ainda permanece como um desafio nesta área (BARROT, 2012).

A informação sensorial periférica é transmitida à medula espinal e ao tronco encefálico pelos neurônios aferentes primários (Figura 1). Essas células desenvolvem-se inicialmente como células bipolares e mais tarde tornam-se células pseudo-unipolares (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2003). As células ou neurônios bipolares têm um soma em forma oval, que origina dois processos: um dendrito que transmite a informação proveniente da periferia do corpo e um axônio que leva tal informação até o sistema nervoso central. Os neurônios que transmitem o tato, a pressão e a dor para a medula espinal ou tronco encefálico são variantes de células bipolares, chamadas de células pseudo-unipolares (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2003). Essas células desenvolvem-se inicialmente como células bipolares, mais tarde, os dois processos da célula se fundem para formar um axônio que emerge do corpo celular. O axônio então divide-se em dois; um ramo dirige-se à periferia (aos receptores sensoriais na pele, nas articulações e no músculo), e o outro à medula espinal ou tronco encefálico (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2003). Os corpos celulares dos neurônios pseudo-unipolares se localizam no gânglio da raiz dorsal (DRG) ou gânglio do nervo trigêmeo (TG) (WOOLF; MA, 2007; MILLER et al., 2011).

Figura 1 - Neurônio aferente primário.



Legenda: Neurônios nociceptivos responsivos a estímulos nocivos apresentam terminações nervosas livres distribuídas no tecido alvo, por exemplo, a pele. O corpo do neurônio se localiza no gânglio da raiz dorsal (DRG) ou no gânglio do nervo trigêmeo (TG). Esses neurônios armazenam substâncias neurogênicas, tais como: substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato, em vesículas (círculos brancos) e as liberam na periferia e na medula espinal, quando estimulados. A glutaminase, a enzima que atua na síntese do glutamato, é produzida no corpo celular e é translocada para a mitocôndria (retângulos amarelos) e enviada para os terminais nervosos. O glutamato, por sua vez, pode ser sintetizado nos terminais nervosos periféricos e espinais.

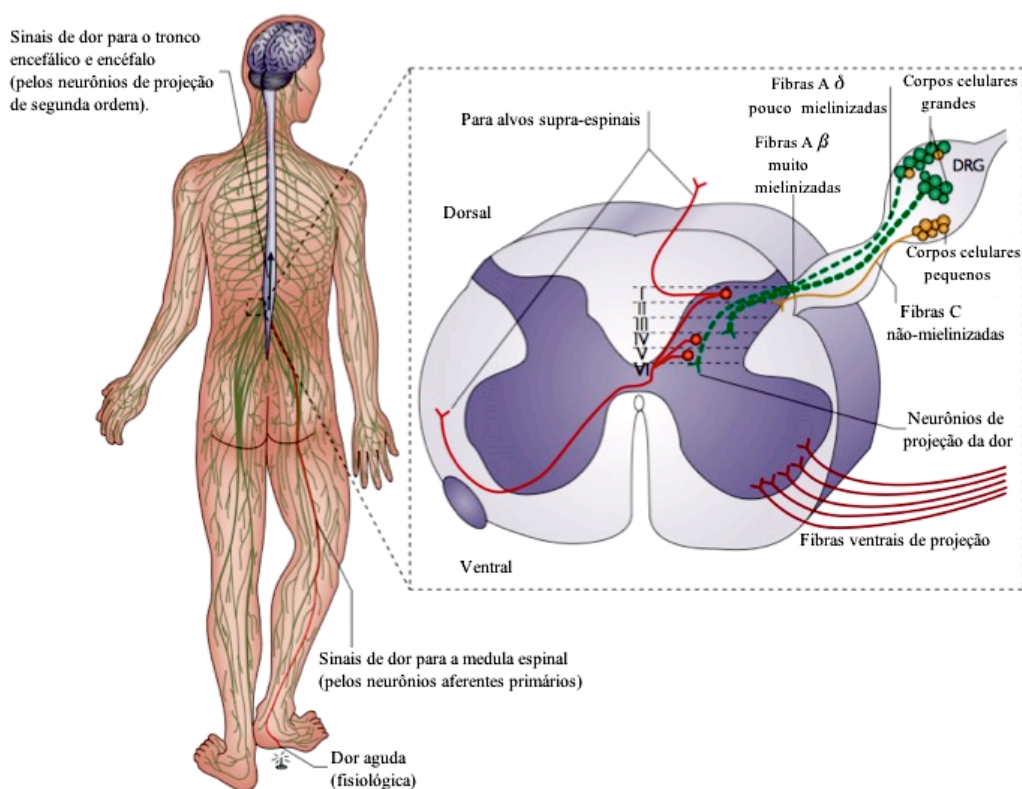
Fonte: adaptada de Miller et al. (2011).

Os neurônios aferentes primários podem ser classificados em duas categorias amplas. Em uma delas os neurônios conduzem sensações proprioceptivas, vibratórias ou discriminativas associadas a receptores celulares periféricos, tais como: fusos neuromusculares, corpúsculos de Meissner e corpúsculos de Pacini. No subtipo “A” os corpos celulares possuem grandes diâmetros, localizados no DRG e TG, e possuem axônios de grande diâmetro, altamente mielinizados e de condução rápida, fibras $A\alpha$ e $A\beta$. A segunda categoria, subtipo “B”, é composta por neurônios que transmitem informação térmica inócua ou

informação nociva e possuem fibras distribuídas como terminações nervosas livres nos tecidos periféricos. Os corpos celulares (DRG e TG) podem variar no diâmetro de grande a pequeno e possuir axônios mielinizados e não mielinizados, constituindo as fibras nervosas do tipo A β , A δ e C (MILLER et al., 2011).

Os neurônios aferentes primários responsivos a estímulos de caráter nocivo são denominados nociceptores e são classificados em duas categorias gerais. Os nociceptores cutâneos A δ e A β possuem fibras pouco a altamente mielinizadas, respectivamente, e são responsáveis pela sensação de dor rápida e aguda, enquanto que os nociceptores C possuem fibras não-mielinizadas e produzem uma sensação de dor tardia (Figura 2) (FANG et al., 2005; WILLIS, 2007). Com relação à responsividade sensorial e à condutância, estes neurônios liberam substâncias na periferia que produzem inflamação neurogênica, característico desta inflamação é a liberação de neuropeptídeos, como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que possuem ações pró-inflamatórias, tais como: vasodilatação, extravasamento de plasma e estimulação de células teciduais residentes e imunes (O'CONNOR et al., 2004). Além disso, os terminais nervosos periféricos liberam glutamato (principal neurotransmissor excitatório), causando sensibilização do tecido local e dos terminais aferentes vizinhos (SKERRY; GENEVER, 2001; CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2008). A capacidade das terminações nervosas periféricas de liberarem glutamato após tipos específicos de estimulação indica que os neurônios são glutamatérgicos e podem participar do ciclo metabólico periférico da glutamina (MILLER; RICHARDS; KRIEBEL, 2002; MILLER et al., 2011).

Figura 2 - Nociceção.



Legenda. A sinalização de dor é transmitida para o corno dorsal da medula espinal através dos nociceptores. A dor nociceptiva, como uma alfinetada no pé, leva à liberação de transmissores da dor pelos terminais aferentes primários que se projetam para as lâminas I, IV e V do corno dorsal da medula espinal. É notável que as fibras A β , A δ e C se projetam para as lâminas II-VI em menor grau, mas podem alterar a atividade dos neurônios de projeção à dor. Entretanto, posteriormente à lesão tecidual e inflamação da pele, os sinais de inflamação crônica são liberados pelas células circundantes no terminal nervoso periférico e levam à sensibilização dos nociceptores. Tais fatores incluem, mas não estão limitados a: adenosina, e seus compostos mono ou polifosforilados (monofosfato de adenosina [AMP], difosfato de adenosina [ADP] e trifosfato de adenosina [ATP]), bradicinina, glutamato, histamina, IL-1 (interleucina-1), IL-6, fator de crescimento do nervo (NGF), fator de ativação plaquetária (PAF), prostaglandina E2, prótons, serotonina (5-HT), SP, fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A sinalização nociceptiva do DRG é então retransmitida ao corno dorsal da medula espinal, tronco encefálico e encéfalo, onde ocorre a experiência dolorosa. O desenho esquemático à esquerda mostra uma secção transversal da medula espinal incluindo o corno dorsal da medula espinal e o DRG. O DRG contém os neurônios sensoriais pseudo-unipolares. Os corpos celulares dos neurônios nociceptivos se localizam no DRG e são amplamente classificados nos tipos: grandes e pequenos. Os estudos de marcação imunoistoquímica mostram que as fibras C de condução lenta e as fibras A δ têm corpos celulares de pequeno diâmetro, enquanto que as fibras A β com velocidade de condução mais rápida, possuem corpos celulares maiores.

Fonte: adaptada de Milligan e Watkins (2009).

Levando em consideração a importância do glutamato na periferia e na transmissão sináptica entre o neurônio aferente primário e os neurônios de segunda ordem (Figuras 1 e 2), analisaremos alguns detalhes essenciais desse neurotransmissor.

1.1.1 Neurotransmissão glutamatérgica

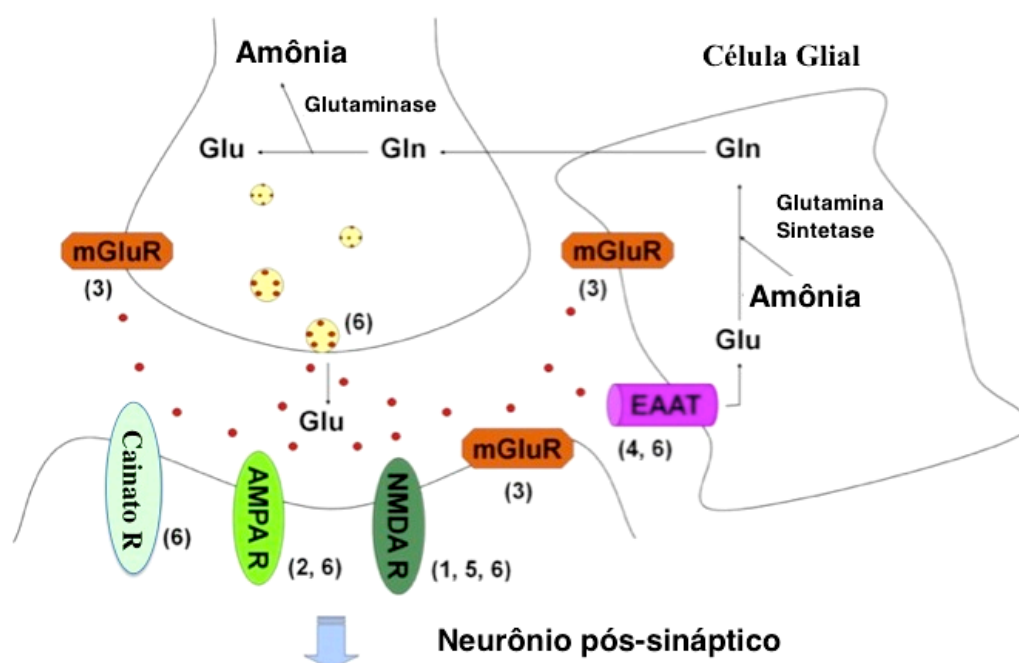
Embora tenha-se conhecimento há mais de 75 anos que o glutamato exerce efeitos na parte central do sistema nervoso, somente em 1984 ele foi realmente considerado como um neurotransmissor, preenchendo todos os critérios necessários para um neurotransmissor clássico (FONNUM, 1984). O glutamato foi originalmente estudado por sua função metabólica no sistema nervoso central (CNS) (KREBS, 1935), foi encontrado em numerosos compartimentos intracelulares, incluindo o citosol e a mitocôndria, em todos os tipos celulares existentes no CNS. Atualmente sabe-se que os níveis de glutamato extracelular são altamente regulados, sendo considerado o principal neurotransmissor excitatório no CNS dos mamíferos. Este controle da neurotransmissão glutamatérgica é um processo que consome energia, requerendo altos níveis de glicose e consumo de oxigênio (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

O glutamato liberado pelos neurônios pré-sinápticos pode interagir com receptores para o glutamato pós-sinápticos, incluindo cainato, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Além disso, ele pode interagir com receptores metabotrópicos para o glutamato (mGLURs) em neurônios pré- e pós-sinápticos (HASHIMOTO, 2011). O glutamato liberado é

captado pelas células gliais através de transportadores para aminoácidos excitatórios (EAATs), e convertido a glutamina, que é transportada de volta aos neurônios pré-sinápticos sendo reconvertida a glutamato (HASHIMOTI, 2009; 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Principais componentes funcionais dos neurônios glutamatérgicos.

Neurônio pré-sináptico glutamatérgico



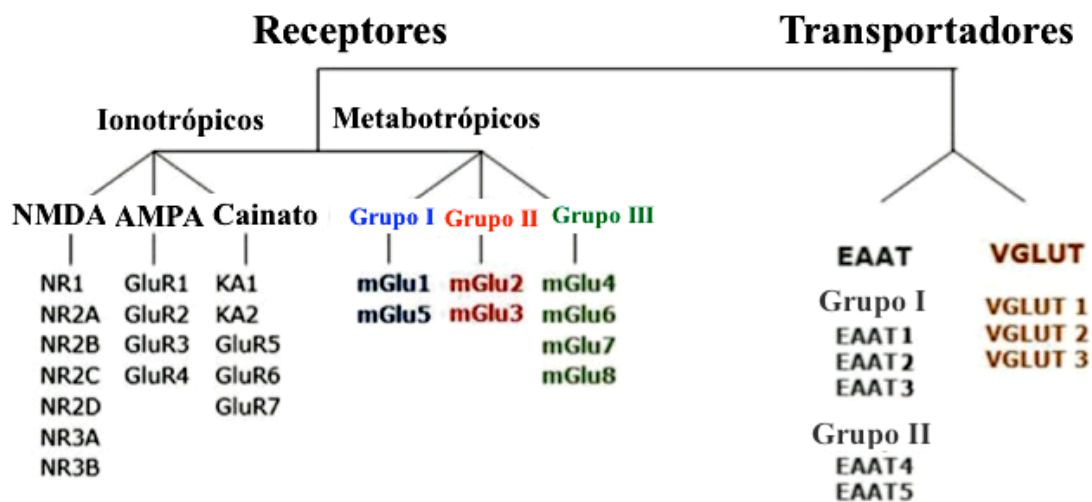
Legenda: A glutaminase hidrolisa a glutamina à glutamato e amônia em neurônios pré-sinápticos. O glutamato é liberado na fenda sináptica e estimula os receptores glutamatérgicos (receptores AMPA, cainato, NMDA e metabotrópicos) pré-sinápticos, pós-sinápticos e nas células gliais. O glutamato é captado pelos EAATs encontrados nas células gliais. A glutamina sintetase converte glutamato e amônia à glutamina, que é transportada para os neurônios pré-sinápticos. AMPAR, receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido propiônico isoxazole; NMDAR, receptor N-metil-D-aspartato; mGluR, receptor metabotrópico para o glutamato; EAAT, transportador de aminoácido excitatório; Gln, glutamina; Glu, glutamato.

Fonte: adaptada de Tokita, Yamaji e Hashimoto (2012).

Conforme informações supracitadas os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em 2 categorias: receptores

ionotrópicos e receptores metabotrópicos (Figura 4). Os receptores ionotrópicos para o glutamato são canais iônicos por onde passam cátions (Ca^{2+} , Na^{+}), sendo que mudanças conformacionais abrem o canal em resposta à ligação do agonista. Os receptores metabotrópicos, por outro lado, ativam ou inibem o sistema de mensageiros secundários através de proteínas G (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

Figura 4 - Classificação dos receptores e transportadores para o glutamato.



Fonte: adaptada de Osikowicz, Mika, Przewlocka (2013).

Os receptores ionotrópicos para o glutamato formam complexos tetraméricos de subunidades heteroméricas/individuais. Uma das características mais intrigantes dos receptores ionotrópicos para o glutamato é a diversidade de propriedades dos canais baseada na composição e padrão de expressão de suas subunidades (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

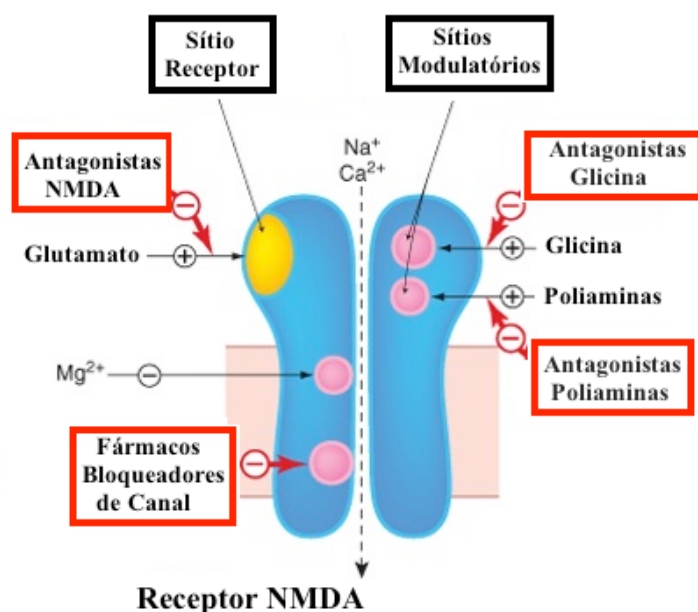
Como neste trabalho foram utilizados somente o agonista para o receptor ionotrópico NMDA e o agonista para os receptores

metabotrópicos dos grupos I e II, (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-ácido dicarboxílico (trans-ACPD) suas propriedades serão destacadas.

1.1.1.1 Receptores NMDA

Os receptores para NMDA possuem alta afinidade pelo glutamato ($EC_{50}=1\mu M$). Três famílias de subunidades do receptor NMDA foram identificadas: (1) NR1, (2) NR2A-D e (3) NR3A-B. Os receptores do tipo NMDA estão entre os mais altamente regulados no encéfalo de mamíferos e o único em requerer co-agonistas para ativação. Foram identificados pelo menos seis sítios (locais) de ligação que regulam a probabilidade de abertura do canal iônico, locais para dois co-ligantes obrigatórios (glutamato e glicina), poliaminas e cátions (Mg^{2+} , Zn^{2+} e H^+) (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012) (Figura 5).

Figura 5 – Receptor NMDA .



Legenda: Principais locais para ação de fármacos no receptor NMDA.

Fonte: adaptada de Rang et al. (2007).

Além disso, o Mg^{2+} atua como um “bloqueador do poro” dependente de voltagem que evita o fluxo de cátions (NOWAK et al., 1984). O Zn^{2+} é um importante modulador alostérico dos receptores para o glutamato do subtipo NMDA (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

1.1.1.2 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos sensíveis ao trans-ACPD

Diferente dos receptores ionotrópicos para o glutamato que dependem do fluxo de cátions, os receptores metabotrópicos para o glutamato exercem seus efeitos através do recrutamento e ativação de proteínas G heterotriméricas intracelulares e vias de transdução de sinal *downstream*. Como todos os receptores acoplados à proteína G, os receptores metabotrópicos para o glutamato possuem sete domínios transmembranares, com um domínio N-terminal extracelular e um domínio C terminal intracelular (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

Os receptores metabotrópicos para o glutamato (exceto o mGluR8) se localizam principalmente em locais peri-sinápticos e extra-sinápticos em neurônios e células gliais e modulam a atividade e a plasticidade sinápticas (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

Já foram identificados oito tipos de receptores metabotrópicos para o glutamato (mGluR1-8), que foram subdivididos em três grupos funcionais com base na homologia de aminoácidos, ligação de agonista e ativação das cascatas de transdução de sinal (KIM et al., 2008). Os receptores metabotrópicos para o glutamato do grupo I consistem dos

mGluR1 e mGluR5. Eles causam seus efeitos *downstream* por dois mecanismos: (1) fosfolipase C, através do inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que libera Ca^{2+} dos estoques intracelulares e (2) diacilglicerol (DAG), que estimula a proteína cinase C. Os receptores metabotrópicos para o glutamato do tipo II (mGluR2 e mGluR3) e os do grupo III (mGluR4-8) estão acoplados a proteínas G inibitórias (Gi) que diminuem o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular através da inibição da via adenilato ciclase/proteína cinase A (PKA) (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

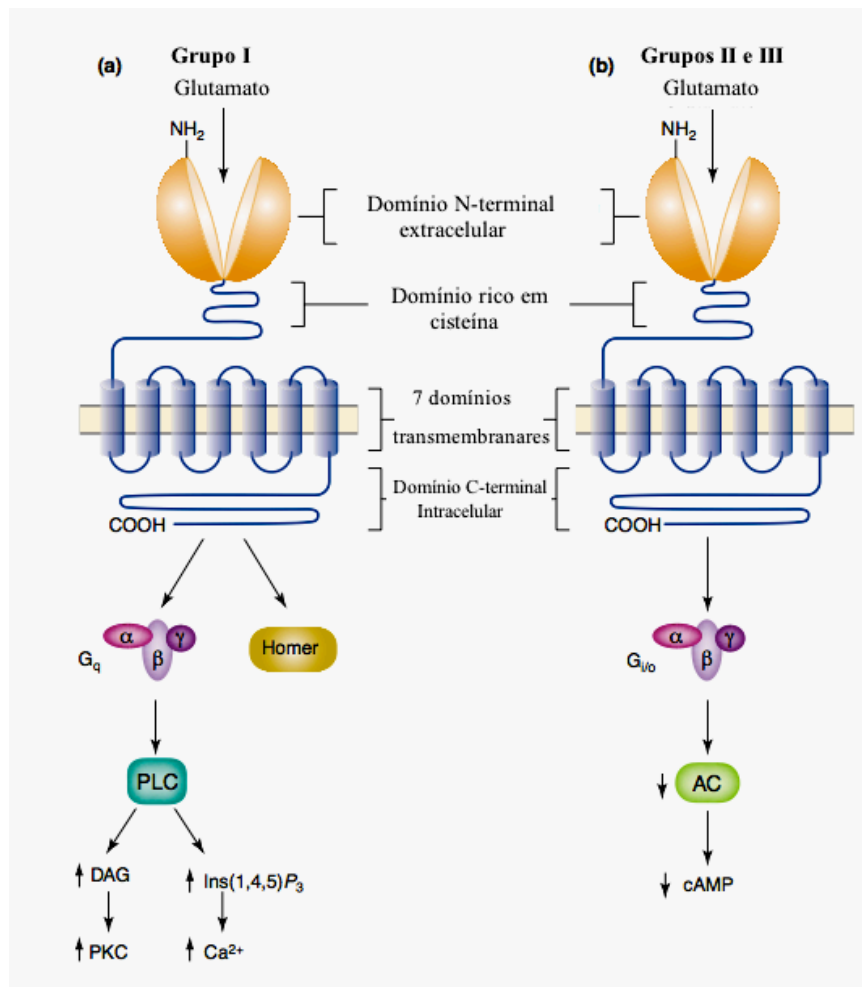
De maneira semelhante a ativação dos receptores ionotrópicos, o glutamato ativa os receptores metabotrópicos com variados graus de afinidade; agonistas, antagonistas e moduladores foram identificados e desenvolvidos para as várias classes e seus subtipos de receptores (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

Por outro lado, foi demonstrado também que a ativação pós-sináptica de receptores metabotrópicos para o glutamato modula a atividade dos canais iônicos, e, como previsto, se o agonista se liga aos receptores metabotrópicos para o glutamato, potencializa ou inibe a atividade do canal, dependendo das cascatas de transdução de sinal *downstream* ativadas (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012). Os receptores metabotrópicos para o glutamato localizados nas membranas pré-sinápticas diminuem ambas, a neurotransmissão glutamatérgica excitatória e a GABAérgica inibitória (ácido gama-aminobutírico: GABA) (PINHEIRO; MULLE, 2008).

O agonista trans-ACPD, que foi utilizado neste trabalho, é um agonista seletivo para os receptores metabotrópicos para o glutamato dos grupos I e II (EC_{50} de 2, 15, 23 e 800 μM para mGluR2, mGluR1,

mGluR5 e mGluR4, respectivamente) (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012) (Figura 6).

Figura 6. Representação dos receptores metabotrópicos para o glutamato.



Legenda: Representação esquemática dos receptores metabotrópicos para o glutamato (mGlu) dos grupos I, II e III. O Glutamato se liga no seu sítio de ligação no domínio N-terminal extracelular dos mGlu e ativa o receptor. (a) Quando ativados, os receptores mGlu do grupo I ativam proteínas Gq, compostas pelas subunidades α , β e γ . Subsequentemente, a fosfolipase C (PLC) é ativada, que catalisa a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)-trifosfato [Ins(1,4,5)P₃]. A DAG ativa a proteína cinase C (PKC), e a Ins(1,4,5)P₃ estimula a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares. (b) Quando ativados, os receptores mGlu II e III ativam proteínas Gi/o, que inibem a atividade da adenilil ciclase (AC), diminuindo as concentrações intracelulares de AMPc.

Fonte: adaptada de Kenny e Markou (2004).

Além da compreensão da importância da neurotransmissão glutamatérgica nas vias nociceptivas é necessário lembrar que o sinal aferente pode ser modulado por redes complexas que se localizam na periferia, no corno dorsal da medula espinal ou em regiões supra-espinais (TODD, 2010; HURLEY; HAMMOND, 2000; KHASABOVA et al., 2011). A seguir serão definidos alguns sistemas endógenos de controle da dor, com ênfase nos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico.

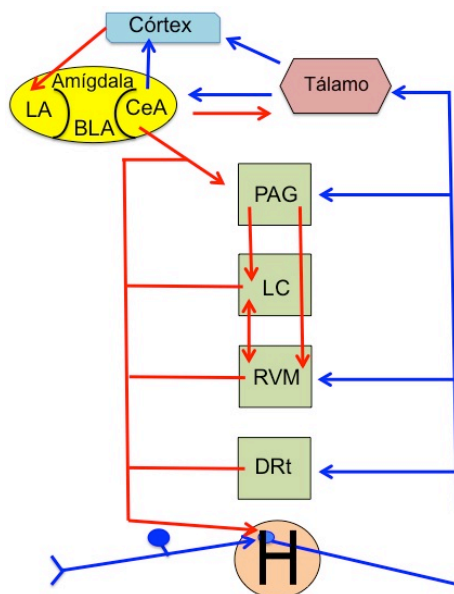
1.1.2 Sistemas endógenos de controle da dor

Evidências dos mecanismos modulatórios da dor tiveram origem a partir de observações de Henry K. Beecher em 1946, onde ele observou que os soldados tinham uma atenuação da dor sentida em situações de combate (BEECHER, 1946). Posteriormente, foi observado também que a sensibilidade a dor estava alterada em atletas que sofreram lesões durante as competições (BINGEL; TRACEY, 2008).

A existência de um mecanismo endógeno que diminui a dor através de uma rede inibitória é aceita atualmente. A modulação (facilitação ou inibição) da dor existe na forma de um circuito modulatório da dor, com aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rACC), se dirige para a região da substância cinzenta periaquedutal (PAG), e com eferências da PAG para o bulbo. Os neurônios que se localizam no núcleo magno da rafe e no núcleo reticular gigantocelular, que estão incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM), se projetam para a medula espinal (corno dorsal) para, direta ou indiretamente, aumentar ou

diminuir o tráfego nociceptivo, modificando a experiência da dor (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010) (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática do circuito modulatório da dor.

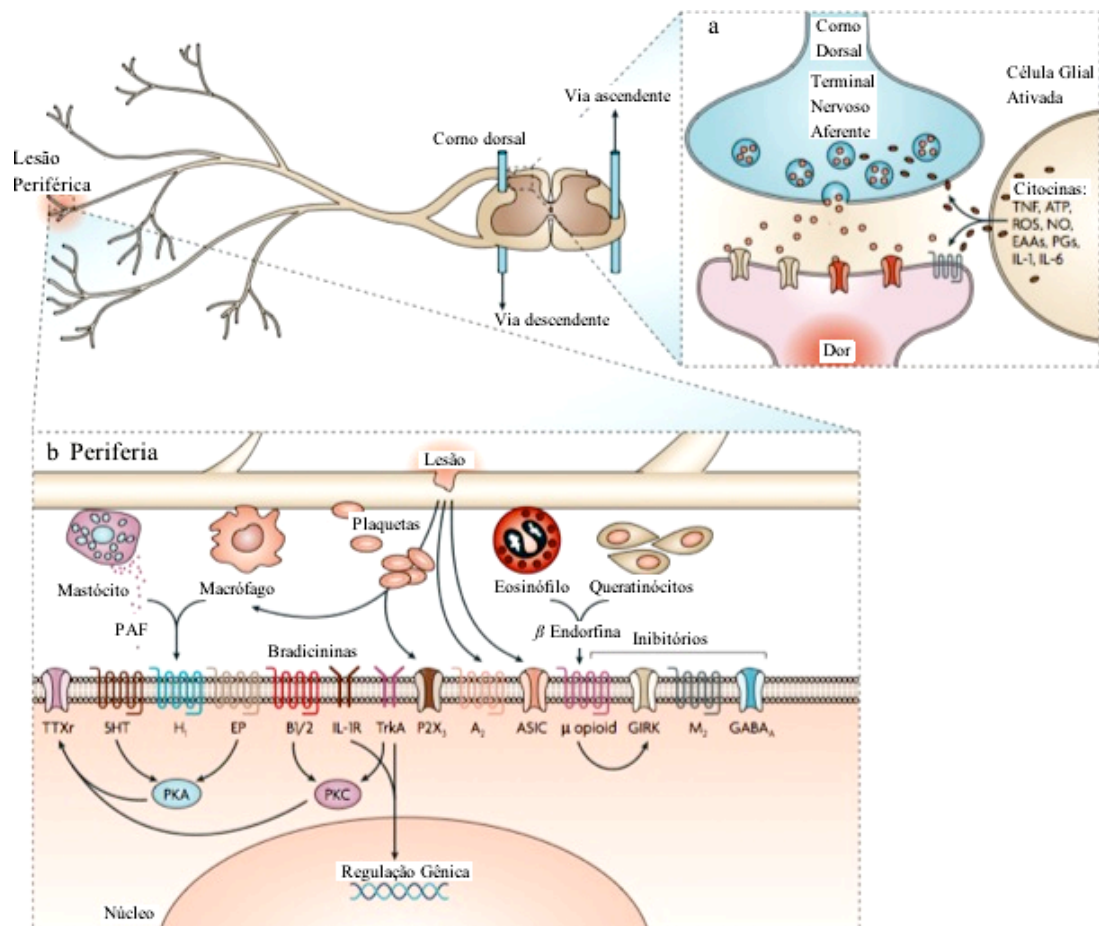


Legenda: As aferências nociceptivas chegam ao corno dorsal da medula espinal pelas fibras aferentes primárias que realizam sinapses com os neurônios de transmissão. As projeções ascendentes têm como alvo o tálamo, e projeções colaterais se dirigem para os núcleos mesencefálicos (incluindo o DRt [núcleo reticular dorsal], o RVM [bulbo ventromedial rostral] e a PAG [substância cinzenta periaquedutal]). As projeções rostrais do tálamo têm como alvo o córtex e a amígdala. O CeA [núcleo central da amígdala] recebe aferências nociceptivas do tronco encefálico e medula espinal. Aferências do tálamo e córtex chegam na amígdala lateral (LA) e basolateral (BLA). O CeA envia eferências para o córtex e tálamo onde as percepções cognitivas e conscientes da dor são integradas. A modulação descendente da dor é mediada por projeções da PAG, que também recebe aferência de outros locais, incluindo o hipotálamo (não mostrado na figura), e se comunica com o RVM, bem como outros núcleos bulbares que enviam projeções descendentes para o corno dorsal da medula espinal. O *locus coeruleus* (LC), recebe aferências da PAG, se comunica com o RVM e envia projeções inibitórias descendente noradrenérgicas para a medula espinal. Projeções antinociceptivas e pró-nociceptivas do RVM modulam negativamente e positivamente as aferências nociceptivas e formam um sistema regulatório endógeno da dor. Tratos ascendentes (azul) e descendentes (vermelho) são mostrados no esquema. O círculo com a letra H em seu interior representa a medula espinal.

Fonte: adaptada de Ossipov, Dussor e Porreca (2010).

A modulação da dor também pode ocorrer na parte periférica do sistema nervoso, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Ilustração da lesão periférica e do terminal periférico e central do neurônio aferente primário.



Legenda: Os receptores periféricos são ativados por: estímulo nocivo, lesão tecidual e inflamação aguda; e enviam informação aferente ao corno dorsal da medula espinhal onde a transmissão sináptica para as vias ascendentes está sujeita a modulação das vias descendentes, circuitos neuronais locais e uma variedade de neuroquímicos. **a)** modulação neuroquímica da transmissão sináptica no corno dorsal mostrando exemplos de receptores pós-sinápticos e canais iônicos que são ativados pela liberação de aminoácidos excitatórios liberados pré-sinápticamente e sensibilizados por citocinas liberadas por células gliais ativas após a lesão nervosa. **b)** Mediadores periféricos da transdução da dor após lesão tecidual: a inflamação leva à liberação de numerosas substâncias de mastócitos, macrófagos e de células lesionadas que atuam diretamente ou indiretamente para alterar a sensibilidade dos receptores e canais iônicos nos terminais nervosos periféricos. Esses receptores

liberam mensageiros secundários que ativam efetores como proteína cinase A (PKA) e PKC que podem ativar outros receptores acoplados a membrana e a transcrição gênica. A₂, receptor para adenosina A₂, ASIC, canais iônicos sensíveis à ácido, B1/2, receptores 1 e 2 para bradicinina; CNS, sistema nervoso central, EAAs, aminoácidos excitatórios, EP, receptor para prostagandina E; GABA, ácido γ -aminobutírico; GIRK, proteína G acoplada a corrente retificadora de entrada de K⁺; H₁, receptor H₁ para histamina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; IL, interleucina, IL-1R, receptor 1 para interleucina, M₂, receptor muscarínico M₂, NO, óxido nítrico, P2X₃, receptor purinérgico X₃; PAF, fator de ativação plaquetária; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral, TTXr, receptor tetrodotoxina; TrkA, receptor tirosina cinase A.

Fonte: adaptada de Woodcock, Witter e Dionne (2007).

Os efeitos do sistema modulatório descendente sobre o processo nociceptivo no corno dorsal da medula espinal é complexo (BENARROCH, 2008). Por exemplo: noradrenalina, serotonina e dopamina podem exercer papéis duais na nocicepção, dependendo do tipo de receptor envolvido, do sítio (local) de ação no corno dorsal e/ou do *cross talk* (comunicação cruzada) entre a sinalização neuroquímica local e as vias descendentes, incluindo adenosina, opióides endógenos e óxido nítrico (NO) (MILLAN, 2002; PERTOVAARA, 2006). No texto abaixo serão discutidas as vias modulatórias descendentes da dor avaliadas neste trabalho.

1.1.2.1 Vias modulatórias descendentes serotoninérgicas

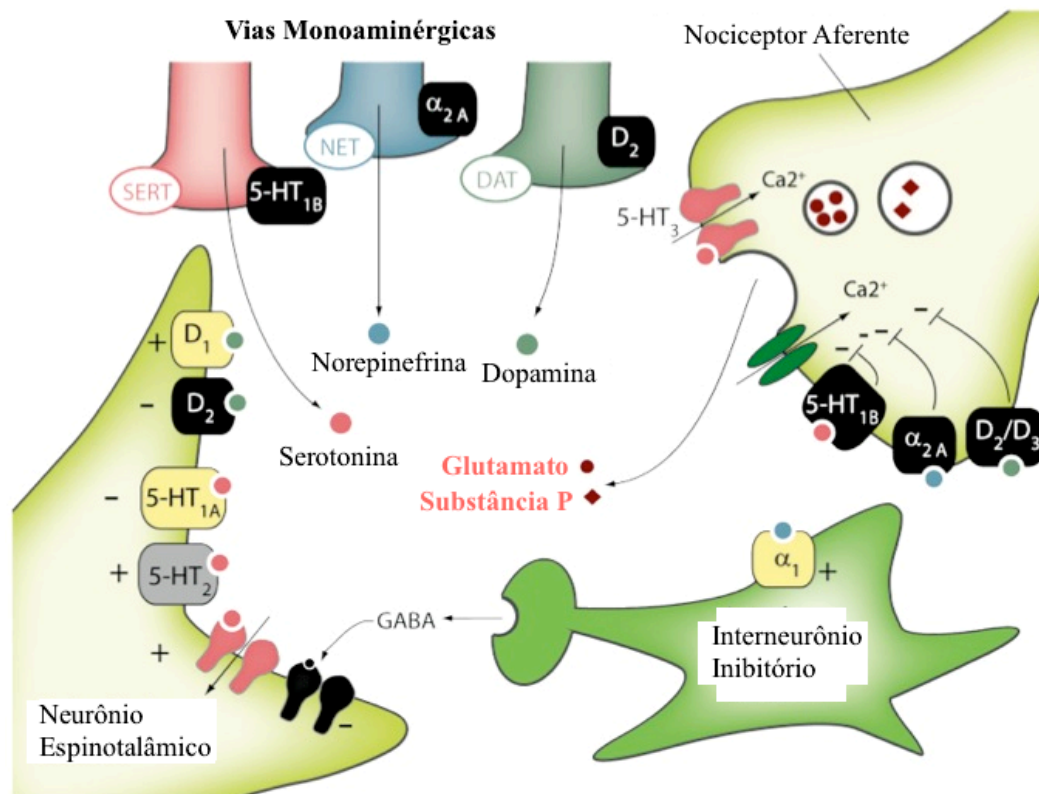
Estudos mostraram que os antagonistas serotoninérgicos bloquearam a antinocicepção produzida por estimulação (SPA) do RVM (OLIVERAS et al., 1978). Este fato sugere que a inibição descendente da dor é mediada por neurônios serotoninérgicos que se projetam do RVM (BASBAUM; FIELDS, 1978). A estimulação da PAG ou RVM causa

liberação de serotonina (5-HT) na medula espinal (CUI et al., 1999) e, a administração intratecal de agonistas serotoninérgicos causa antinocicepção (YAKSH; WILSON, 1979), enquanto que os antagonistas serotoninérgicos administrados intratecalmente atenuam a SPA do RVM (JENSEN; YAKSH, 1984). Estudos com marcadores retrógrados demonstraram a presença de projeções serotoninérgicas do núcleo magno da rafe, no interior do RVM, bem como o núcleo paragigantocelular e a porção ventral do núcleo gigantocelular (KWIAT; BASBAUM, 1992) para o corno dorsal da medula espinal. Tais estudos concluem que o RVM modula a dor através de vias descendentes serotoninérgicas (Figura 9).

O efeito da serotonina espinal pode ser tanto inibitório quanto facilitatório, dependendo do subtipo de receptor ativado (SUZUKI; RYGH; DICKENSON, 2004; RAHMAN et al., 2009). Estudos têm demonstrado que a administração espinal de um antagonista dos receptores inibitórios 5-HT₇ bloqueou o efeito antinociceptivo da morfina microinjetada no RVM, enquanto que o antagonismo farmacológico do receptor facilitatório 5-HT₃ bloqueia a hiperalgesia induzida por colecistocinina administrada no RVM (DOGRUL; OSSIPOV; PORRECA, 2009). Além disso, a administração sistêmica de agonistas 5-HT₇ bloqueou a hiperalgesia induzida pela capsaicina, enquanto que antagonistas 5-HT₇ causaram hipersensibilidade mecânica (BRENCHAT et al., 2009). O receptor 5-HT₇ foi identificado no gânglio da raiz dorsal e nos terminais centrais dos neurônios aferentes primários (DOLY et al., 2005; PIERCE et al., 1996), bem como em interneurônios GABAérgicos no corno dorsal da medula espinal (DOLY et al., 2005), que é consistente com seu papel na modulação da dor (BRENCHAT et

al., 2009). Embora essas observações indiquem um importante papel serotoninérgico para a modulação da dor, os mecanismos espinais precisos envolvidos ainda necessitam ser esclarecidos (Figura 9).

Figura 9- Influência das monoaminas na nocicepção no corno dorsal da medula espinal.



Legenda: No corno dorsal da medula espinal a serotonina, a norepinefrina e a dopamina exercem ação antinociceptiva principalmente por reduzir a liberação de neurotransmissor pelos neurônios aferentes primários, estes efeitos são mediados por receptores pré-sinápticos 5-HT_{1B}, α₂ e D₂/D₃, respectivamente. Estes receptores também contribuem para a inibição pós-sináptica dos neurônios do trato espinotalâmico. Em contraste, a serotonina agindo através dos receptores 5-HT₂ pós-sinápticos e receptores 5-HT₃ pré- e pós sinápticos, e a dopamina, agindo através dos receptores D₁ podem ter ação pró-nociceptiva. Os interneurônios também podem mediar os efeitos modulatórios das monoaminas. DAT, transportador para dopamina; NET, transportador para norepinefrina, SERT, transportador para serotonina.

Fonte: adaptada de Benarroch (2008).

1.1.2.2 Vias modulatórias descendentes noradrenérgicas

A estimulação elétrica da PAG ou RVM com o objetivo de causar antinocicepção aumentou os níveis de norepinefrina no fluido cerebrospinal, e este efeito foi bloqueado por antagonistas adrenérgicos administrados na medula espinal (CUI et al., 1999; HAMMOND, TYCE, YAKSH, 1985; HAMMOND; YAKSH, 1984). Estes achados sugerem uma forte contribuição da norepinefrina na antinocicepção associada com a inibição descendente. Nem a PAG, nem o RVM contêm neurônios noradrenérgicos, ambos se comunicam com regiões noradrenérgicas importantes na modulação da dor, incluindo os núcleos A5 (*locus coeruleus*), A6 e A7 (BAJIC; PROUDFIT, 1999; YEOMANS; PROUDFIT, 1990). Estes núcleos são a principal fonte de projeções noradrenérgicas diretas para a medula espinal (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; PROUDFIT, 1992) e podem inibir as respostas pré- e pós-sinápticas na medula espinal (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; PROUDFIT, 1992).

Estudos demonstraram que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 espinais exerce forte efeito antinociceptivo (PERTOVAARA, 2006; OSSIPOV et al., 1990). A clonidina espinal bloqueia a dor induzida pela capsaicina em humanos (EISENACH; HOOD; CURRY, 1998). A ativação da PAG resultou em inibição das respostas nociceptivas dos neurônios do corno dorsal da medula espinal, mediada pela ativação dos adrenoceptores α_2 espinais (BUDAI; HARASAWA; FIELDS, 1998). A ativação dos adrenoceptores α_2 espinais induz a inibição da transmissão nociceptiva ao nível da medula espinal através de atividade pré-sináptica, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios pelos neurônios aferentes primários, bem como, através dos sítios (locais) pós-

sinápticos (PERTOVAARA, 2006). Experimentos realizados em fatias da medula espinal revelaram que a ativação dos adrenoceptores α_2 induz hiperpolarização em neurônios, sendo, portanto, uma ação inibitória. Também foi demonstrado que a ativação de receptores adrenérgicos do tipo α_1 causou despolarização dos interneurônios GABAérgicos (GASSNER; RUSCHEWEYH; SANDKÜHLER, 2009), sendo este um mecanismo adicional para o aumento da inibição. Por outro lado, a ativação dos adrenoceptores α_1 também é capaz de aumentar as respostas dos neurônios do corno dorsal às aferências nociceptivas (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010) (Figura 9).

1.1.2.3 Vias modulatórias descendentes dopaminérgicas

A principal fonte de inervação dopaminérgica descendente no corno dorsal da medula espinal são os neurônios provenientes de A11, do hipotálamo periventricular posterior (TRACEY; JOHNS, 2010). Os neurônios aferentes primários e os neurônios na lâmina I do corno dorsal expressam tanto receptores D_1 (D_1 e D_5) como D_2 (D_2 e D_3) (KELTNER et al., 2006). Embora os receptores D_1 sejam expressos em uma densidade maior que os receptores D_2 ou D_3 , os receptores D_2/D_3 possuem afinidades maiores e são ativados por concentrações menores de dopamina do que os receptores D_1 (PAULUS; TRENKWALDER, 2006). A estimulação nociva breve ou mesmo sustentada, aumenta o *turnover* da dopamina no corno dorsal, sugerindo um aumento da atividade da via dopaminérgica descendente (MILLAN, 2002). A ativação dos neurônios A11 reduz as respostas comportamentais à estimulação nociva e este efeito é mediado pelos receptores D_2 . Estes receptores causam inibição pré-sináptica da liberação de

neurotransmissor pelos aferentes nociceptivos primários. Agonistas de receptores D₂ também podem causar antinocicepção por potencializar os efeitos dos opióides endógenos (MILLAN, 2002). Em contraste, a estimulação dos receptores D₁ causa efeitos pró-nociceptivos diretamente, ou por antagonizar as ações dos agonistas D₂ ou opióides. Os efeitos da dopamina sobre a nocicepção espinal pode depender de sua concentração local, baixos níveis podem ativar os receptores D₂ que reduzem a nocicepção, enquanto que altos níveis de dopamina ativam os receptores D₁ que aumentam a nocicepção (PAULUS; TRENKWALDER, 2006) (Figura 9).

1.1.3 Modelos de nocicepção aguda

Com o intuito de verificar a participação da glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) na nocicepção foram utilizados diferentes testes comportamentais agudos (teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata dos animais e administrações intratecais de agonistas de receptores glutamatérgicos e de citocinas pró-inflamatórias) e o teste de nocicepção crônica (ligadura parcial do nervo isquiático [PSNL]) em camundongos, que serão descritos nos itens subsequentes.

1.1.3.1 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Este teste de contorções compreende a injeção intraperitoneal de um agente irritante, o ácido acético (TABER et al., 1969). Este ato leva a uma extensão estereotípica das patas posteriores, rotação da pelve,

arqueamento do dorso do animal, que são contabilizados em um intervalo de tempo (20 minutos) (HOGAN, 2002).

A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético envolve a estimulação direta das fibras aferentes nociceptivas pela redução do pH e pela síntese de mediadores inflamatórios (RIBEIRO et al., 2000). Foi demonstrado que fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, analgésicos opióides e até mesmo antidepressivos tricíclicos podem inibir a resposta nociceptiva neste modelo (VAZ et al., 1996; GRAY; SPENCER; SEWELL, 1998). Este teste é bastante conhecido e utilizado como *'screening'* para fármacos analgésicos que possuem ações centrais e periféricas (PAVAO-DE-SOUZA et al., 2012).

1.1.3.2 Nocicepção induzida pela formalina

Capone e Aloisi (2004) publicaram um artigo interessante com informações importantes sobre a aplicação deste teste nociceptivo em roedores, texto esse rico em detalhes que ajuda os pesquisadores na execução adequada deste experimento (CAPONE; ALOISI, 2004). O teste da formalina envolve a injeção de pequena quantidade desta substância no tecido subcutâneo, tipicamente da pata, de roedores e o tempo em que o animal permanece lambendo e/ou mordendo a pata injetada é monitorado (TJØLSEN et al., 1992; BARROT, 2012).

A nocicepção induzida pela formalina é muito semelhante às respostas humanas à estímulos dolorosos, sendo este teste nociceptivo frequentemente usado para avaliar as respostas comportamentais à estimulação nociva (ABBOTT et al., 1999). A resposta nociceptiva à formalina apresenta duas fases, a primeira observada nos primeiros 5

minutos após a sua administração (fase neurogênica) e a segunda fase corresponde ao intervalo dos 15 aos 30 minutos após a injeção intraplantar deste agente flogístico (fase inflamatória) (LUIZ et al., 2007; CAPONE; ALOISI, 2004; BARROT, 2012).

Há algumas evidências de que a primeira fase da formalina seja causada predominantemente pela ativação dos neurônios aferentes primários com fibras do tipo C, enquanto que a segunda fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico e mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal (TJØLSEN et al., 1992; MCNAMARA et al., 2007). Os fármacos que atuam centralmente, como os narcóticos, inibem ambas as fases igualmente (TJØLSEN et al., 1992; DA MATTA et al., 2011). A primeira fase do teste é sensível aos anestésicos locais (TJØLSEN et al., 1992) e a segunda fase do teste, por sua vez, responde a vários fármacos que possuem ação analgésica clínica estabelecida, tais como opióides (DUBUISSON; DENNIS, 1977), anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (HUNSKAAR; HOLE, 1987), antagonistas dos receptores NMDA (CODERRE; MELZACK, 1992), ou gabapentina (SINGH et al., 1996).

O teste da formalina é um modelo nociceptivo bem aceito para avaliar o efeito antinociceptivo central e periférico de substâncias avaliadas (TJØLSEN et al., 1992; DA MATTA et al., 2011).

1.1.3.3 Nociceção induzida pela administração intratecal de glutamato, NMDA, trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β

A nociceção induzida pelos agonistas glutamatérgicos administrados intratecalmente é de extremo interesse sendo que o glutamato desempenha papel significativo no processamento nociceptivo nas partes central e periférica do sistema nervoso (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; FUNDYTUS, 2001; MILLAN, 1999). Além disso, fármacos capazes de bloquear os receptores para o glutamato ionotrópicos e metabotrópicos exibem efeitos antinociceptivos em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos (NEUGEBAUER, 2002). Entretanto, o uso dessas substâncias como analgésicos fica restrita pelos seus efeitos colaterais indesejáveis (FUNDYTUS, 2001; ROBERTSON et al., 1997).

O principal mecanismo pelo qual os agonistas glutamatérgicos causam dor ou neurotoxicidade incluem um aumento nos níveis de cálcio intracelular, ativação de mediadores celulares e abertura de canais iônicos. Sendo assim, a estimulação ocasionada pelo glutamato resulta na liberação de outros mediadores como as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β), que atuam sinergicamente na excitação neuronal (XU; YAKSH, 2011).

A injeção intratecal de citocinas, tais como: TNF- α , IL-1 β , induz comportamento nociceptivo que é parcialmente mediado pela ativação dos terminais nervosos centrais dos neurônios nociceptivos e subsequente liberação de glutamato (ROBERTSON et al., 1997, TADANO et al., 1999).

1.1.4 Nociceção crônica

Os vários modelos de nociceção oferecem ferramentas úteis e geralmente fáceis de usar, para a ciência básica. Entretanto, estas ferramentas, normalmente são baseadas em ensaios de nociceção aguda, o que não são suficientes para efetuar pesquisa translacional sobre dor e seus tratamentos (NEGUS et al., 2006). Há necessidade de se utilizar métodos que mimetizem ainda mais o quadro clínico dos pacientes como, por exemplo, modelos de dor sustentada ou crônica (BARROT, 2012).

A dor crônica é comum na prática clínica e prejudica grandemente a qualidade de vida dos pacientes. A maioria das pessoas que sofrem de dor crônica se encontra em uma das amplas classes: lesão nervosa focal periférica e multifocal (traumática, isquêmica ou inflamatória); polineuropatias periféricas generalizadas (tóxica, metabólica, hereditária ou inflamatória); lesões do sistema nervoso central (acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão da medula espinal) e transtornos neuropáticos complexos (síndrome da dor regional complexa [CRPS]) (BARON, 2006).

1.1.4.1 Prevalência da dor crônica persistente

Os estudos dos custos e do fardo das doenças visam acessar o impacto total das enfermidades sobre os indivíduos, sistemas de assistência médica, econômicos e sociais. Eles servem como ponto de referência para análises econômicas e são usados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para ressaltar o impacto das doenças

(PHILLIPS; HARPER, 2011). A dor crônica de intensidade moderada a severa ocorre em 19% dos europeus adultos, afetando seriamente suas atividades diárias, sociais e de trabalho. A maioria não recebe tratamento realizado por especialistas e 40% relatam manejo inadequado da sua dor (BREIVIK et al., 2006). Entretanto, o problema também é evidente em crianças e adolescentes, com uma prevalência de 25% e com um terço relatando dor severa (PERQUIN et al., 2000). Além disso, é esperado que o impacto da dor crônica tenha um aumento com o envelhecimento, obesidade e a falta de atividade física da população; pois aumentará a prevalência de condições associadas com a dor crônica (WOOLF; PFLEGER, 2003).

É reconhecido que o impacto da dor persistente é maior do que a maioria dos outros problemas de saúde, pelos seus efeitos sobre as taxas de absenteísmo, reduzidos níveis de produtividade e risco aumentado de abandonar o mercado de trabalho (PHILLIPS; HARPER, 2011). Foi estimada uma perda de 1 milhão de dias de trabalho anualmente na Dinamarca como resultado da dor crônica (ERIKSEN et al., 2006). Assim como seu impacto no absenteísmo, também sabe-se que a dor persistente tem um impacto ainda maior sobre a produtividade. Na Austrália, o número de dias ausentes no trabalho resultantes de dor crônica foi estimado em 9.9 milhões anualmente e a reduzida efetividade nos dias de trabalho foi estimada em 36.5 milhões por ano (VAN LEEUWEN et al., 2006).

1.1.4.2 Dor Neuropática

A dor neuropática se origina como consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (LOESER; TREEDE, 2008; JENSEN et al., 2011). Geralmente é uma condição crônica que está associada com importantes prejuízos físicos, emocionais e sociais que afeta a qualidade de vida dos pacientes (JENSEN; CHODROFF; DWORKIN, 2007). Na maioria dos casos, a dor neuropática é seguida a lesão nervosa periférica (ATTAL et al., 2010). Sintomas de dor neuropática incluem sensações anormais, dor espontânea, que pode ser contínua ou paroxística (BARROT, 2012).

1.1.4.2.1 Fisiopatologia da dor neuropática

A maioria das ideias relacionadas à patofisiologia da dor neuropática se originou de trabalho experimental em modelos animais; destacando-se a sensibilização periférica e central (BARON, 2006). As sensações de dor são normalmente causadas pela atividade de fibras não-mielinizadas do tipo C e de neurônios aferentes primários pouco mielinizados com fibras do tipo A δ . Estes nociceptores são usualmente silenciosos na ausência de estimulação, e respondem melhor a estímulos que são potencialmente nocivos. Após uma lesão nervosa periférica, entretanto, esses neurônios se tornam anormalmente sensíveis e desenvolvem atividade espontânea patológica. Essas mudanças patológicas são sustentadas por dramáticas mudanças celulares e moleculares a nível dos nociceptores aferentes primários que são ativados por lesão nervosa (Figura 10) (BARON, 2006).

A atividade ectópica espontânea após lesão nervosa é acompanhada por aumento da expressão de RNA mensageiro para canais de sódio dependentes de voltagem em neurônios aferentes primários. Assim, o aumento da densidade de canais de sódio no local de geração do impulso ectópico poderia ser responsável pela diminuição do limiar do potencial de ação e consequente hiperatividade (LAI; HUNTER; PORRECA, 2003).

Após lesão nervosa periférica, ocorre o aumento da densidade de canais de sódio não só no local da lesão nervosa (Figura 10B), mas também proximalmente ao gânglio da raiz dorsal intacto (BARON, 2006).

A lesão nervosa também induz regulação aumentada de vários receptores, alguns dos quais são pouco expressos sob condições fisiológicas, na membrana dos neurônios aferentes primários, por exemplo adrenoreceptores e receptores vanilóides. Os receptores de potencial transitório vanilóides (TRPV1) estão localizados predominantemente em fibras aferentes nociceptivas, e podem ser ativados pela capsaicina. Fisiologicamente este receptor é ativado por calor nocivo ($> 43^{\circ}\text{C}$) (CATERINA et al., 2000). (Figura 10B).

Investigações sobre os canais iônicos excitatórios sensíveis a temperatura também identificaram um canal TRP sensível ao frio e ao mentol (TRPM8), que é ativado por variações de temperatura de $8-28^{\circ}\text{C}$ (PATAPOUTIAN et al., 2003). Este receptor é expresso em neurônios do DRG de pequeno diâmetro (MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). O aumento da expressão ou ativação deste canal após lesão pode levar à sensibilização periférica dos nociceptores do tipo C sensíveis ao

frio, resultando no fenômeno sensorial de hiperalgesia ao frio (WASNER et al., 2004).

Os canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) parecem participar do processo de transdução para o estímulo mecânico, participando da hiperalgesia mecânica (PRICE et al., 2001). A lesão nervosa experimental também desencadeia a expressão de adrenoreceptores α_1 e α_2 nas fibras aferentes cutâneas (Figura 10B). Conseqüentemente esses neurônios desenvolvem sensibilidade adrenérgica (BARON, 2006).

Há evidências de que fibras não lesionadas em contato com fibras em degeneração, em um nervo lesionado parcialmente, também participam da sinalização da dor (WASNER et al., 2005). Produto como o fator de crescimento do nervo (NGF) está associado a degeneração Walleriana e é liberado na vizinhança das fibras não lesionadas, pode levar a liberação do TNF- α , bem como a expressão de canais e receptores (canais de sódio, receptores TRPV1, adrenoreceptores; Figura 10B) alterando as propriedades das fibras nervosas aferentes não lesionadas (HUDSON, et al., 2001; WU et al., 2001).

Após a lesão nervosa, os macrófagos ativados que migram dos vasos sanguíneos endoneurais para os nervos e gânglio da raiz dorsal, liberam citocinas pró-inflamatórias, em particular TNF- α (SOMMER, 2003). Estes mediadores induzem atividade ectópica em nociceptores aferentes primários lesionados e não lesionados no local da lesão (MARCHAND, PERRETTI; MCMAHON, 2005).

Como consequência da hiperatividade do nociceptor periférico, mudanças secundárias ocorrem no corno dorsal da medula espinal. A lesão nervosa periférica leva a um aumento na excitabilidade geral de neurônios multireceptivos da medula espinal (neurônios de amplo

espectro dinâmico, com múltiplas aferências sinápticas de nociceptores, bem como de fibras não nociceptivas [Figura 10 C]) (BARON, 2006).

Esta hiperexcitabilidade é manifestada por atividade neuronal aumentada em resposta ao estímulo nocivo, expansão dos campos receptivos neuronais e alastramento da hiperexcitabilidade espinal para outros segmentos. Esta sensibilização central é iniciada e mantida pela atividade em fibras do tipo C patologicamente sensibilizadas. Estas fibras sensibilizam neurônios do corno dorsal da medula espinal por liberarem glutamato, que atua em receptores do tipo NMDA (Figura 10 C), e o neuropeptídeo substância P. Pós-sinapticamente, os neurônios do corno dorsal (segunda ordem) anormalmente expressam canais de sódio dependentes de voltagem tipo 1.3 (Nav1.3) após a lesão nervosa (HAINS et al., 2004). Várias cascatas intracelulares contribuem para a sensibilização central, em particular a via de sinalização mediada pela proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (JI; WOOLF, 2001). Se a sensibilização central está estabelecida, um estímulo tátil normalmente inócuo se torna capaz de ativar neurônios que sinalizam dor na medula espinal através de aferentes primários mecanoreceptores de baixo limiar de fibras do tipo A δ e do tipo A β (Figura 8C) (TAL; BENNETT, 1994). Os canais de cálcio neuronais ativados por voltagem, do tipo N, localizados nos terminais centrais dos neurônios aferentes primários nociceptivos têm um importante papel na sensibilização central, através da facilitação da liberação de glutamato e substância P. Esses canais apresentam sua expressão aumentada após lesão nervosa (LUO et al., 2001).

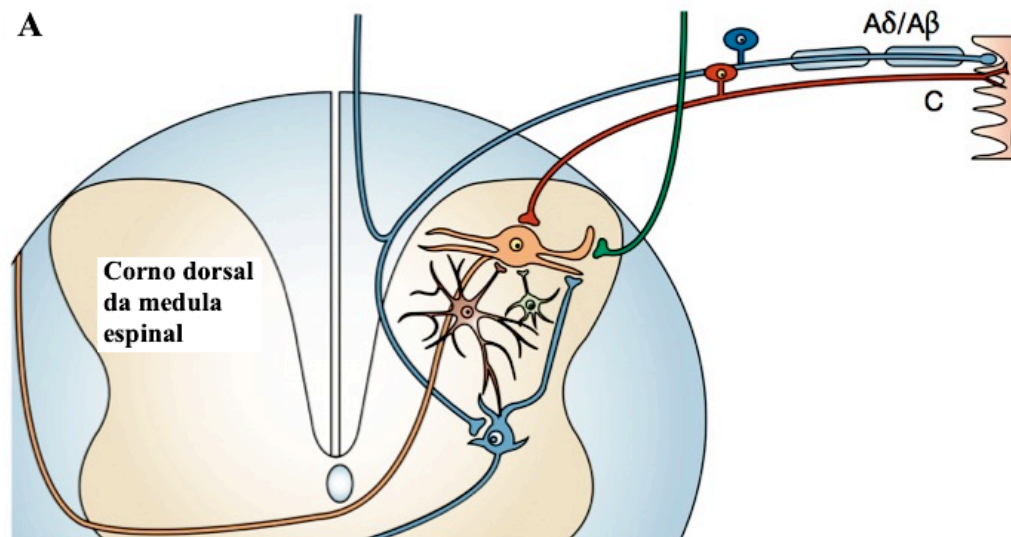
Fisiologicamente, os neurônios do corno dorsal recebem forte controle inibitório dos interneurônios que liberam o ácido γ -

aminobutírico (GABA) (Figura 10 A, C). Em roedores, a lesão parcial do nervo espinal promove uma perda apoptótica seletiva dos neurônios inibitórios que liberam GABA no corno dorsal superficial da medula espinal (MOORE et al., 2002), um mecanismo que aumenta a sensibilização central. Um mecanismo alternativo da desinibição intraespinal após lesão nervosa foi proposto. Esse mecanismo envolve a redução trans-sináptica da expressão do transportador potássio-cloreto KCC2 em neurônios da lâmina I, que perturba a homeostase de ânion nestes neurônios. A mudança resultante do gradiente de ânion transmembrana faz com que uma corrente aniônica inibitória passe a ser excitatória. O efeito é que a liberação de GABA pelos interneurônios inibitórios passa a exercer ação paradoxal excitatória sobre os neurônios da lâmina I, aumentando a sensibilização central (COULL et al., 2003).

Os neurônios do corno dorsal da medula espinal recebem um controle modulatório descendente poderoso de centros do tronco encefálico supra-espinais (inibitório, bem como facilitatório) (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004) (Figura 10A, C). Foi hipotetizada que a perda da função das vias inibitórias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas contribuem para a sensibilização central e para a cronificação da dor. Esta ideia explica a eficácia de antidepressivos que bloqueiam a recaptção de serotonina e noradrenalina na dor neuropática. Em animais, entretanto, a alodinia mecânica após lesão nervosa depende da ativação tônica das vias descendentes que facilitam a transmissão da dor, indicando que estruturas na formação reticular mesencefálica – possivelmente o núcleo cuneiforme e a PAG - estão envolvidas na sensibilização central na dor neuropática (OSSIPOV et al., 2000).

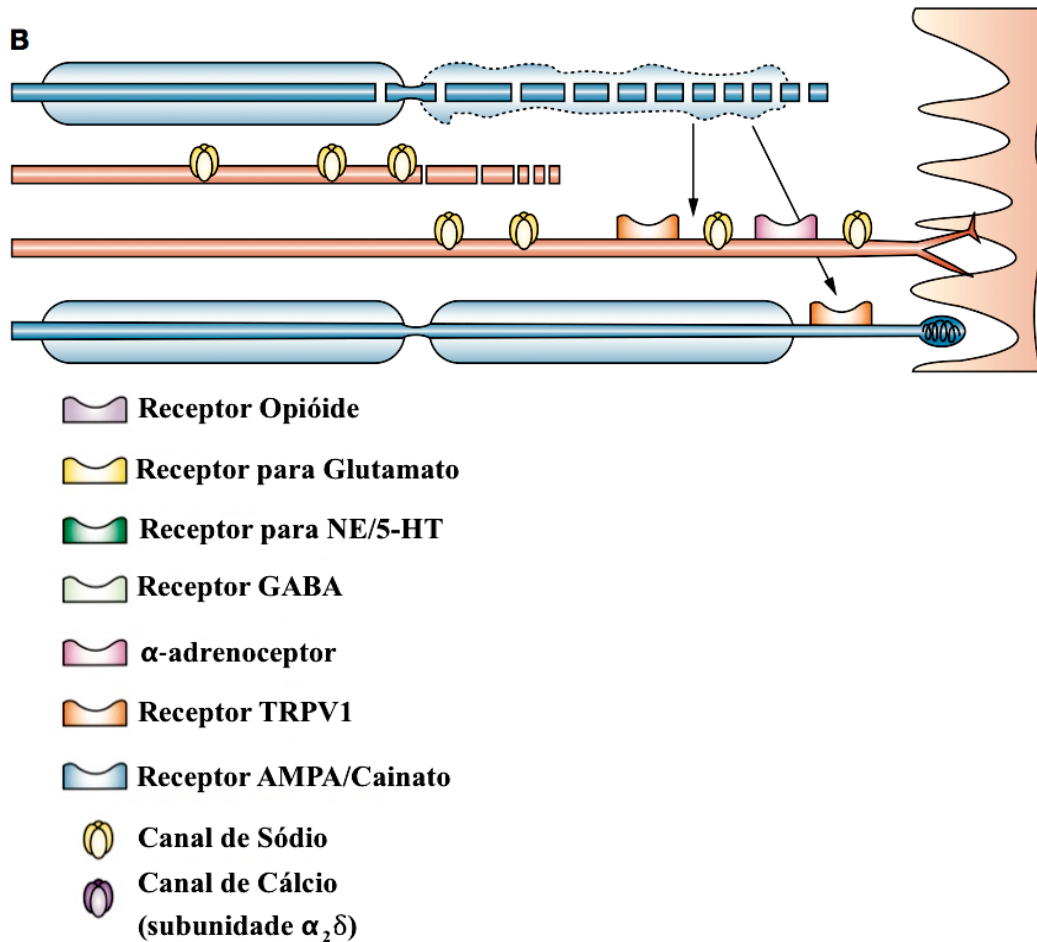
As terapias que aumentam a inibição e/ou atenuam a facilitação descendentes são um importante alvo para futuras pesquisas. A sensibilização central também pode ser aumentada por células não-neuronais gliais na medula espinal. A lesão nervosa ativa a glia na medula espinal e faz com que essas células aumentem a dor pela liberação de citocinas pró-inflamatórias neuroexcitatórias gliais e glutamato (Figura 10D) (WIESELER-FRANK; MAIER; WATKINS, 2005).

Figura 10. Mecanismos da sensibilização central e periférica na dor neuropática.



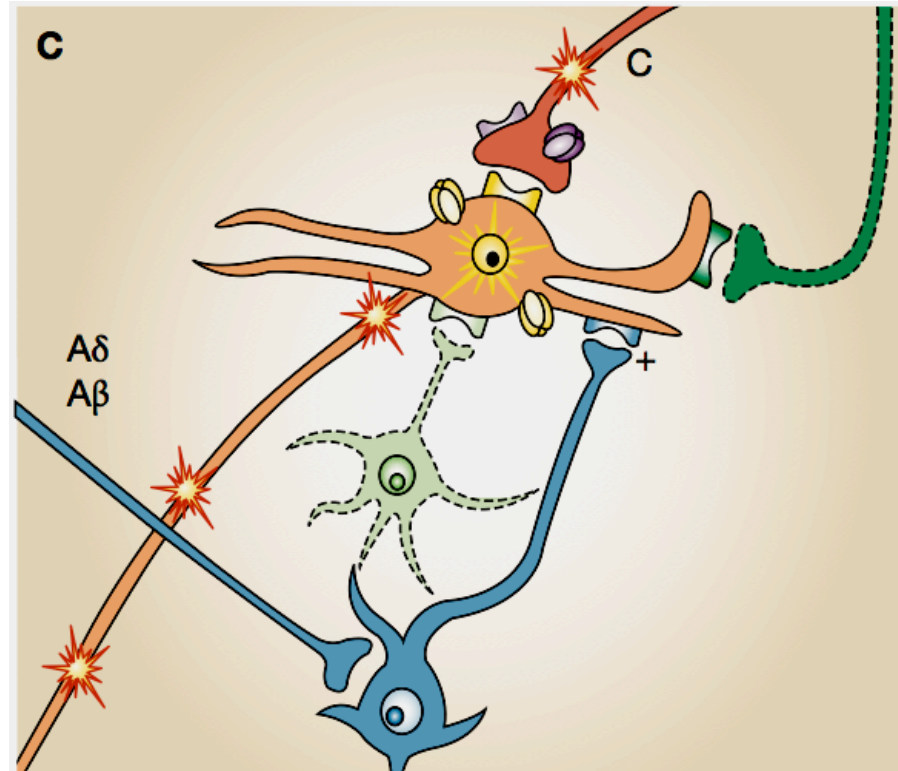
- (A) Vias aferentes primárias e sensibilização central no corno dorsal da medula espinal. As fibras C nociceptivas (vermelhas) terminam em neurônios de projeção espinotalâmicos (neurônio laranja) nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal, enquanto que as fibras A mielinizadas (azul) se projetam para as lâminas mais profundas. O neurônio de projeção, de segunda ordem é do tipo amplo espectro (variação, alcance) dinâmico (WDR), isto é, ele recebe aferência sináptica direta de terminais nociceptivos e também aferências multissinápticas de fibras A mielinizadas (informação não-nociva, sistema do neurônio em azul). Os interneurônios (neurônios verdes) liberam ácido γ -aminobutírico (GABA), normalmente exerce aferência sináptica inibitória sobre os neurônios WDR. Além disso, estão representadas as sinapses dos sistemas modulatórios descendentes nos neurônios WDR (o terminal descendente em verde representa uma projeção inibitória). As células gliais da medula espinal (células marrons) também se comunicam com o neurônio WDR.

Figura 10. Mecanismos da sensibilização central e periférica na dor neuropática (continuação).



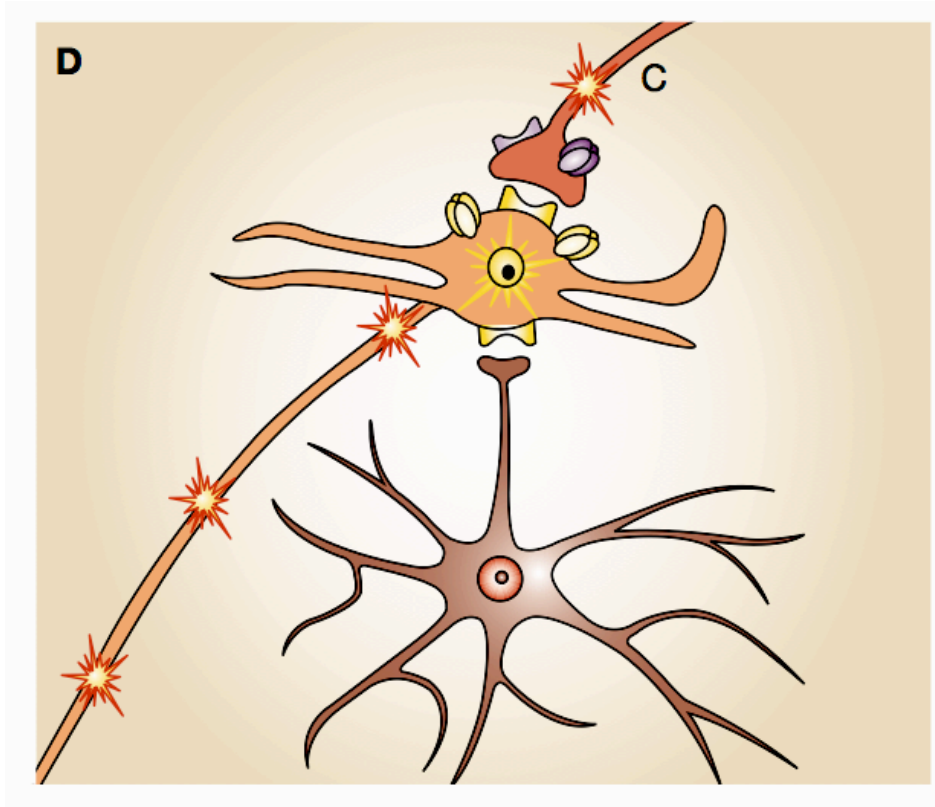
- (B) Mudanças periféricas nos neurônios aferentes primários (fibras C nociceptivas, vermelho; fibras A mielinizadas, não nociceptivas, azul) após lesão parcial do nervo, levando à sensibilização periférica. Alguns axônios são lesionados e degeneram (dois axônios superiores), enquanto outros (dois axônios inferiores) ainda permanecem intactos e estão conectados com o órgão periférico (pele). A lesão ativa a expressão de canais de sódio nas fibras C lesionadas. Além disso, os produtos, como fator de crescimento do nervo que também estão associados a degeneração Walleriana são liberados na vizinhança das fibras poupadas (flechas), desencadeando a expressão de receptores e canais (canais de sódio, receptores TRPV1, adrenoceptores) em fibras não-lesionadas.

Figura 10. Mecanismos da sensibilização central e periférica na dor neuropática (continuação).



(C) A atividade espontânea em nociceptores C induz mudanças secundárias no processamento sensorial central, levando a hiperexcitabilidade da medula espinal (sensibilização central dos neurônios WDR de segunda ordem, indicado pelas estrelas no neurônio em laranja). Isto causa aferência das fibras A-mecanorreceptoras (toque leve; sistema neuronal em azul) sendo percebidas como dor (alodinia mecânica; '+' indica 'gating' na sinapse através de receptores AMPA/KA. Várias estruturas moleculares pré e pós sinápticas (receptores opióides, canais de cálcio) e estruturas moleculares pós-sinápticas (receptores para o glutamato, receptores para a norepinefrina (NE), receptores para a serotonina (5-HT), receptores para o GABA, canais de sódio) estão envolvidos na sensibilização central. Interneurônios inibitórios e sistemas de controle modulatório descendente (neurônios verdes) são disfuncionais após lesões nervosas, levando a desinibição ou facilitação dos neurônios do corno dorsal da medula espinal e maior sensibilização central.

Figura 10. Mecanismos da sensibilização central e periférica na dor neuropática (continuação).



(D) Lesão nervosa periférica ativa células gliais não-neuronais na medula espinal (célula em marrom), com aumento na excitabilidade de neurônios WDR por liberar citocinas e aumentar os níveis de glutamato. 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); GABA, ácido γ -aminobutírico; NE, norepinefrina.

Fonte: adaptada de Baron (2006).

1.1.4.2.2 *Ligação parcial do nervo isquiático*

Os modelos de dor neuropática geralmente representam condições patológicas mais relevantes clinicamente que podem identificar fármacos potentes e efetivos, enquanto os animais permanecem em boa saúde geral, sem estresse excessivo, perda de peso ou mudanças comportamentais gerais (WALKER; FOX; URBAN, 1999). O nervo isquiático de roedores é usado, na maioria dos estudos

que envolvem lesão nervosa, pelo seu grande calibre, por ser facilmente acessível e inervar a superfície plantar da pata posterior, que é um local conveniente para testes sensoriais (HOGAN, 2002).

Neste estudo utilizou-se o modelo de ligação parcial do nervo isquiático (PSNL) descrito previamente por Seltzer, Dubner e Shir (1990); Kim, Chung (1992); Choi et al. (1994) e Malmberg e Basbaum (1998). A presença de dor neuropática é comumente avaliada pela hiperalgesia térmica e mecânica e alodinia ao frio e ao estímulo tátil (ATTAL et al., 1990; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990; KIM; CHUNG, 1992; CHOI et al., 1994; MALMBERG; BASBAUM, 1998).

Clinicamente, a terapêutica da dor neuropática permanece desafiadora. Os tratamentos considerados de primeira linha consistem de fármacos anticonvulsivantes, como a gabapentina ou carbamazepina, ou fármacos antidepressivos, como os antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (MOULIN et al., 2007; SAARTO; WIFFEN, 2007; ATTAL et al., 2010).

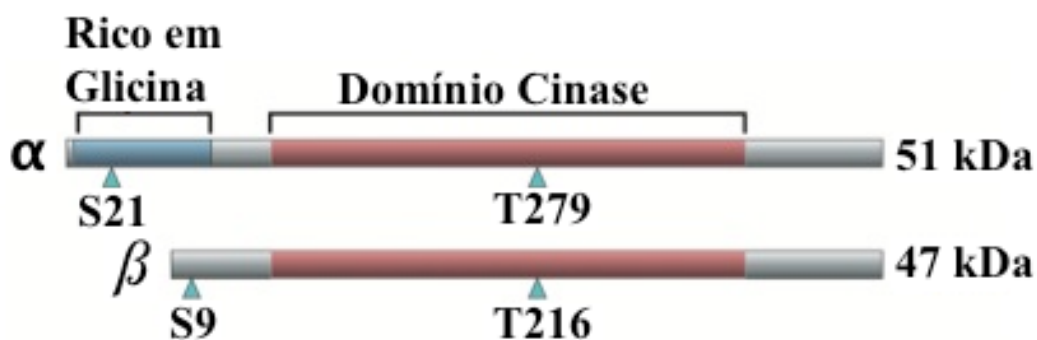
É extremamente importante a compreensão dos mecanismos patofisiológicos da dor neuropática para a descoberta de novos e efetivos alvos terapêuticos (ver item 1.1.4.2.1).

1.2 GLICOGÊNIO SINTASE CINASE 3

A glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) é uma cinase serina/treonina que foi primeiramente isolada e purificada como uma enzima capaz de fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase (EMBI; RYLATT; COHEN, 1980; WOODGETT; COHEN, 1984).

Há duas isoformas da GSK3 em mamíferos, elas são codificadas por genes distintos, a GSK3 α e a GSK3 β (WOODGETT, 1990) (Figura 11). A GSK3 α tem uma massa de 51 kDa, enquanto que a GSK3 β é uma proteína de 47 kDa. A diferença no tamanho é devido a extensão rica em aminoácido glicina na região N-terminal da GSK3 α . Embora haja alta homologia dentro de seus domínios cinases (98%), os dois produtos gênicos compartilham somente 36% de identidade nos últimos 76 resíduos de aminoácidos C-terminais (WOODGETT, 1990). Homólogos da GSK3 existem em todos os eucariotos examinados até o momento e apresentam um alto grau de homologia; isoformas de espécies tão distantes como moscas e humanos apresentam mais de 90% de similaridade na sequência dos aminoácidos dentro do domínio cinase (ALI; HOEFLICH; WOODGETT, 2001).

Figura 11. Representação esquemática da GSK3 α e GSK3 β de mamíferos.



Legenda: Os locais de fosforilação nos resíduos dos aminoácidos serina e tirosina são indicados pelas cabeças das flechas azuis. O domínio N-terminal rico no aminoácido glicina é único da GSK3 α e o domínio cinase conservado, compartilhado por ambas isoformas está destacado em vermelho.

Fonte: adaptada de Doble e Woodgett (2003).

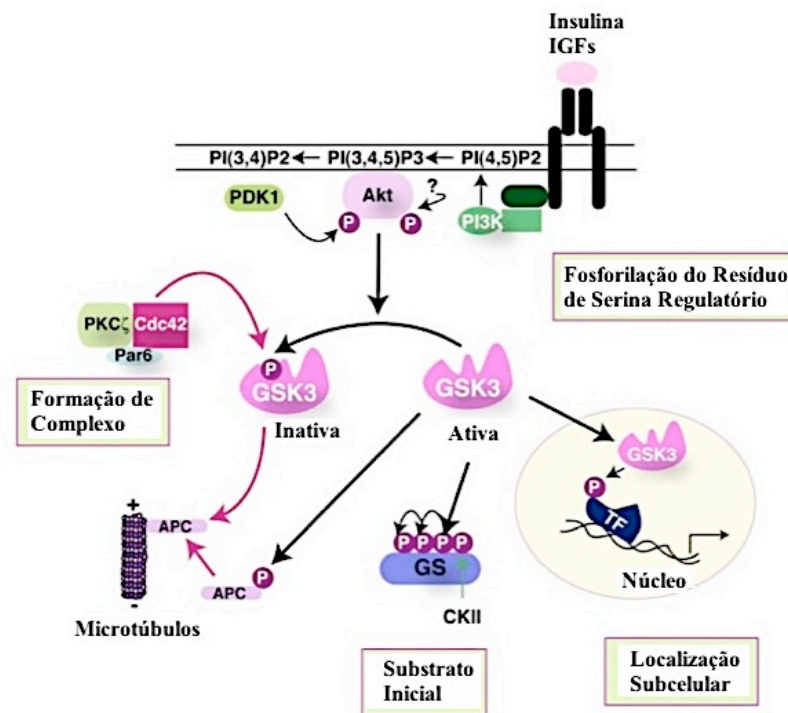
Trinta anos atrás acreditava-se que a GSK3 fosse uma proteína cinase cuja função estava confinada ao metabolismo do glicogênio, hoje sabe-se que ela exerce um papel chave na regulação de muitas funções celulares, incluindo a sinalização pela insulina, fatores de crescimento e nutrientes e a especificação dos destinos das células durante o desenvolvimento embrionário (COHEN; FRAME, 2001). Também está implicada no controle da divisão celular, apoptose e função dos microtúbulos. Surpreendentes achados demonstram que as células desenvolveram mecanismos para “desligar” a atividade da GSK3 em resposta a diferentes sinais que estão conectados de uma forma intrigante pela especificidade única desta enzima pelo substrato (COHEN; FRAME, 2001).

Alguns estudos demonstram que a inibição da GSK3 tem importante papel em diferentes tipos de cânceres (FIONDA et al., 2013; KIM et al., 2013; BILIM et al., 2009; JENDŽELOVSKÝ et al., 2012). O trabalho de Fionda et al. (2013) demonstra a atividade antimieloma dos inibidores da GSK3 pela *upregulação* da proteína de superfície MICA e de seu RNAm em células de mieloma múltiplo. Após a exposição das células de mieloma aos inibidores da GSK3 elas se tornaram mais eficientes em ativar a degranulação celular pelas células *natural killer* (FIONDA et al., 2013). Além disso, a inibição da GSK3 teve correlação com a diminuição da ativação da STAT3, um regulador negativo da transcrição da MICA (FIONDA et al., 2013). Desta forma, o trabalho fornece evidência de que a regulação da expressão de MICA, um ligante do NKG2D (um receptor presente em linfócitos com resposta anti-câncer) pode representar um mecanismo mediado pelo sistema imune na atividade antimieloma desempenhada pelos inibidores da GSK3

(FIONDA et al., 2013). Outras pesquisas também relataram a atividade anti-câncer dos inibidores da GSK3, para exemplificar: o inibidor da GSK3 (CG0009) induz morte em células de câncer de mama pela depleção da ciclina D1 (KIM et al., 2013); a inibição da GSK3 (utilizando AR-A014418, SB-216763 e TDZD8) é uma abordagem para o tratamento de câncer renal humano (BILIM et al., 2009) e sua inibição (pelo uso de AR- A014418) também reverte o efeito pró-apoptótico do proadifeno (inibidor do citocromo P450 monooxigenase) em células HT-29 de adenocarcinoma de cólon (JENDŽELOVSKÝ et al., 2012). Uma nova estratégia terapêutica para quimioterapia é a associação de inibidores da GSK3 com fármacos já utilizados para o tratamento de câncer: a inibição da GSK3 (AR-A014418) sensibiliza as células de câncer de pâncreas à gemcitabina (um quimioterápico), pela alteração da expressão de genes envolvidos no reparo do DNA (SHIMASAKI et al., 2012); e a inibição da GSK3 (AR-A014418, Lítio e SB216763) aumenta a citotoxicidade da enzastaurina, um inibidor da PKC que eleva a apoptose em linfócitos malignos de linfomas de células T cutâneas (ROVEDO; KRETT; ROSEN, 2011).

As muitas funções desempenhadas pela GSK3 (por fosforilar numerosos substratos, mais de 50) sugere que a sua atividade deve ser altamente regulada. Foram identificados quatro mecanismos chave que contribuem para a regulação da atividade da GSK3 de uma maneira substrato-específica (JOPE; JOHNSON, 2004). Estes incluem: a regulação por fosforilação da GSK3; localização subcelular da GSK3; a formação de complexos proteicos contendo GSK3 e o estado de fosforilação dos substratos da GSK3 (Figura 12) (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Figura 12. Mecanismos que regulam as ações da GSK3.



Legenda. Quatro mecanismos atuam em conjunto para regular a fosforilação dos substratos pela GSK3. (1) a fosforilação do substrato pela GSK3 é limitada pela atividade de uma cinase inicial que prepara o substrato para a GSK3. O exemplo mostra o substrato, glicogênio sintase, fosforilado inicialmente pela caseína cinase II (CKII) seguida por fosforilação sequencial pela GSK3. (2) fosforilação da serina regulatória – o principal mecanismo para inibição da atividade da GSK3, a atividade é inibida quando o resíduo do aminoácido serina-9 da GSK3 β ou o resíduo de aminoácido serina-21 da GSK3 α é fosforilado. Sua atividade é ótima quando fosforilada no resíduo do aminoácido tirosina-216 da GSK3 β ou resíduo do aminoácido tirosina-279 da GSK3 α (não representado na figura). Muitas cinases são capazes de fosforilar os resíduos de serina regulatórias da GSK3 α/β . O exemplo mostra a Akt (proteína cinase B). (3) Localização subcelular – a GSK3 é considerada uma enzima altamente citosólica, mas também está associada com, ou internalizada em, compartimentos subcelulares como o núcleo, a mitocôndria e cones de crescimento, assim, a regulação dinâmica da localização subcelular da GSK3 pode regular seu acesso aos substratos dentro dos compartimentos subcelulares. O exemplo demonstrado mostra o transporte da GSK3 para dentro do núcleo onde ela pode fosforilar uma variedade de substratos, incluindo vários fatores de transcrição (TF). (4) Formação de complexo – a distribuição da GSK3 na célula é reprimida pela sua propensão a estar associada a complexos proteicos que fornecem um importante mecanismo para regular sua fosforilação dos substratos específicos que são co-localizados em tais complexos.

Fonte: adaptada de Jope, Yuskaitis e Beurel (2007).

O mecanismo regulatório mais bem definido é a inibição da atividade da GSK3 por fosforilação de um resíduo de serina regulatória nas duas isoformas da GSK3, resíduo de serina-9 na GSK3 β ou resíduo de serina-21 na GSK3 α (WOODGETT, 1990). A via de sinalização fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT ativada em resposta a insulina e muitos outros fatores de crescimento geralmente é o principal regulador da GSK3 porque a Akt fosforila a GSK3 nestes resíduos de serina inibitórios, mas várias outras cinases podem fosforilar estes resíduos de serina regulatórios, tais como a proteína cinase C e a proteína cinase A (GRIMES; JOPE, 2001). De forma contrária, a atividade enzimática da GSK3 é aumentada por fosforilação do resíduo de tirosina-216 na GSK3 β e resíduo de tirosina-279 na GSK3 α , mas os mecanismos que regulam esta modificação não estão bem definidos (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

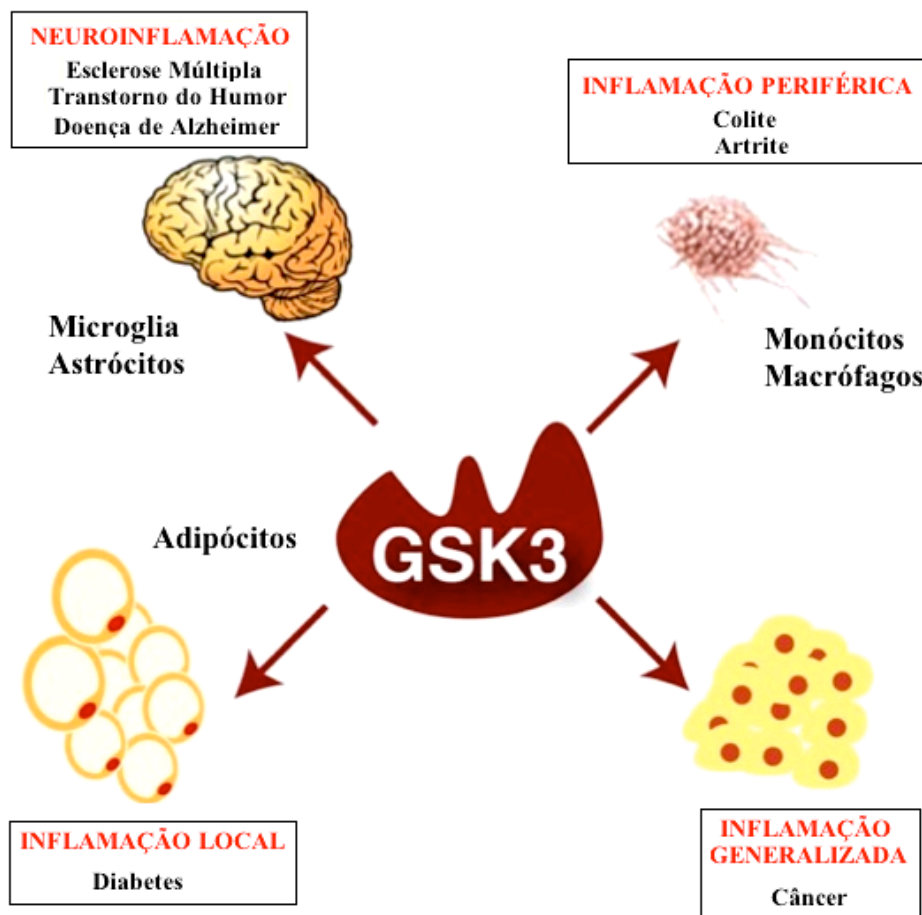
As ações da GSK3 também são reguladas pelo controle da sua localização intracelular, como ela é dinamicamente regulada dentro do núcleo e mitocôndria, onde ela é altamente ativa (BIJUR; JOPE, 2003).

A regulação substrato-específica da GSK3 também é conseguida através de seu posicionamento dentro de complexos proteicos que inibem sua ação através de substratos específicos. Por exemplo na via de sinalização Wnt, a GSK3 e o co-ativador transcricional β -catenina estão co-localizados na proteína de ancoramento axina que direciona a GSK3 para fosforilar a β -catenina, ocasionando a degradação desta última (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). A ativação da sinalização Wnt remove a GSK3 do acesso a β -catenina, causando o acúmulo da β -catenina ativa.

Finalmente, a ação da GSK3 é usualmente regulada pelo estado de fosforilação de seu substrato, um mecanismo indireto que pode regular quão eficientemente a GSK3 fosforila um substrato. Isto se deve ao fato de que a maioria dos substratos da GSK3 devem ser ‘iniciados’, por exemplo, fosforilados em um resíduo 4 aminoácidos C-terminais ao local de fosforilação da GSK3. Isto necessita coordenação temporal da atividade da cinase que ‘inicia’ com a atividade da GSK3 para que a última fosforile o substrato ‘iniciado’. Estas complexidades dos mecanismos de controle das ações da GSK3 fornecem controle substrato-específico de suas ações, uma capacidade especialmente importante para uma enzima que pode fosforilar tantos substratos que regulam numerosas funções celulares (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Dentre as diversas funções reguladas pela GSK3 a inflamação é uma das mais interessantes. A GSK3 regula positivamente o processo inflamatório, sendo esta função importante, pois, várias doenças têm como característica comum a inflamação crônica (Figura 13). Dentre elas podemos citar: doenças psiquiátricas (com foco no transtorno do humor bipolar), doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer), diabetes e câncer (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Figura 13. A GSK3 é um importante componente de numerosas doenças inflamatórias.



Legenda: A neuroinflamação na parte central do sistema nervoso é mediada pela microglia e pelos astrócitos, bem como, por células que se infiltram, e que contribuem para uma grande variedade de doenças, como: a esclerose múltipla, transtornos do humor e doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer. A inflamação periférica é mediada, em parte, por monócitos e macrófagos, e a GSK3 favorece condições inflamatórias como colite e artrite. Inflamação local, como a produção de citocina pelos adipócitos, aparentemente contribui para o desenvolvimento da diabetes que pode ser exacerbada pela GSK3 ativa. A inflamação também pode contribuir para numerosos tipos de câncer.

Fonte: adaptada de Jope, Yuskaitis e Beurel (2007).

A identificação da GSK3 como a principal reguladora das respostas inflamatórias periféricas mostrou que ela promove a produção, induzida por estímulo, de várias citocinas e subsequente

desenvolvimento dos sintomas de doenças em modelos animais de condições inflamatórias. Este papel da GSK3 na inflamação foi primeiramente estabelecido pelo relato de que a atividade da GSK3 é necessária para a produção de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α , após estimulação de vários tipos de receptores da família *Toll-like* (2, 4 5 e 9) em leucócitos e em células mononucleares sanguíneas periféricas (MARTIN et al., 2005). De maneira inversa, a GSK3 reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Reciprocamente, os inibidores da GSK3 reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

De modo geral, é evidente que a GSK3 é um importante componente da resposta inflamatória e de que a administração de inibidores da GSK3 podem ter efeitos terapêuticos em várias condições associadas a inflamação. A aplicação desta estratégia terapêutica pode fornecer benefícios no tratamento de doenças crônicas que possuem um componente inflamatório (Tabela 1) (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Tabela 1. Patologias nas quais a inibição da GSK3 parece ser benéfica.

Patologia	Referência
Esclerose Múltipla	Beurel et al., 2013; Rowse et al., 2012; Beurel, 2011.
Doença de Alzheimer	Ly et al., 2013; Gao et al., 2011; Parr et al., 2012; Bolós; Fernandez; Torres-Aleman, 2010.
Depressão	Gould et al., 2004; Budni et al., 2012; Rosa et al., 2008.
Colite	Hofmann et al., 2010; Beurel; Michalek; Jope, 2010.
Artrite	Konda et al., 2010; Hu et al., 2006.
Câncer	Kim et al., 2013; Shimasaki et al., 2012; Bilim et al., 2009.
Diabetes	Gao et al., 2011; Liu et al., 2010; Chen et al., 2008.

Fonte: a autora (2013).

Outro alvo molecular da GSK3 é o receptor para o glutamato do tipo NMDA (CHEN et al., 2007), o principal subtipo de canal iônico ativado por ligante excitatório que está implicado em múltiplas funções neuronais, como: formação de sinapse, plasticidade sináptica, aprendizado e memória, transtornos mentais (TSAI; COYLE, 2002), doença de Alzheimer (SELKOE, 2002) e dor (MILLER et al., 2011; OSIKOWICZ; MIKA; PRZEWLOCKA, 2013). Chen et al., (2007)

constataram que inibindo a atividade da GSK3 tem-se a supressão da corrente do receptor NMDA através de mecanismos que envolvem a internalização do receptor supracitado.

A GSK3 também está relacionada à sinalização colinérgica (DE SARNO et al., 2006), serotoninérgica (ZHOU et al., 2012) e dopaminérgica (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007), cabe destacar que esses neurotransmissores participam do controle descendente da dor e que a inibição da atividade da GSK3 pode influenciar na transmissão e percepção do estímulo nociceptivo.

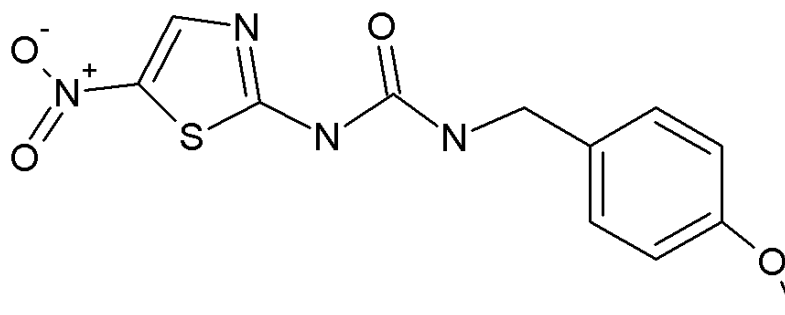
Outro intrigante efeito da atividade exacerbada da GSK3 é a promoção da apoptose neuronal induzida por estresse oxidativo (OLIANAS; DEDONI; ONALI, 2011). Por outro lado, a sua inibição fornece proteção contra os efeitos tóxicos de agentes, como o 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP) um inibidor seletivo do complexo I mitocondrial e a rotenona, que prejudicam a função mitocondrial (KING; BIJUR; JOPE, 2001).

Os alvos da GSK3 participam do processamento nociceptivo, como o receptor NMDA, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial e receptores para acetilcolina, serotonina, dopamina, considerando a sua importância decidiu-se testar o efeito de um inibidor dessa enzima (GSK3), o N-(4-Metoxibenzil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)uréia (AR-AO14418) em modelos de nocicepção em camundongos.

1.3 AR-A014418

Em 2003 Bhat et al. caracterizaram a estrutura molecular do AR-A014418, que está representada na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura molecular do AR-A014418.



Fonte: Martins et al. (2011).

O AR-A014418, inibe a atividade da GSK3 com $IC_{50}=104\pm 27$ nM, competindo pelo ATP ($K_i= 38$ nM), não inibe as cinases dependentes de ciclina (cdk) 2 e 5, além de outras 26 cinases avaliadas, demonstrando sua alta especificidade pela GSK3 (BHAT et al., 2003). A seguir estão relatadas as cinases que não foram inibidas pelo AR-A014418: proteína cinase ativada por AMP (AMPK), Cinase *checkpoint* (Chk), caseína cinase II (CKII), cinase N-terminal c-Jun (JNK), cinase c-Src de linfócito (Lck), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), cinase 2 S6 ribossomal (Rsk2), proteína cinase 2 ativada por proteína cinase ativada por mitógeno (MAPKAPK-2), proteína cinase ativada por mitógeno/cinase 1 regulada por sinal extracelular (MEK1), proteína cinase 1 ativada por estresse e mitógeno (MSK1), cinase S6 proteína ribossomal p70 (p70 S6K), proteína cinase 1 dependente de 3 fosfoinositol (PDK1), cinase fosforilase (PhosK), proteína cinase A (PKA), proteína cinase B (PKB), proteína cinase C (PKC), cinase ativada/regulada por p38 (PRAK), proteína cinase II dependente de Rho (ROCKII), proteína cinase ativada por estresse (SAPK 2a, 2b, 3 e 4),

cinase induzida por glicocorticóide e soro (SGK), cinase Src terminal carboxil (CSK), cinase 2 dependente de ciclina (Cdk2) e cinase 5 dependente de ciclina (Cdk5) (BHAT et al., 2003).

As análises cinéticas foram realizadas usando combinações de seis diferentes concentrações de ATP até 200 μM ($K_m \sim 20 \mu\text{M}$) e seis concentrações do inibidor de 0 a 40 vezes dos valores da IC_{50} do inibidor, até 4 μM . O AR-A014418 apresentou um mecanismo de inibição consistente com competição pelo ATP e um valor de K_i de 38 nM (BHAT et al., 2003).

Bah et al. (2003) mostraram a co-cristalização do AR-A014418 com a proteína GSK3 e forneceram uma descrição das interações com o sítio do ATP, bem como um entendimento da base estrutural para a seletividade deste inibidor.

Embora não exista nenhum dado farmacocinético do AR-A014418 em humanos, concentrações plasmáticas de 3,75 μM de AR-A014418 foram medidas com dosagem oral de 1 $\mu\text{mol/kg}$ em ratos Sprague Dawley e doses bem maiores (10 vezes mais) foram utilizadas sem relatos de toxicidade (MEDINA; AVILA, 2010; GOULD et al., 2004; ROVEDO; KRETT; ROSEN, 2011).

Outra informação relevante é que o AR-A014418 atravessa a barreira hematoencefálica (KALINICHEV; DAWSON, 2011).

Após a caracterização do AR-A014418 e a comprovação de algumas de suas atividades, como por exemplo: inibição da fosforilação da proteína tau; inibição da neurodegeneração mediada pelo peptídeo β -amilóide em fatias de hipocampo (BHAT et al., 2003); atraso no aparecimento dos sintomas de esclerose lateral amiotrófica e aumento da sobrevivência de camundongos (KOH et al., 2007); inibição da proliferação

e aumento da apoptose de células de câncer de cólon (SHAKOORI et al., 2007); efeito tipo antidepressivo no modelo do teste do nado forçado (GOULD et al., 2004; BUDNI et al., 2012; ROSA et al., 2008), cogitou-se as suas importantes aplicações clínicas como uma ferramenta para elucidar os papéis da GSK3 na sinalização celular e seu envolvimento em doenças nas quais a atividade desta enzima está aumentada (BHAT et al., 2003; KOH et al., 2007; SHAKOORI et al., 2007; GOULD et al., 2004). Neste trabalho nossa principal tarefa foi averiguar se o inibidor da GSK3, o AR-A014418 poderia exercer efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda e crônica realizados em camundongos.

1.4 JUSTIFICATIVA

A descoberta de que a GSK3 regula positivamente o processo inflamatório e age sobre receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA nos levou a supor que ela poderia participar dos mecanismos envolvidos na nocicepção. Nossa suposição foi reforçada pelos experimentos que demonstraram que a utilização de um inibidor desta enzima (AR-A014418) em animais apresentou um importante efeito antidepressivo, considerando que a depressão e a dor compartilham muitos mecanismos neuroquímicos este inibidor poderia apresentar efeito antinociceptivo em modelos clássicos de nocicepção aguda e crônica em camundongos.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da inibição da GSK3 na nocicepção aguda e crônica e analisar os mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

1.5.2 Objetivos específicos

- i) Avaliar a influência da administração i.p. de AR-A014418 ou NP031115 em modelos animais de nocicepção aguda;
- ii) Verificar a influência do AR-A014418 administrado em diferentes sítios (periférico e central) em modelos de nocicepção aguda;
- iii) Avaliar a influência da co-administração de AR-A014418 com agonistas de receptores glutamatérgicos e citocinas pró-inflamatórias;
- iv) Observar a influência da administração i.p. de AR-A014418 em um modelo animal de nocicepção crônica;
- v) Analisar os mecanismos de ação do efeito do AR-A014418 na nocicepção crônica;
- vi) Verificar a influência da administração i.p. de AR-A014418 na atividade locomotora de camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Para realização dos experimentos utilizou-se camundongos Swiss machos de aproximadamente 2 meses de idade, pesando entre 25-35g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mediante aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) desta mesma Universidade (PP00525 e 2011.0407).

Após a chegada dos camundongos em nosso laboratório eles foram armazenados em caixas de polipropileno com diâmetro de 41x34x16cm, com tampa superior de aço inox contendo um frasco de polipropileno com água (500 ml) e espaço para armazenar ração, acomodadas em estantes ventiladas da marca Alesco. O número de animais foi limitado a 15 por caixa, proporcionando um alojamento cômodo dentro da área exigida para esta espécie. Os roedores foram ambientados por, pelo menos, uma semana em nosso biotério antes de serem utilizados nos experimentos, que foram realizados das 8:00 às 14:00 horas. Os animais permaneceram em um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (luzes acesas às 6:00 horas), receberam água e comida à vontade e a temperatura foi mantida em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

2.2 MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

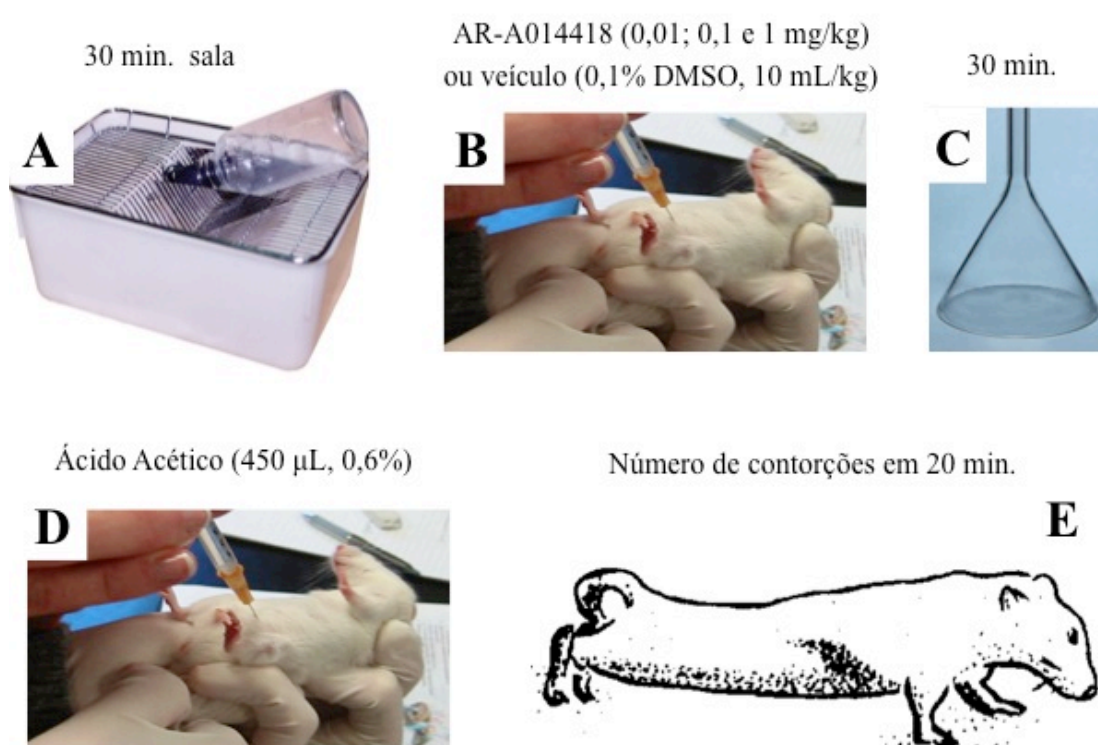
2.2.1 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Em todos os experimentos comportamentais os animais permaneceram na sala onde os mesmos foram executados por, pelo menos, uma hora antes dos testes. Eles foram colocados em um local apropriado para execução da avaliação nociceptiva, que variou dependendo da abordagem, foram estes: funil de vidro ou acrílico com tampa sobre a mesa de experimentos, acrílico com tampa sobre tela de metal (nos experimentos em que avaliamos a hiperalgesia ao estímulo mecânico) ou sobre a placa metálica (nos testes da placa quente e fria, em que avaliamos a hiperalgesia ao estímulo térmico).

No teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético os camundongos foram tratados pela via intraperitoneal (i.p.) com AR-A014418 (inibidor da GSK3), nas doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/kg ou com veículo (controle) (0,1% de dimetilsulfóxido [DMSO] diluído em uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, em um volume de 10 mL/kg). Após o tratamento cada camundongo foi colocado em um funil de vidro e permanecendo por 30 minutos para ambientação, depois deste período os roedores receberam uma injeção i.p. contendo um volume fixo de 450 µL de ácido acético, na concentração de 0,6% (DE MATTOS et al., 2007; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010). Após a injeção de ácido acético os animais retornaram ao funil de vidro e contabilizou-se, cumulativamente, o número das contorções abdominais realizadas em um período de 20 minutos, indicativas de nocicepção (Figura 15) (DE MATTOS et al., 2007; MAZZARDO-MARTINS et al., 2010). As contorções abdominais foram definidas como a contração da

musculatura abdominal e estiramento dos membros posteriores, como pode ser observado na Figura 15, painel E (GIAMBERARDINO et al., 1995).

Figura 15. Esquema demonstrando o experimento das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.



Legenda: No experimento das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético os animais permaneceram meia hora na sala de experimentos em suas caixas (A), receberam administração i.p. de AR-A014418 (doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg) ou de veículo (controle) (0,1% de DMSO diluído em solução de cloreto de sódio a 0,9%, volume de 10 mL/kg) (B). Após a administração cada animal foi colocado em um funil de vidro por meia hora (C). Passado este período eles receberam uma injeção intraperitoneal de ácido acético (volume fixo de 450 μ L, 0,6%) (D), voltaram ao funil para contagem cumulativa do número de contorções abdominais em 20 minutos, indicativa de nocicepção (E).

Fonte: autora (2013), exceto E – adaptada de Giamberardino et al. (1995).

A diminuição da nocicepção foi considerada como a redução do número das contorções abdominais quando os grupos tratados com o AR-A014418 foram comparados com o grupo controle, que recebeu apenas veículo.

2.2.2 Nocicepção induzida pela formalina

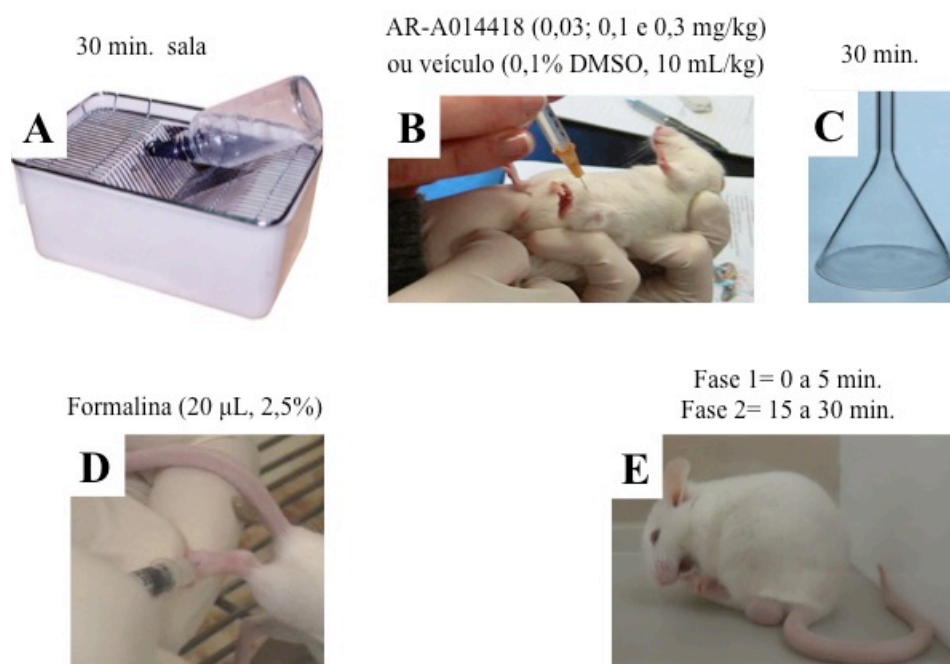
A nocicepção induzida pela administração subcutânea de formalina injetada na planta da pata posterior direita dos camundongos foi realizada conforme descrito por Hunskaar; Fasmer e Hole (1985). Cada camundongo permaneceu 30 minutos em um funil de vidro, após este período recebeu uma injeção de 20 μ L de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído em salina). Os animais retornaram para seus funis e foi contabilizado o tempo em que cada animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada com a agente causador do comportamento nociceptivo.

Este teste se caracteriza por duas fases, uma primeira ou nociceptiva e uma segunda ou inflamatória. Na primeira fase do teste contabiliza-se cumulativamente o tempo do comportamento indicativo de nocicepção nos primeiros 5 minutos após a administração da solução de formalina; esta fase foi seguida por um período em que o animal não expressou qualquer comportamento indicativo de nocicepção ou o mesmo encontrava-se extremamente diminuído. Na segunda fase do teste o comportamento nociceptivo dos mesmos animais foi avaliado, dos 15 aos 30 minutos após a administração da formalina, finalizando o teste (NUCCI et al., 2012).

O primeiro esquema de tratamento teve como principal objetivo averiguar se a administração i.p. do AR-A014418 diminui o

comportamento nociceptivo em animais submetidos ao teste de nocicepção induzido pela formalina. Desta forma os animais foram: tratados com AR-A014418 (0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg) ou veículo (controle) (0,1% de DMSO diluído em uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, 10 mL/kg); colocados individualmente em funis de vidro por 30 minutos; receberam a injeção de formalina na pata posterior direita (subcutânea); retornaram ao funil e contabilizamos o comportamento indicativo de nocicepção (Figura 16).

Figura 16. Esquema da administração intraperitoneal do AR-A014418 ou veículo no teste de nocicepção induzido pela formalina.

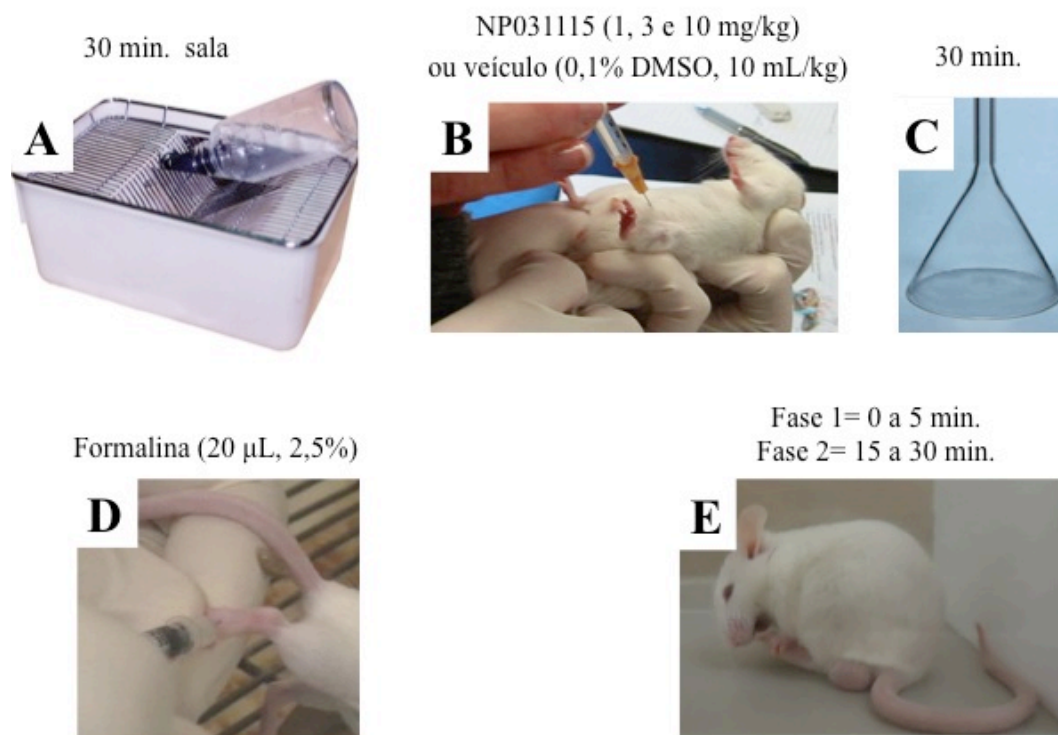


Legenda: Os animais permaneceram 30 minutos na sala de experimentos (A) antes de receberem a injeção i.p. de AR-A014418 (0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg) ou de veículo (controle) (0,1% de DMSO, 10 mL/kg) (B), após o procedimento descrito acima eles foram colocados individualmente em funis de vidro por 30 minutos (C), decorrido este tempo os roedores receberam injeção de formalina na pata posterior direita (20 µL, 2,5%) (D) e nós contabilizamos o tempo em que os animais morderam e/ou lamberam o membro inferior injetado dos 0-5 minutos e dos 15-30 minutos (E).

Fonte: autora (2013).

Com o intuito de obtermos informações adicionais e corroborar o envolvimento da GSK3 na nocicepção, os animais foram tratados, também sistemicamente, com outro inibidor desta enzima, o NP031115, uma tiadiazolidinona (ver Figura 17).

Figura 17. Esquema da administração sistêmica do NP031115 ou veículo no teste de nocicepção induzida pela formalina.

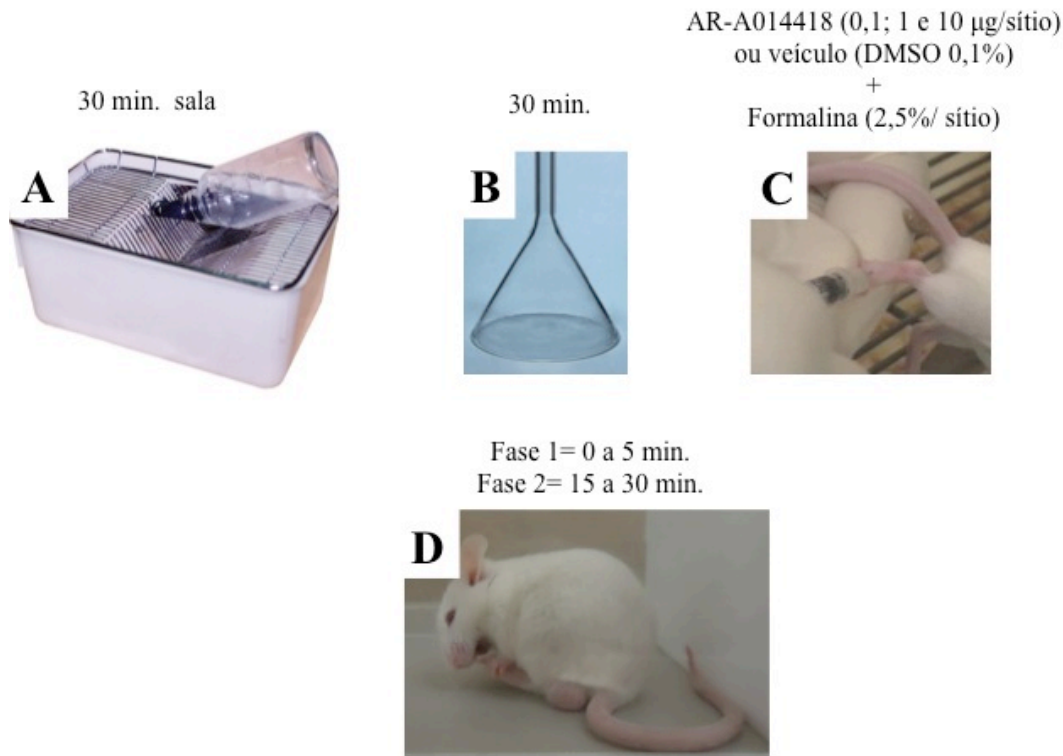


Legenda: Trinta minutos após ambientação na sala de experimentos (A) os animais receberam uma injeção i.p. de NP031115 (1, 3 e 10 mg/kg) ou veículo (controle) (0,1% de DMSO, 10 mL/kg) (B) e foram colocados em funis de vidro (C), após 30 minutos eles foram submetidos a injeção de formalina (20 µL, 2,5%) na região subcutânea da pata posterior direita (D) e o tempo em que os animais permaneceram lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi indicativo de nocicepção (E).

Fonte: autora (2013).

Após a realização destes experimentos iniciais, nos quais os inibidores da GSK3 foram administrados sistemicamente (AR-A014418 e NP031115), a próxima pergunta a ser respondida foi sobre o sítio (local) em que o AR-A014418 poderia exercer seu efeito de diminuir a nocicepção, periférica ou centralmente. Desta forma, o próximo passo foi injetar o AR-A014418 (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/sítio}$) na região subcutânea da pata posterior direita dos animais, juntamente com a formalina (2,5% /sítio) (Figura 18).

Figura 18. Esquema da co-administração de AR-A014418 ou veículo com formalina na pata posterior de camundongos.



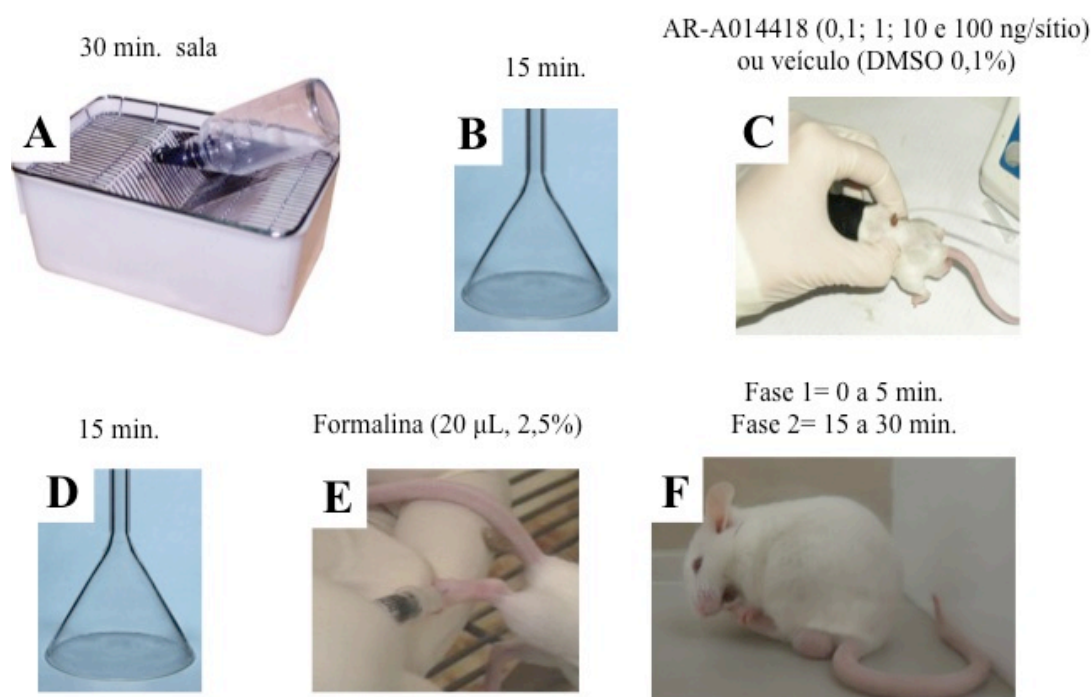
Legenda: Os animais permaneceram em suas caixas, na sala de experimentos, por 30 minutos (A). Após este período eles foram colocados individualmente em funis de vidro (B) e, passada meia hora, receberam uma única injeção de AR-A014418 (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/sítio}$) ou veículo (0,1% de DMSO) juntamente com formalina (2,5% /sítio) na região subcutânea da pata posterior direita (C). Findado o procedimento cada animal retornou para seu funil e o experimentador contabilizou o tempo em que o animal exibiu o comportamento indicativo de nocicepção (0-5 minutos e 15-30 minutos após a injeção) (D). Observação: note que o volume administrado na pata dos camundongos (sítio) foi de 20 μL .

Fonte: autora (2013).

O próximo objetivo foi demonstrar se o AR-A014418 diminui a nocicepção quando administrado na região subaracnóidea (espinal, lombar) de camundongos, portanto, centralmente. Para cumprir com este objetivo os animais receberam AR-A014418 (0,1, 1, 10 e 100 ng/sítio) e

após 15 minutos foi administrada uma injeção de formalina (2,5%/sítio) na pata dos animais (Figura 19).

Figura 19. Esquema da administração no espaço subaracnóideo lombar de AR-A014418 ou veículo 15 minutos antes da injeção de formalina na pata de camundongos.



Legenda: Os animais permaneceram em suas caixas durante 30 minutos, na sala de experimentos (A); posteriormente, os roedores foram colocados individualmente em funis de vidro por 15 minutos (B), decorrido este intervalo de tempo eles receberam injeção subaracnóidea de AR-A014418 (0,1; 1; 10 e 100 ng/sítio) ou veículo (0,1% de DMSO) (C) e retornaram aos funis (D). Após 15 minutos os camundongos receberam injeção subcutânea de formalina (2,5%/sítio) na pata posterior direita (E) e a resposta indicativa de nocicepção foi avaliada por 30 minutos (F).

Fonte: autora (2013).

A injeção no espaço subaracnóideo lombar foi realizada em animais conscientes. Os camundongos foram gentilmente retirados de seus funis, sua cabeça e a região anterior do tronco foram mantidas dentro de um cilindro plástico confeccionado a partir da união de dois

tubos para filme de máquina fotográfica (com orifícios na parte anterior para fornecer ventilação), o fundo de um deles foi retirado para que pudesse ser encaixado no outro. Uma agulha de calibre 30 foi conectada a uma extremidade de um fino tubo de polietileno, com comprimento de 10 cm, a outra extremidade do tubo foi acoplada a uma seringa Hamilton com capacidade para 25 μ L. O experimentador realizou flexão da coluna vertebral do animal, estabilizando-a na região superior às cristas ilíacas. Com a outra mão a agulha foi inserida na pele, entre as lâminas dos arcos das vértebras L5-L6, até atingir o espaço subaracnóideo. Após a penetração da agulha no espaço supracitado, o animal apresentou um comportamento reflexo de mexer a cauda em “S”, característico desta via de administração, sendo este um sinal que demonstrou o sucesso do procedimento (CÓRDOVA et al., 2013). É importante mencionar que nesta região onde a injeção foi realizada é onde se encontra a cauda eqüina, não havendo a presença da medula espinal, que termina superiormente; portanto, o animal não apresentou déficit locomotor após o procedimento. O volume de cada injeção, 5 μ L, foi administrado lentamente, com duração de 5 segundos (Figura 19).

Relatos da literatura demonstram que a transmissão das aferências nociceptivas nos testes comportamentais utilizados até o presente momento neste estudo, o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e a nocicepção induzida pela formalina, ocorre por intermédio da ativação do sistema glutamatérgico e das citocinas pró-inflamatórias na medula espinal (OKUDA et al., 1984; SCHAIBLE; SCHMIDT, 1985, CASTILLO et al., 1995; THOMAZZI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2000; MALMBERG et al., 1997). Considerando a relevante contribuição deste neurotransmissor

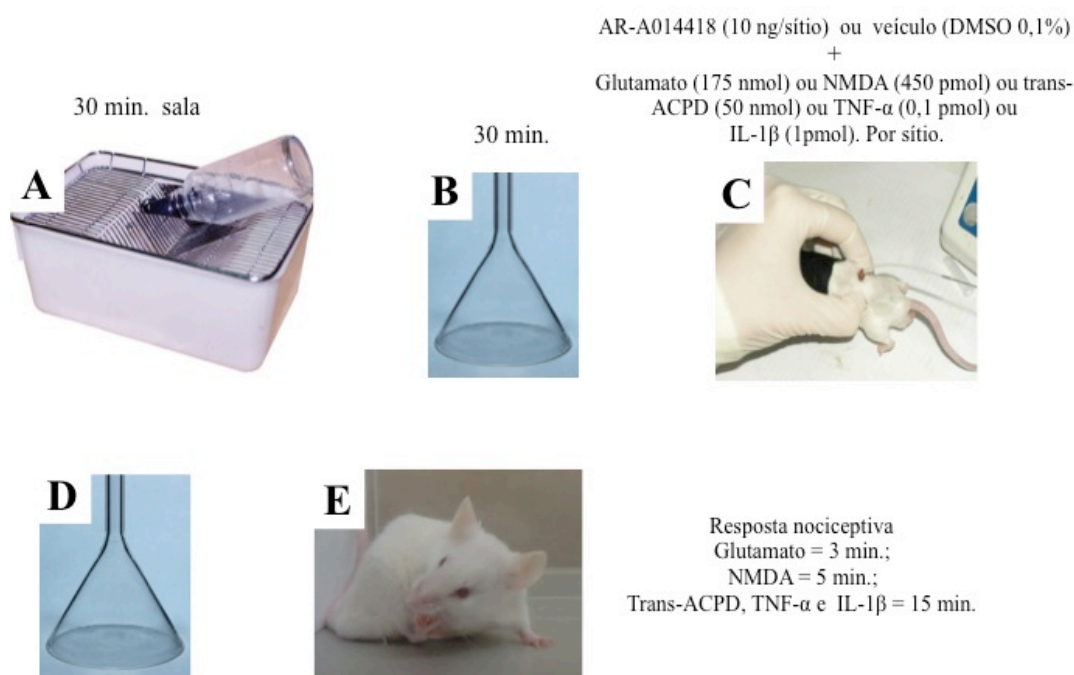
excitatório e das citocinas pró-inflamatórias na nocicepção, nosso próximo objetivo foi investigar se a administração do AR-A014418 seria capaz de modificar a nocicepção ocasionada pela administração espinal de glutamato, agonistas de receptores NMDA, agonistas de receptores trans-ACPD e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , descritas no próximo item.

2.2.3 Nocicepção induzida pela administração no espaço subaracnóideo de glutamato, NMDA, Trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β

Este experimento foi realizado da seguinte maneira: os animais foram conduzidos do biotério para a sala de experimentos, permanecendo por 30 minutos em sua caixa. Posteriormente foram colocados em funis de vidro, cada animal em um funil, por 30 minutos. Após este período de tempo o camundongo foi submetido à uma injeção no espaço subaracnóideo, que foi descrita em detalhes no item acima. O conteúdo da injeção foi: AR-A014418 (10 ng/sítio) ou veículo (0,1% de DMSO, 5 μ L) juntamente com glutamato (175 nmol/sítio), NMDA (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (50 nmol/sítio) ou TNF- α (0,1 pmol) ou IL-1 β (1 pmol) (DAL-BÓ et al., 2012; CÓRDOVA et al., 2013). Após a injeção os animais foram colocados novamente nos funis de vidro e o comportamento indicativo de nocicepção foi avaliado por diferentes intervalos de tempo, dependendo do agente causador de nocicepção utilizado na administração: glutamato por 3 minutos; NMDA por 5 minutos; trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β por 15 minutos (Figura 20) (CÓRDOVA et al., 2013; DAL-BÓ et al., 2012). Neste experimento o comportamento indicativo de nocicepção apresentado pelo animal foi considerado como o tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou

mordendo a região do tronco inferior ao local da injeção, pelve, os membros posteriores e a cauda (DAL-BÓ et al., 2012; CÓRDOVA et al., 2013) (Figura 20).

Figura 20. Esquema da co-administração de AR-A014418 ou veículo com agonistas dos receptores glutamatérgicos ou citocinas pró-inflamatórias no espaço subaracnóideo.



Legenda: Os animais permaneceram 30 minutos na sala de experimentos (A), posteriormente foram colocados, individualmente, em funis de vidro por 30 minutos (B). Decorrido este tempo os camundongos foram gentilmente mantidos dentro de um cilindro plástico, foi realizada flexão da coluna vertebral dos roedores e eles foram imobilizados superiormente às cristas ilíacas. A agulha acoplada a seringa Hamilton foi inserida entre as lâminas dos arcos das vértebras L5-L6 até atingir o espaço subaracnóideo (C). Os roedores receberam co-administração de AR-A014418 (10 ng/sítio) ou veículo (0,1% de DMSO) e glutamato (175 nmol/sítio) ou NMDA (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (50 nmol/sítio) ou TNF- α (0,1 pmol/sítio) ou IL-1 β (1 pmol). Retornaram aos funis (D) e a resposta nociceptiva foi avaliada por: 3 minutos após a injeção de glutamato, 5 minutos após a administração de NMDA e por 15 minutos após a injeção de trans-ACPD, TNF- α e IL-1 β (E). O volume de líquido administrado na coluna lombar no espaço subaracnóideo foi de 5 μ L.

Fonte: autora (2013).

2.2.4 Análise estatística dos experimentos de nociceção aguda

Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (E.P.M.), exceto para os valores da DI_{50} (doses do AR-A014418 ou do NP031115 necessárias para reduzir a resposta nociceptiva em 50%, quando comparados ao grupo controle), que foi expressa como a média geométrica acompanhada pelo limite de confiança de 95%. Os valores da DI_{50} foram determinados por regressão não-linear utilizando o programa de computador GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). As comparações entre os grupos experimental e controle foram realizadas pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman Keuls, quando apropriado. Nos experimentos em que avaliamos o efeito de agonistas glutamatérgicos e citocinas pró-inflamatórias espinalmente utilizamos o teste t de Student. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

Este item descreve a análise estatística utilizada nos experimentos citados até o presente momento, que foram agrupados em um artigo científico (MARTINS et al., 2011).

2.2.5 Substâncias utilizadas nos experimentos de nociceção aguda

Formaldeído, ácido acético e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Merk A. G. (Darmstadt, Alemanha). Ácido L-glutâmico e AR-A014418 (N-(4-metoxibenzil)-NO-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)uréia) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). N-metil-D-aspartato (NMDA) e (6)-1-aminociclopentano-trans-1,3 ácido dicarboxílico (trans-ACPD) (Tocris Cookson (Bristol, UK). Interleucina 1β e fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram obtidas da R&D Systems (Minneapolis, MN).

Finalmente o NP031115 (4(4-cloro-fenil)-2-metil-[1,2,4]tiadiazolidine-3,5-dione) Noscira (Tres Cantos, Espanha), respectivamente. Todas as substâncias foram dissolvidas em solução salina (NaCl a 0,9%), exceto para o AR-A014418 e NP031115 que foram dissolvidos em salina em uma concentração final de 0,1% de DMSO. As substâncias foram administradas intraperitoneal em um volume constante de 10 mL/kg de peso corporal.

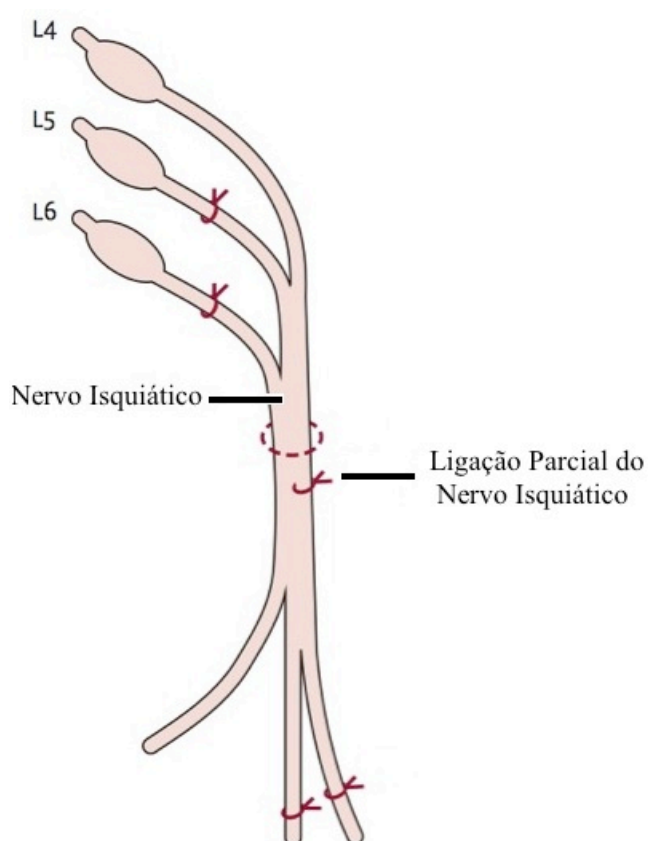
2.3 MODELO DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA

2.3.1 Ligação parcial do nervo isquiático (PSNL)

O procedimento cirúrgico de PSNL foi semelhante ao descrito por Malmberg e Basbaum (1998). Os animais foram anestesiados com uma injeção de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) administrada no peritônio dos camundongos. Após a verificação do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área que foi operada (coxa direita). Em seguida, fez-se uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, que iniciou acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminou próximo à fossa poplítea, na inserção dos músculos isquiotibiais. A exposição do nervo isquiático foi conseguida após a divulsão muscular (músculo bíceps femoral). Utilizamos um fio de sutura 9-0 para ligar $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ do diâmetro do nervo isquiático (Figura 21). Nos animais falso-operados o nervo foi exposto, mas não foi ligado. Logo após, a incisão na pele foi reparada com 2 pontos de sutura com fio absorvível (5-0) e realizada a assepsia no local com antisséptico

(Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada acesa como fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do laboratório.

Figura 21. Figura demonstrando o modelo da ligação parcial do nervo isquiático.



Legenda: O modelo da ligação parcial do nervo isquiático (PSNL) foi realizado ligando $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{3}$ do diâmetro da porção distal do nervo isquiático de camundongos.

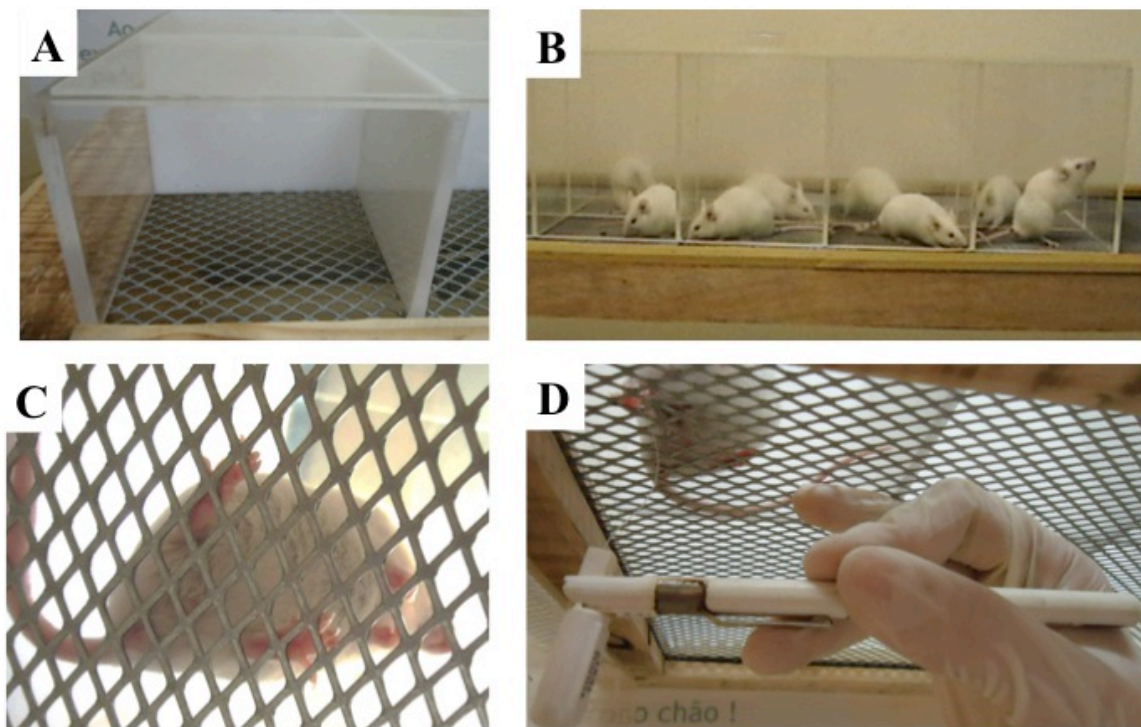
Fonte: adaptada de Calvo; Dawes e Bennett (2012).

2.3.1.1 Mensuração da hiperalgesia ao estímulo mecânico

Os camundongos foram colocados individualmente em acrílicos com tampa contendo 15 lugares, cada compartimento media 9x7x11cm e foi ocupado por um animal. O acrílico repousou sobre uma malha metálica de uma plataforma de madeira, elevada do solo, que permitiu ao pesquisador o livre acesso à superfície plantar da pata posterior direita dos animais (BOBINSKI et al., 2011).

Os roedores permaneceram por aproximadamente uma hora no acrílico, até que o comportamento exploratório cessasse para a avaliação do comportamento nociceptivo. A resposta ao estímulo mecânico foi efetuada da seguinte maneira: um filamento de von Frey com carga de 0,4g (Stoelting, Chicago, IL) foi aplicado perpendicularmente na superfície ventral da pata posterior direita dos animais (região proximal aos dedos, metacarpo), foi mantido por 3 segundos e a aplicação foi repetida 10 vezes, com intervalo de 1 minuto entre elas (Figura 22). A pressão aplicada foi suficiente para promover a curvatura do filamento utilizado. A resposta foi considerada positiva quando, após o estímulo com o filamento, o animal retirou completamente a pata da grade metálica. O resultado foi expresso como a porcentagem de retirada da pata frente ao estímulo mecânico, por exemplo, se em 10 aplicações o animal retirou a pata da grade metálica 7 vezes, o resultado para este animal foi de 70% (BOBINSKI et al., 2011).

Figura 22. Esquema demonstrando como foi realizada a avaliação ao estímulo mecânico.



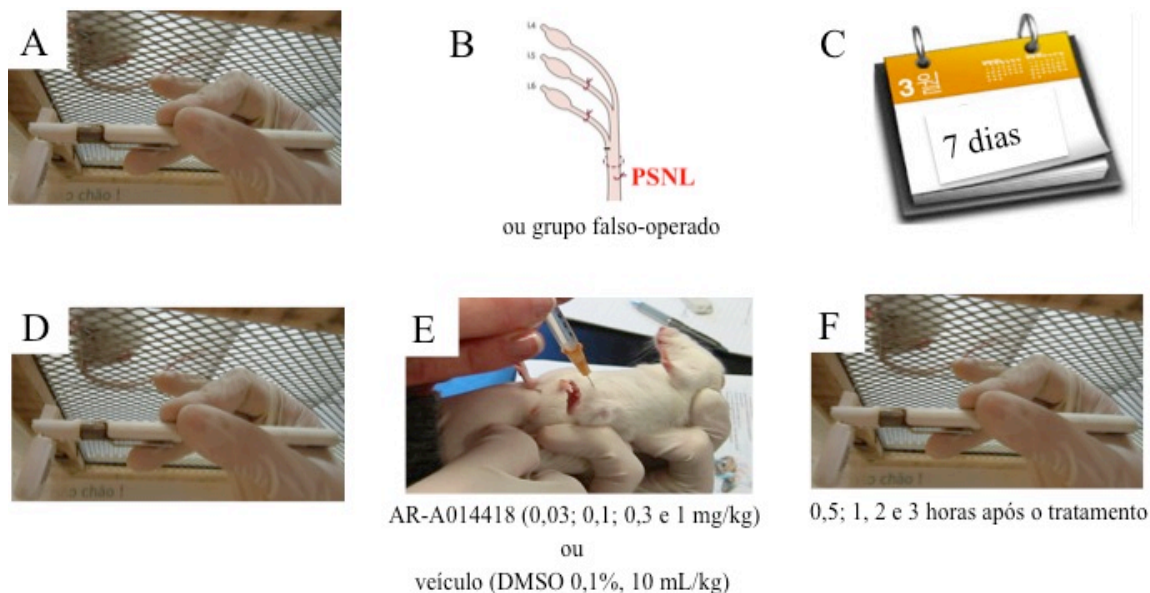
Legenda: Os animais foram colocados em um compartimento de um acrílico com tampa, que repousou sobre uma plataforma cujo teto era composto por uma malha de metal (A e B), permitindo o livre acesso da superfície ventral da pata posterior direita dos animais (C). Após uma hora de ambientação o filamento de von Frey com carga de 0,4g foi aplicado perpendicularmente (D) até a curvatura do mesmo, e a resposta nociceptiva ao estímulo mecânico foi mensurada, esse procedimento foi repetido por 10 vezes.

Fonte: autora (2013).

O limiar mecânico dos animais foi avaliado antes do procedimento cirúrgico. Posteriormente eles foram submetidos a PSNL ou exposição do nervo isquiático e foram conduzidos até o biotério. 7 dias após a cirurgia o limiar mecânico dos animais foi novamente avaliado, e os mesmos foram divididos homogeneamente entre os grupos que, após esta avaliação, receberam injeção intraperitoneal contendo AR-A014418 (0,03, 0,1, 0,3 e 1 mg/kg) ou veículo (0,1% de

DMSO diluído em solução de NaCl a 0,9%). Após a administração das substâncias eles retornaram para seus acrílicos e o teste de hiperalgesia ao estímulo mecânico foi novamente realizado nos seguintes tempos: 0,5, 1, 2 e 3 horas após o tratamento (Figura 23).

Figura 23. Esquema da curva dose-resposta do AR-A014418 no teste de hiperalgesia ao estímulo mecânico.



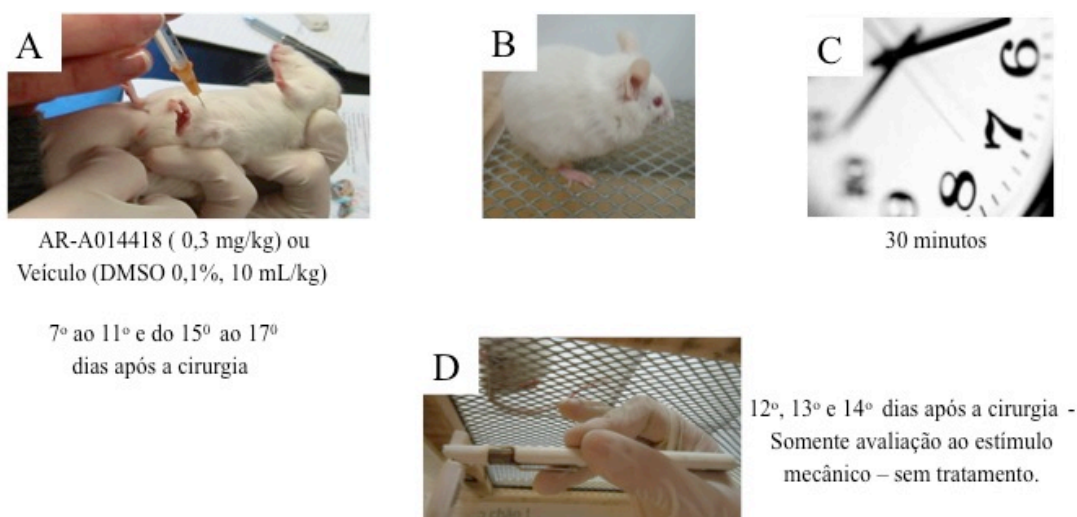
Legenda: O limiar ao estímulo mecânico dos animais foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (A). Posteriormente, os animais foram submetidos à PSNL ou somente à exposição do nervo, sem ligação (grupo falso-operado) (B), conduzidos ao biotério por 7 dias (C). No sétimo dia após a cirurgia o limiar mecânico foi novamente avaliado (D) e os animais foram divididos homogeneamente nos grupos que, logo em seguida, receberam injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,03, 0,1, 0,3 e 1 mg/kg) ou veículo (0,1% de DMSO, 10 mL/kg) (E). Os animais foram colocados novamente no acrílico o limiar mecânico foi novamente avaliado 0,5, 1, 2 e 3 horas após o tratamento (F).

Fonte: autora (2013).

Após a realização do experimento supracitado foi escolhida uma dose do AR-A014418 que apresentou um efeito significativo em diminuir a nocicepção dos camundongos frente ao estímulo mecânico.

Os animais foram tratados com essa dose (0,3 mg/kg, i.p.) ou com veículo (0,1% de DMSO, 10 mL/kg, i.p.) diariamente, do 7º ao 11º dia após a cirurgia, o tratamento foi interrompido por 3 dias (do 12º ao 14º dia após o procedimento cirúrgico) e retomado por mais 3 dias (do 15º ao 17º dia após a PSNL). As avaliações utilizando o filamento de von Frey foram iniciadas meia hora após o tratamento (Figura 24).

Figura 24. Esquema do tratamento diário com AR-A014418 ou veículo após a PSNL.



Legenda: Os camundongos (submetidos à PSNL ou exposição do nervo) receberam injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou veículo (0,1% de DMSO, 10 mL/kg) do 7º ao 11º e do 15º ao 17º dia após o procedimento cirúrgico (A), foram colocados no acrílico sobre a malha de metal (B) e, meia hora após (C), o limiar mecânico dos roedores foi avaliado (D). No 12º, 13º e 14º dia os animais não receberam injeção intraperitoneal, somente o limiar ao estímulo mecânico foi avaliado.

Fonte: a autora (2013).

2.3.1.2 Mensuração da hiperalgesia ao estímulo térmico

Para avaliar a hiperalgesia ao estímulo ao térmico ao frio e ao calor utilizamos a Placa Quente/Fria (AVS projetos, Mod AVS-CQS, SP, Brasil). Conforme descrito a seguir.

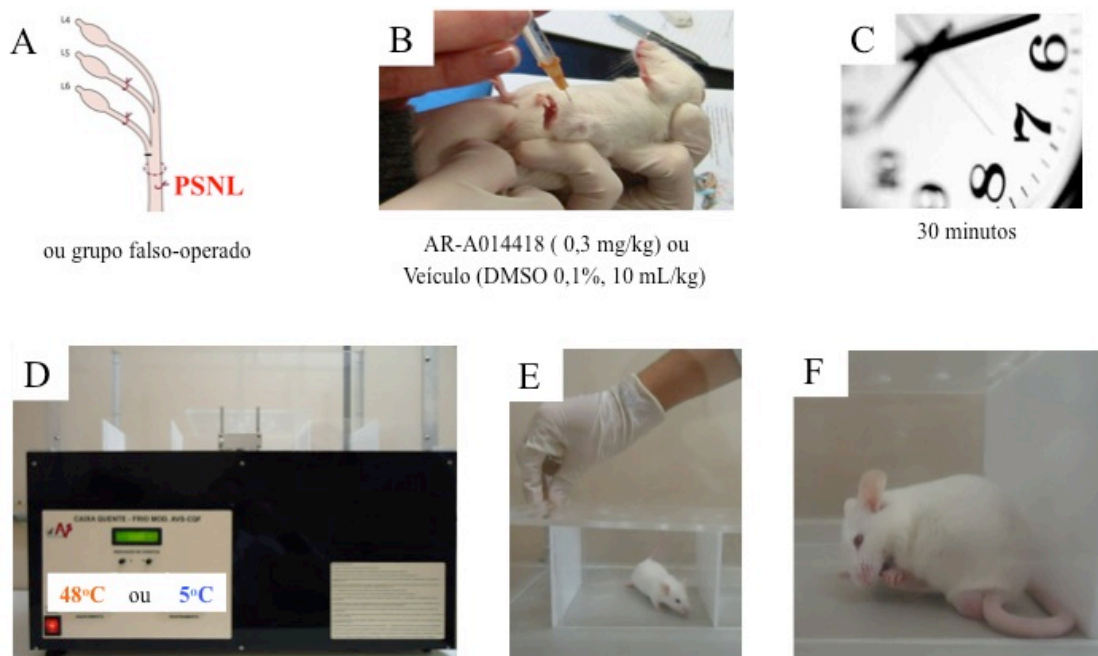
2.3.1.2.1 Teste da placa quente

Sete dias após o procedimento cirúrgico os grupos de animais: (i) falso-operado + injeção intraperitoneal contendo veículo (10 mL/kg); (ii) falso-operado + injeção intraperitoneal contendo AR-A014418 (0,3 mg/kg); (iii) PSNL + injeção intraperitoneal contendo veículo (10 mL/kg) e (iv) PSNL+ injeção intraperitoneal contendo AR-A014418 (0,3 mg/kg) foram colocados sobre uma placa metálica pré-aquecida a 48°C, em um acrílico com tampa, 30 minutos após os tratamentos (injeções intraperitoneais). Contabilizamos a latência para a retirada da pata posterior direita da placa. O tempo de corte para evitar lesão tecidual foi de 60 segundos (Figura 25) (CAVANAUGH et al., 2009).

2.3.1.2.2 Teste da placa fria

Os grupos de animais avaliados foram os mesmos citados no item anterior (2.3.1.2.1). Os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio na temperatura de 5°C. A latência para a retirada da pata posterior direita foi avaliada. O tempo de corte para evitar dano tecidual foi de 150s (AKIYAMA et al., 2010) (Figura 25).

Figura 25. Esquema dos experimentos realizados para mensuração da hiperalgesia ao estímulo ao calor e ao frio.



Legenda: Sete dias após os camundongos terem sido submetidos ao procedimento cirúrgico (A) (PSNL e falso-operados) eles receberam injeções intraperitoneais de AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) (B) e meia hora após (C) foram colocados sobre a placa quente (mantida a 48°C) ou sobre a placa fria (5°C) (diferentes grupos de animais) (D) em um acrílico com tampa (E). Observamos a latência para retirada da pata posterior direita dos animais da placa (F).
Fonte: autora (2013).

Como os animais tratados pela via i.p. com AR-A014418 apresentaram uma significativa diminuição da nocicepção ocasionada pela PSNL, prosseguimos com os experimentos, desta vez, com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos neste efeito, que serão descritos nos itens subsequentes.

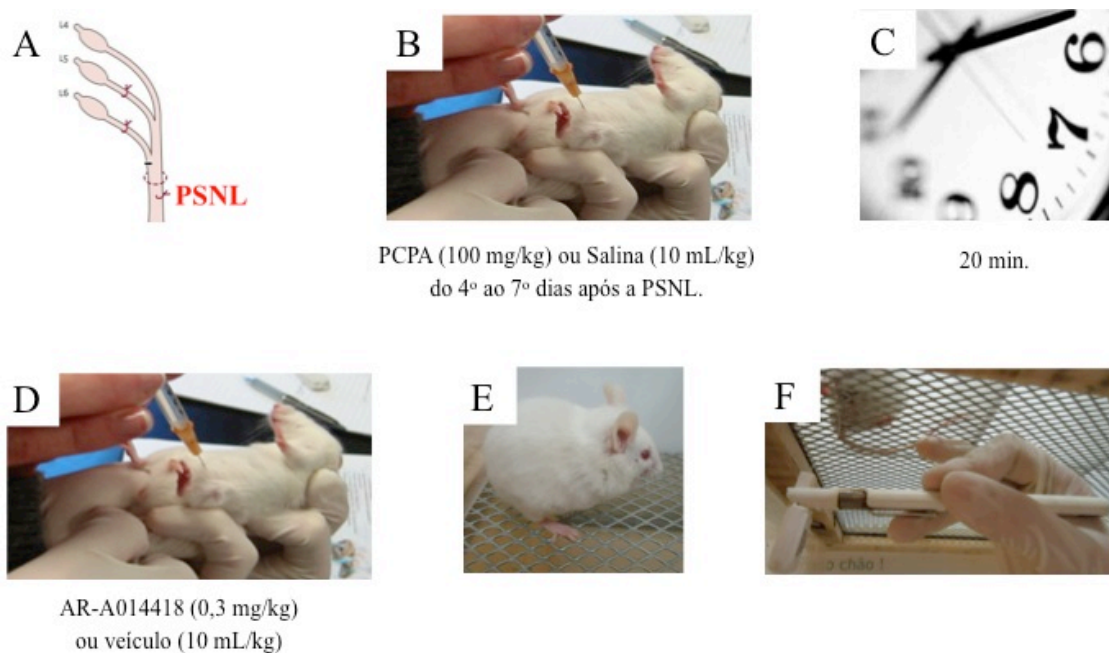
2.3.1.3 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.

Com o intuito de avaliar a possível contribuição da serotonina endógena no efeito de diminuir a nocicepção ocasionado pelo AR-A014418, os animais receberam injeções intraperitoneais de ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg), um inibidor da síntese de serotonina; ou de salina (10 mL/kg), uma vez ao dia, por quatro dias consecutivos, do 4^o ao 7^o dias após o procedimento cirúrgico (CUNHA et al., 2013). Decorridos 20 minutos da última administração os animais receberam injeções de AR-A014418, veículo, morfina ou salina e 30 minutos após as administrações a hiperalgesia mecânica foi avaliada.

Neste experimento avaliamos os seguintes grupos: (i) salina (10 mL/kg, i.p.) + salina (10 mL/kg, subcutânea (s.c.)); (ii) PCPA (100 mg/kg, i.p.) + salina (10 mL/kg, s.c.); (iii) salina (10 mL/kg, i.p.) + morfina (5 mg/kg, s.c.) e (iv) PCPA (100 mg/kg, i.p.) + morfina (5 mg/kg, s.c.). A principal pergunta a ser respondida com este experimento é se o tratamento dos animais com morfina pode ser prevenido quando os animais receberam injeções prévias de PCPA.

Realizamos outro experimento, agora para averiguar se o pré-tratamento dos animais com PCPA seria capaz de prevenir o efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção dos animais submetidos a PSNL. Os grupos avaliados foram: (i) salina (10 mL/kg, i.p.) + veículo (10 mL/kg, i.p.); (ii) PCPA (100 mg/kg, i.p.) + veículo (10 mL/kg, i.p.); (iii) salina (10 mL/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) e (iv) PCPA (100 mg/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) (Figura 26).

Figura 26. Experimento realizado para a avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.



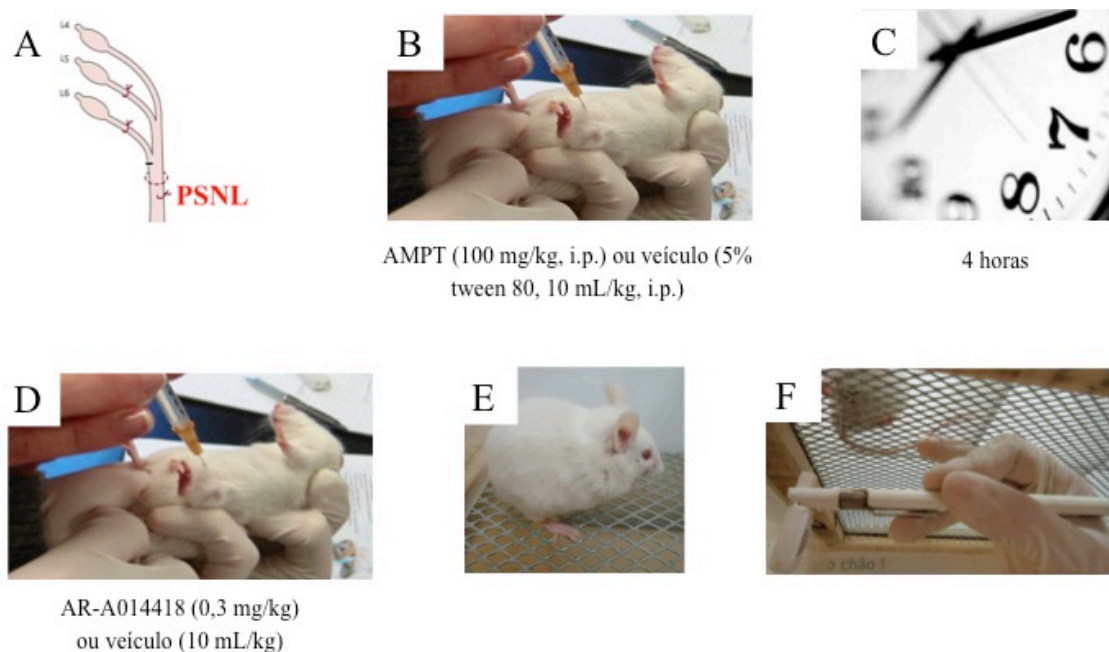
Legenda: Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de PSNL (A). Do 4º ao 7º dias após a cirurgia eles receberam injeções intraperitoneais diárias de PCPA (100 mg/kg) ou de salina (10 mL/kg) (B). Decorridos 20 minutos da última injeção (C) os animais receberam mais uma injeção intraperitoneal contendo AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) (D) e foram colocados em acrílicos cujo assoalho era uma malha de metal (E). Após 30 minutos a nocicepção ao estímulo mecânico foi avaliada (F).

Fonte: autora (2013).

2.3.1.4 Envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.

Para verificar o envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção, no 7º dia após a PSNL os animais foram tratados com α -metil-*p*-tirosina (AMPT, 100 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima tirosina hidroxilase ou com veículo (5% Tween 80 diluído em uma solução de NaCl a 0,9%, 10 mL/kg, i.p.) (KASTER et al., 2007; MACHADO et al., 2008). Quatro horas após a administração os animais receberam uma injeção de AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) ou de veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg). Meia hora após o último tratamento avaliou-se a hiperalgesia frente ao estímulo mecânico. Os grupos que compuseram este experimento foram: (i) veículo (5% Tween 80, 10 mL/kg, i.p.) + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); (ii) AMPT (100 mg/kg, i.p.) + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); (iii) veículo (5% Tween 80, 10 mL/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.); (iv) AMPT (100 mg/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) (Figura 27).

Figura 27. Experimento realizado para a avaliação do envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito do AR-A014418 em reduzir a nocicepção.



Legenda: Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de PSNL (A). No 7^o dia após a cirurgia eles receberam injeção intraperitoneal de AMPT (100 mg/kg) ou veículo (5% Tween 80, 10 mL/kg) (B). 4 horas após a administração (C) os camundongos receberam mais uma injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou de veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg) (D), os roedores foram colocados no acrílico que repousava sobre uma tela de metal e meia hora após a nocicepção ao estímulo mecânico foi avaliada.

Fonte: autora (2013).

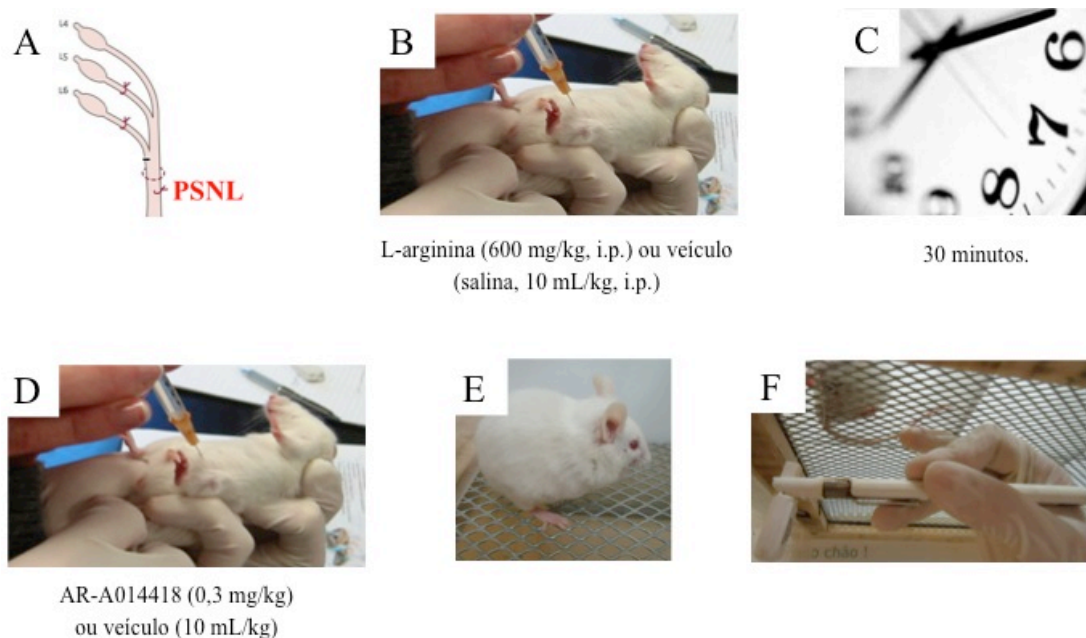
2.3.1.5 Participação da via do óxido nítrico no efeito do AR-A014418 em reduzir a nocicepção.

O envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico também foi avaliada no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção (ROSA et al., 2008). Decorridos 7 dias da cirurgia os animais foram tratados pela via intraperitoneal com L-arginina (600 mg/kg, um precursor do óxido

nítrico) ou com veículo (salina, 10 mL/kg). Vinte minutos após eles receberam AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) ou veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.) ou N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela síntese de óxido nítrico. A nocicepção ao estímulo mecânico foi avaliada 30 minutos após a última administração. Os seguintes grupos foram avaliados: (i) veículo (salina, 10 mL/kg, i.p.) + veículo (salina, 10 mL/kg); (ii) L-arginina (600 mg/kg, i.p.) + veículo (salina, 10 mL/kg, i.p.); (iii) veículo (salina, 10 mL/kg, i.p.) + L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) e (iv) L-arginina (600 mg/kg, i.p.) + L-NOARG (75 mg/kg, i.p.).

Em outro experimento os grupos avaliados foram: (i) veículo (salina, 10 mL/kg, i.p.) + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); (ii) L-arginina (600 mg/kg, i.p.) + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); (iii) veículo (salina, 10 mL/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) e (iv) L-arginina (600 mg/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) (Figura 28).

Figura 28. Avaliação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.



Legenda: Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de PSNL (A). No 7º dia após a cirurgia eles receberam injeção intraperitoneal de L-arginina (600 mg/kg) ou veículo (salina, 10 mL/kg) (B). 30 minutos após a administração (C) os camundongos receberam mais uma injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou de veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg) (D), os roedores foram colocados no acrílico que repousava sobre uma tela de metal (E) e meia hora após a nocicepção ao estímulo mecânico foi avaliada (F).

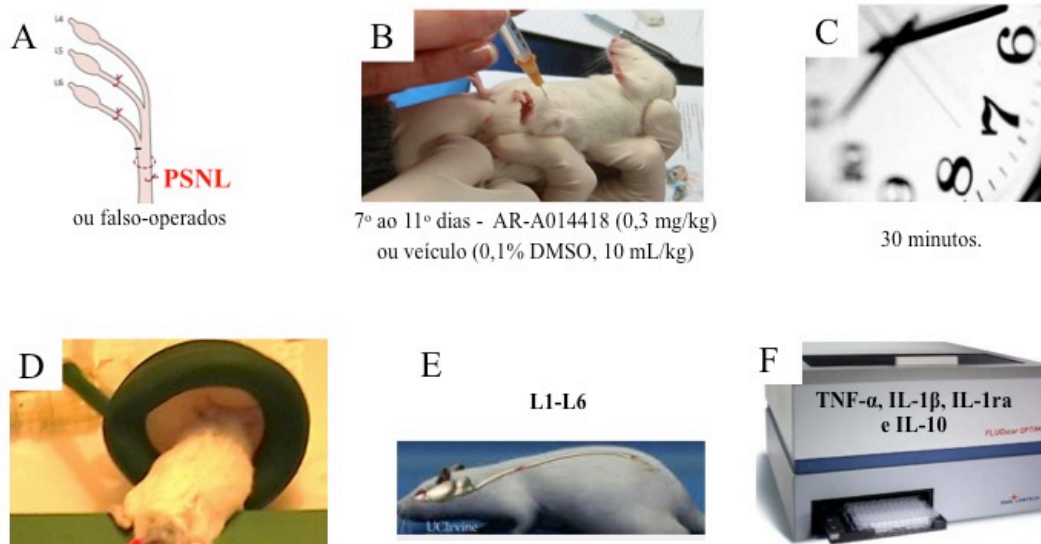
Fonte: autora (2013).

2.3.1.6 Mensuração dos níveis de citocinas na medula espinal

Os animais foram submetidos a PSNL ou a falsa-operação e do 7º ao 11º dia após a cirurgia foram tratados, uma vez ao dia, com veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.) ou AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.). 30 minutos após a última administração os camundongos foram anestesiados com isoflurano e a eutanásia foi realizada. A porção lombar da medula espinal (L1-L6) foi removida e homogeneizada com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de

fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/mL), cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi transferido para tubos Eppendorf, centrifugados a 3000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi estocado a -80°C até a realização das análises (BOBINSKI et al., 2011). A quantidade de proteína foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como um padrão. Um volume de 100 µL da amostra foi utilizado para mensurar os níveis espinais de TNF- α , IL-1 β , antagonista do receptor para IL-1 (IL-1ra) e IL-10 usando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas de camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância para todas as citocinas estudadas foi mensurada usando um leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 450 e 550 nm. Para verificação dos níveis de cada citocina os seguintes grupos foram usados: (i) falso-operado + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); (ii) falso-operado + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.); (iii) PSNL + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.) e (iv) PSNL + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) (Figura 29).

Figura 29. Dosagem do nível de citocinas espinais.



Legenda: Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de PSNL ou falso-operados (A). Do 7^o ao 11^o dias após o procedimento cirúrgico os animais receberam injeções intraperitoneais diárias contendo AR-A014418 (0,3 mg/kg) ou veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg) (B). 30 minutos após o último tratamento (C) os animais foram anestesiados com isoflurano (D) e a eutanásia foi realizada por decaptação. Os segmentos medulares L1-L6 foram removidos (E) para análise dos níveis das seguintes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e IL-10 (F).

Fonte: autora (2013).

2.3.1.7 Avaliação da atividade locomotora

A ambulação dos animais foi avaliada no teste do campo aberto, como descrito por Kaster et al. (2013). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, cujo assoalho era dividido em 12 quadrados idênticos. Os camundongos foram tratados com AR-A014418 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.) e meia hora após expostos ao teste (individualmente), o número de quadrados cruzados por cada animal foi contado cumulativamente por 6 minutos.

2.3.1.8 Análise estatística dos experimentos de nocicepção crônica

Este segundo grupo de experimentos deram origem a um segundo artigo (MAZZARDO-MARTINS et al., 2012) e as análises estatísticas foram realizadas por uma (teste do campo aberto) ou duas vias (efeito do AR-A014418 na dor neuropática induzida pelo modelo da PSNL – hiperalgesia térmica e níveis de citocinas) e analisadas pela Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Bonferroni quando apropriado, estas análises foram apresentadas como a média \pm o erro padrão da média (E.P.M.). Os experimentos que avaliaram o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, catecolaminérgico e a via da L-arginina-óxido nítrico (hiperalgesia mecânica) e a área sob a curva (AUC) das frequências de retirada foram analisadas pelo teste Scheirer-Ray-Hare, uma extensão do teste Kruskal-Wallis (ANOVA de duas vias não-paramétrica).

2.3.1.9 Substâncias utilizadas nos experimentos de nocicepção crônica

As seguintes substâncias foram utilizadas: cloridrato de morfina (Merck, Darmstadt, Alemanha); AR-A014418 (N-(4-metoxibenzil)-NO-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)uréia), ρ -clorofeilalanina metil éster (PCPA), α -metil- ρ -tirosina (AMPT), N^o-nitro-L-arginina (L-NOARG), cloridrato de L-arginina, xilazina e cetamina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA); isoflurano (Cristália, SP, Brasil); kits da R&D Systems (Minneapolis, MN) de ensaio imunoenzimático (ELISA) de citocinas

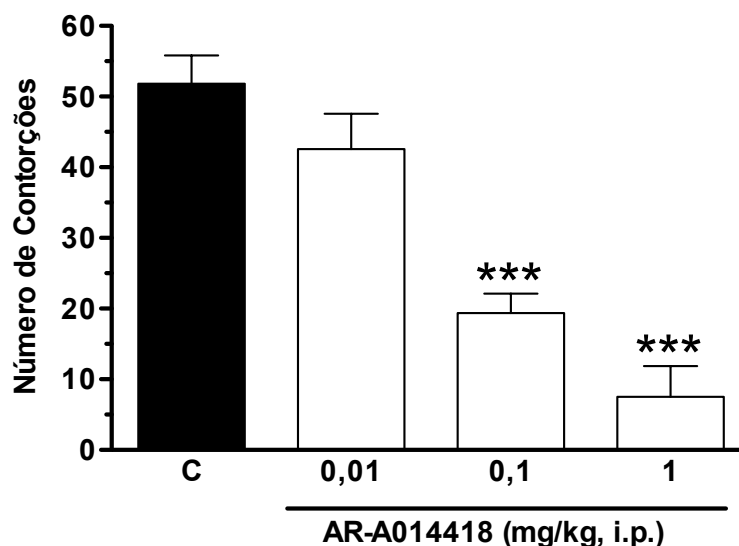
(TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-1ra) para camundongos. Estas substâncias também foram utilizadas: PMSF, EDTA, aprotinina, cloreto de benzametônio e albumina se soro bovino (United States Biological, MA, USA). Todas as substâncias foram dissolvidas em solução salina NaCl 0,9%, exceto o AR-A014418, que foi diluído em salina com uma concentração final de 0,1% de DMSO, e o AMPT foi dissolvido em 5% de Tween 80. Os grupos tratados com veículo foram avaliados simultaneamente. As substâncias foram administradas intraperitonealmente (i.t.) e subcutaneamente (s.c.).

3 RESULTADOS

3.1 AR-A014418 REDUZ CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados representados na Figura 30 demonstram o efeito da administração i.p. do AR-A014418 (0,01, 0,1 e 1 mg/kg) injetado 30 minutos antes da indução das contorções abdominais pelo ácido acético (0,6%, 450 µL) em camundongos. O tratamento com AR-A014418, nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, diminuiu significativamente o número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em relação ao grupo controle (0,1% de DMSO, 10 mL/kg, i.p.) ($P < 0,001$). O valor da DI_{50} foi de 0,17 mg/kg (intervalos de confiança de 0,08-0,36 mg/kg). A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi de $86 \pm 8\%$, na dose de 1 mg/kg, i.p. Estes dados fornecem evidências do efeito sistêmico deste inibidor da GSK3 na diminuição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Figura 30 - Efeito do pré-tratamento i.p. com o AR-A014418 na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.



Legenda: Os animais que constituem o grupo controle (C) receberam administração de 0,1 % de DMSO (10 mL/kg, i.p.) 30 minutos antes do ácido acético e estão representados pela coluna em preto. Os camundongos que receberam administração intraperitoneal de AR-A014418, doses de: 0,01; 0,1 ou 1 mg/kg, 30 minutos antes da injeção i.p. de ácido acético (0,6%, 450 µL) estão representados nas colunas brancas. Os valores representam a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos indicam o nível de significância em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. *** $P < 0.001$).

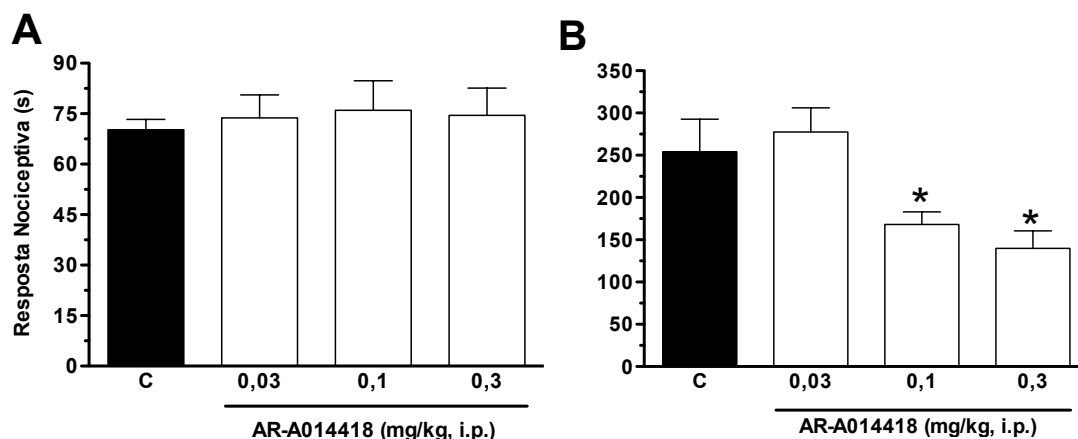
Fonte: Martins et al. (2011).

3.2 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE AR-A014418 OU NP031115 DIMINUI A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

A administração intraperitoneal de AR-A014418 nas doses de 0,1 e 0,3 mg/kg, 30 minutos antes da administração de formalina na região subcutânea na planta da pata posterior direita dos camundongos, inibiu significativamente ($P < 0,05$) a segunda fase do teste (Figura 31, painel B) quando comparados ao grupo controle (representados pelas colunas

pretas nos gráficos), que receberam veículo (0,1% de DMSO, 10 mL/kg, i.p.). As porcentagens da inibição da nocicepção foram de $34\pm 6\%$ e $46\pm 8\%$ nas doses de 0,1 mg/kg e 0,3 mg/kg, respectivamente. A resposta nociceptiva dos animais que receberam injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg) foi semelhante a dos animais controles na primeira fase do teste da formalina (Figura 31, painel A).

Figura 31 - Efeito do AR-A014418 administrado intraperitonealmente na nocicepção induzida pela formalina.

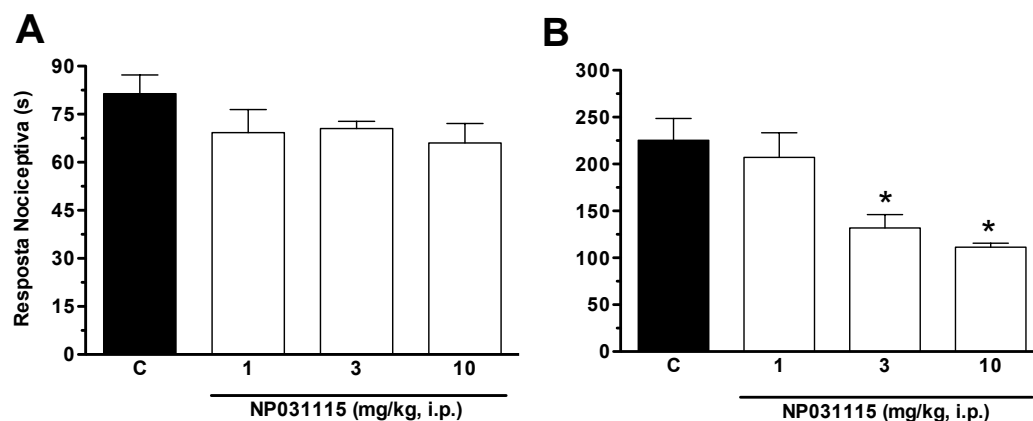


Legenda: Avaliação da primeira (painel A) e segunda fases (painel B) do teste da formalina. Os valores do grupo controle (C, colunas pretas) representam os animais que receberam administração i.p. de DMSO (0,1 %, 10 mL/kg) 30 minutos antes da injeção de formalina subcutânea na planta da pata posterior direita, demonstrados na coluna preta. Os camundongos que receberam injeção intraperitoneal de AR-A014418 (0,03; 0,1 ou 0,3 mg/kg), também 30 minutos antes da injeção de formalina, estão evidenciados nas colunas brancas. Os valores representam a média de 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste estatístico de Student Newman-Keuls. $*P < 0,05$).

Fonte: Martins et al. (2011).

Com o intuito de corroborar a hipótese de que a inibição da GSK3 está diretamente relacionada com a diminuição da resposta nociceptiva no modelo de nocicepção induzida pela formalina, nós utilizamos outro inibidor seletivo da GSK3, o NP031115, para administrar nos animais. A administração intraperitoneal de NP031115 (3 e 10 mg/kg), realizada 30 minutos antes da injeção da formalina, inibiu significativamente a segunda fase do teste (Figura 32, painel B). As porcentagens das inibições foram: $42\pm 6\%$ e $51\pm 2\%$ nas doses de 3 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. O tratamento intraperitoneal dos roedores com NP031115 (nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg) não alterou a resposta nociceptiva destes animais na primeira fase do teste da formalina, quando comparados à nocicepção apresentada pelo grupo controle (Figura 32, painel A). O efeito do NP031115 na diminuição da nocicepção foi semelhante ao do AR-A014418, observado na Figura 31.

Figura 32 - Efeito do NP031115 administrado intraperitonealmente na nocicepção induzida pela formalina.



Legenda: Avaliação da primeira (painel A) e segunda fases (painel B) do teste da formalina. Os animais pertencentes ao grupo controle (C) receberam injeção intraperitoneal de DMSO (0,1 %, 10 mL/kg) 30 minutos antes da injeção de formalina e estão representados pela coluna em preto. Os camundongos que receberam injeção intraperitoneal de NP031115 (1, 3 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de formalina estão demonstrados nas colunas brancas. Os valores representam a média de 10 animais, as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste estatístico de Student Newman-Keuls. * $P < 0,05$).

Fonte: Martins et al. (2011).

Os dados representados na Figura 32 mostraram que a utilização de outro inibidor da GSK3, o NP031115, também diminuiu a nocicepção induzida pela administração i.pl. de formalina, confirmando a hipótese de que a inibição desta enzima acarreta na diminuição da nocicepção em camundongos.

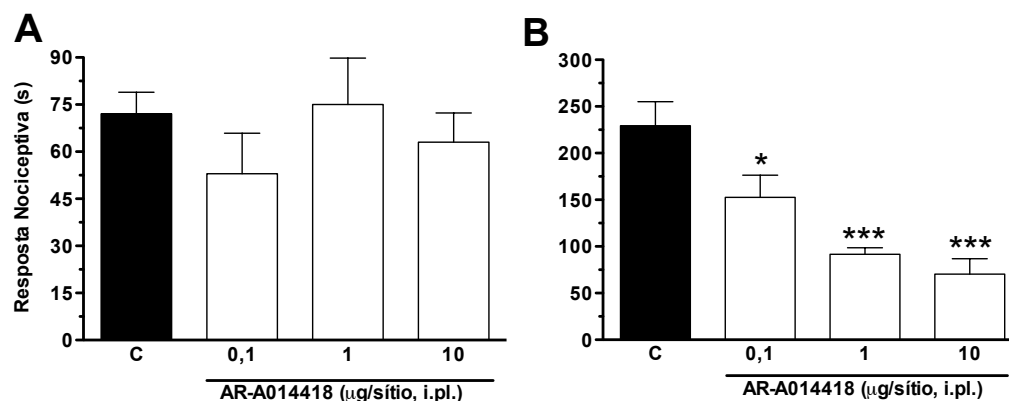
Considerando que o tratamento sistêmico (i.p.) dos animais com AR-A014418 diminuiu a nocicepção em camundongos nos indagamos se o AR-A014418 apresentaria resultado semelhante quando administrado em outros sítios, como periférico (i.pl.) ou central (subaracnóidea). Ver itens abaixo.

3.3 SÍTIO PERIFÉRICO ESTÁ ENVOLVIDO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AR-A014418

O efeito da administração i.pl. do AR-A014418 na nocicepção induzida pela formalina (primeira e segunda fases) está representado na Figura 33 (painéis A e B). A injeção de AR-A014418 nas doses de (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/sítio}$) juntamente com a formalina (2,5%, 20 μL) diminuiu significativamente o tempo em que os animais permaneceram lambendo e/ou mordendo a pata injetada na segunda fase do teste, quando comparados ao grupo controle (C), que recebeu administração i.pl. de veículo (0,1% DMSO) juntamente com a formalina. O valor da DI_{50} foi de 0,6 $\mu\text{g/sítio}$ (com intervalos de confiança de 0,34 - 1,05 $\mu\text{g/sítio}$) e a porcentagem de inibição foi de $69\pm 9\%$ na dose de 10 $\mu\text{g/sítio}$. A administração i.pl. de AR-A014418 (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/sítio}$) não foi capaz de diminuir a nocicepção dos roedores na primeira fase do teste.

Um dado interessante foi que a administração do AR-A014418 (10 $\mu\text{g/sítio}$) na pata esquerda não inibiu a nocicepção ocasionada pela formalina na pata direita (dados não mostrados), indicando que a dose utilizada de AR-A014418 produziu seu efeito por agir localmente, excluindo a possibilidade de um possível efeito sistêmico.

Figura 33 - Efeito do AR-A014418 co-administrado intraplantarmente com a formalina.



Legenda: Avaliação da primeira (painel A) e segunda fases (painel B) do teste da formalina. Os animais que constituíram o grupo controle (C, colunas pretas) receberam injeção intraplantar de DMSO (0.1%/sítio) juntamente com formalina (2,5%, 20 µL). Nas colunas brancas estão representados os animais que receberam injeção i.p. contendo AR-A014418 (0,1, 1 e 10 µg/sítio) e formalina. Os valores representam a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos representam o nível de significância em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste estatístico de Student Newman-Keuls. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$).

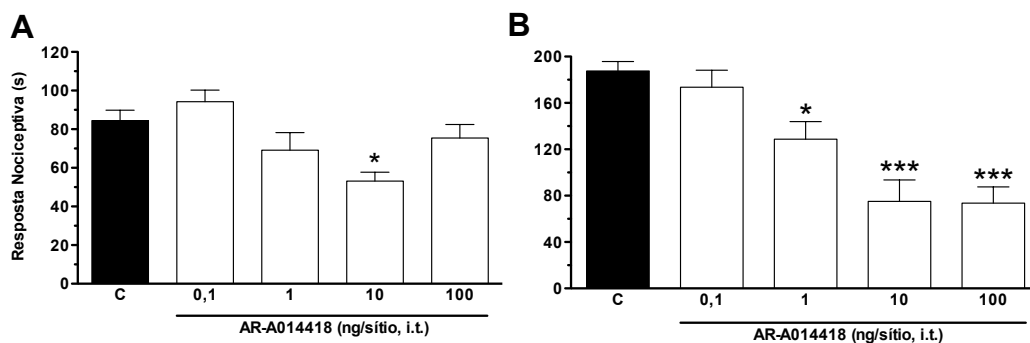
Fonte: Martins et al. (2011).

3.4 SÍTIO ESPINAL ESTÁ ENVOLVIDO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AR-A014418

Conforme demonstrado na Figura 34, a administração no espaço subaracnóideo de AR-A014418, 15 minutos antes da aplicação i.pl. de formalina (2,5%, 20 µL), diminuiu o comportamento de nocicepção apresentado pelos camundongos nas duas fases do teste, quando comparados ao grupo controle (0,1% de DMSO, i.t.) e formalina na pata. As porcentagens de inibição para a dose de 10 ng/sítio de AR-A014418 foram de $37 \pm 6\%$ e de $61 \pm 8\%$, para a primeira e segunda fases,

respectivamente. A média dos valores da DI_{50} para a segunda fase foi de 4,6 ng/sítio (intervalos de confiança de 1,6 a 13 ng/sítio).

Figura 34 - Efeito da administração subaracnóidea de AR-A0114418 na nocicepção induzida pela formalina.



Legenda: Avaliação da primeira (painel A) e segunda fases (painel B) do teste da formalina. Os valores do grupo controle (C, colunas pretas) correspondem aos animais que receberam injeção de DMSO (0,1%/sítio, i.t.) 15 minutos antes da injeção de formalina (2,5%, 20 μ L) na pata. Os camundongos que receberam administração de AR-A014418 (0,1, 1, 10 e 100 ng/sítio) 15 minutos antes da formalina na pata estão representados pelas colunas brancas. Os valores representam a média de 10 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos representam a diferença estatística em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste estatístico de Student Newman-Keuls. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$).

Fonte: Martins et al. (2011).

Os resultados expostos até o presente momento fornecem evidências dos prováveis sítios de ação do AR-A014418, quando o mesmo apresenta efeito em diminuir a nocicepção: sistemicamente (Figuras 30 e 31); periféricamente (Figuras 33) e centralmente (Figura 34). Com a finalidade de explorar alguns mecanismos que poderiam contribuir para a ação central (medular) do AR-A014418 investigamos o envolvimento do sistema glutamatérgico e das citocinas pró-inflamatórias em seu efeito antinociceptivo (ver item subsequente).

3.5 AR-A014418 REDUZ NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS OU DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

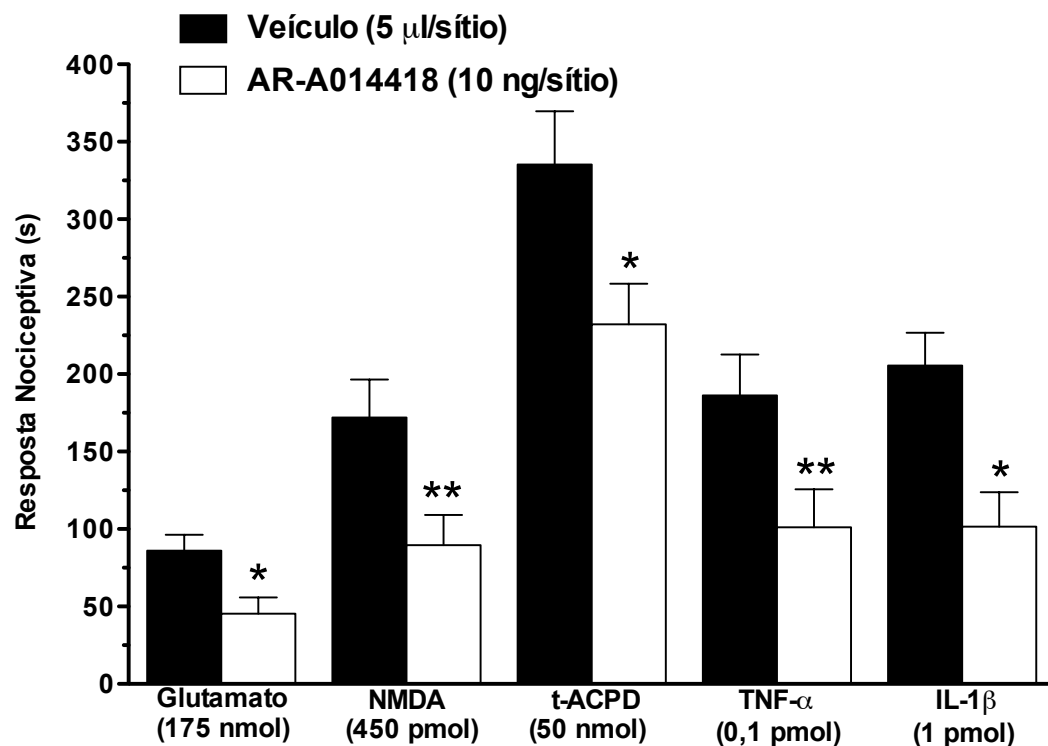
Com o intuito de averiguar se o AR-A014418 poderia agir sobre os neurônios glutamatérgicos presentes na medula espinal, analisou-se o efeito da co-administração subaracnóidea do AR-A014418 com agonistas de receptores glutamatérgicos.

Utilizando o tempo em que os animais permaneceram lambendo e/ou mordendo a região inferior do abdome, pelve, membros inferiores e cauda; regiões localizadas inferiormente à região intratecal onde os agentes flogísticos foram injetados, como indicativo de nocicepção. A duração do teste variou de acordo com a substância administrada: agonista de receptor para o glutamato: 3 minutos; agonista para o receptor NMDA: 5 minutos; agonista para o receptor trans-ACPD: 15 minutos. Ressaltamos que o glutamato (175 nmol/sítio), o NMDA (450 pmol/sítio) e o trans-ACPD (50 nmol/sítio) induziram nocicepção nos camundongos (Figura 35). Interessantemente, quando o AR-A014418 foi co-administrado com os respectivos agonistas glutamatérgicos, observou-se uma diminuição significativa na nocicepção induzida pelo glutamato ($47 \pm 12\%$, $P < 0.05$), NMDA ($48 \pm 11\%$, $P < 0.01$), trans-ACPD ($31 \pm 8\%$, $P < 0.05$) (Figura 35).

A administração sistêmica do AR-A014418 diminuiu a nocicepção induzida pelo ácido acético e pelo teste de nocicepção induzido pela formalina, na segunda fase deste último teste; estes resultados indicam que ele exerce efeito sobre a nocicepção

inflamatória. Conforme demonstrado na literatura, citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α e IL-1 β induzem comportamento nociceptivo (CHOI et al., 2003; ROBERTSON et al., 1997; TADANO et al., 1999). Este efeito pode estar relacionado à liberação de glutamato e substância P pelos terminais centrais dos neurônios aferentes primários (SALAZAR et al., 2006). Para verificar se existe uma relação entre o AR-A014418 e a nocicepção induzida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α ou IL-1 β , foi realizada uma co-administração de AR-A014418 com ambas citocinas, separadamente. Observou-se também que o AR-A014418, quando co-administrado com as citocinas pró-inflamatórias, reduziu significativamente a nocicepção induzida pelo TNF- α ($46\pm 13\%$; $P < 0,01$) e IL-1 β ($44\pm 11\%$; $P < 0,05$) (Figura 35).

Figura 35 - Efeito da co-administração intratecal de AR-A014418 com agonistas de receptores glutamatérgicos ou citocinas pró-inflamatórias.



Legenda: Efeito do AR-A014418 (10 ng/sítio, intratecal [i.t.]), este grupo foi representado pelas colunas brancas ou veículo (5 µl/sítio, i.t., colunas pretas) co-administrados em uma injeção i.t. (5 µl/sítio) de glutamato (175 nmol/sítio), NMDA (450 pmol/sítio), trans-ACPD (50 nmol/sítio), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (0,1 pmol/sítio) e interleucina- 1β (IL-1β) (1 pmol/sítio) na resposta nociceptiva em camundongos. Os valores representam a média de 10 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos mostram o nível de significância estatística em relação ao grupo controle (teste t de Student). *P < 0,05 e **P < 0,01.

Fonte: Martins et al. (2011).

Os resultados apresentados neste item sugerem que a GSK3 modula (inibindo) os receptores glutamatérgicos espinais dos tipos ionotrópicos e metabotrópicos, afetando a nocicepção. Além disso, a nocicepção resultante da aplicação de TNF-α e IL-1β espinalmente é diminuída pelo AR-A014418.

3.6 AR-A014418 DIMINUI A HIPERALGESIA AO ESTÍMULO MECÂNICO INDUZIDA PELA PSNL

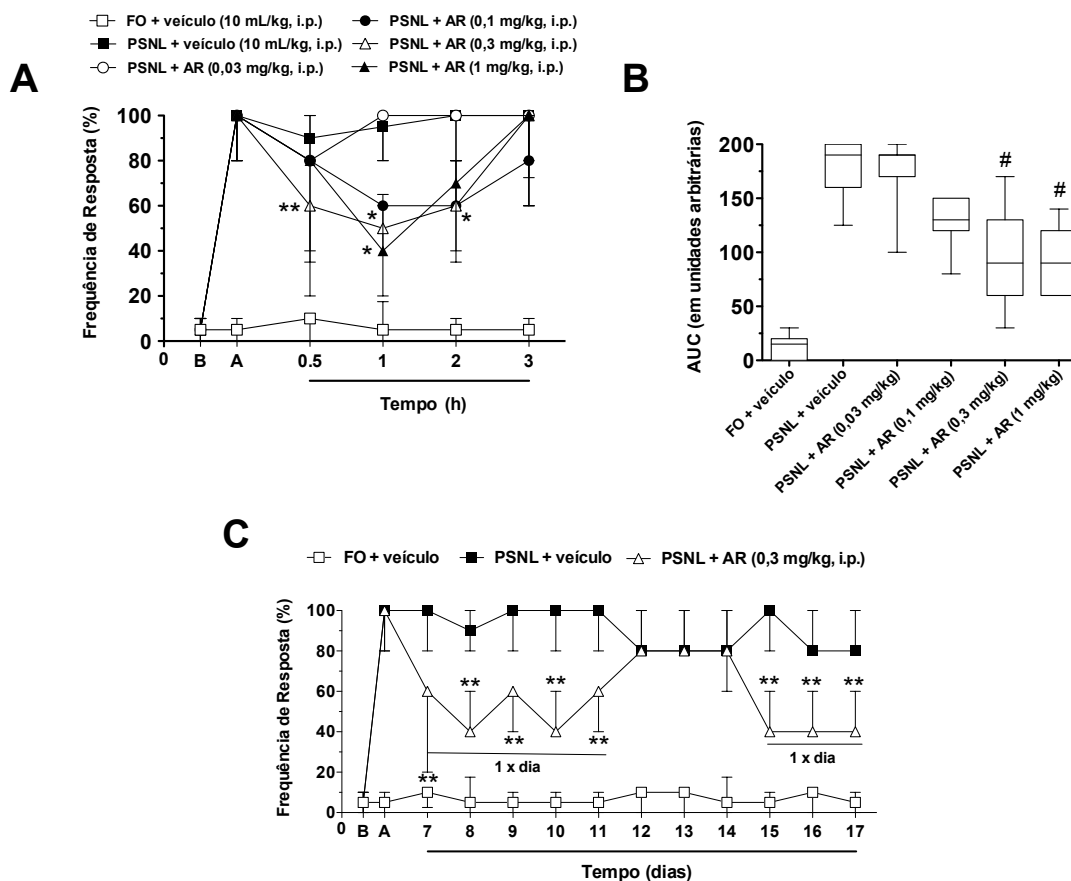
A ligação parcial do nervo isquiático induziu um aumento da frequência de resposta da retirada da pata posterior direita (lado em que o nervo isquiático foi ligado) dos animais frente a aplicação do filamento de von Frey de 0,4 g (Figura 36 A-C), pode-se constatar esse fato quando os grupos falso-operados + veículo foram comparados com o grupo PSNL + veículo no ponto A do gráfico (Figura 36, painéis A e C). O tratamento i.p. dos animais com AR-A014418 (0,3 mg/kg) reduziu a hiperalgisia ao estímulo mecânico, quando este grupo foi comparado com os animais que receberam injeção de veículo (controle) (DMSO, 0,1%, 10 mL/kg, i.p.), nos tempos de meia hora [$H(5) = 15,58$; $P < 0,01$], 1 hora [$H(5) = 20,24$; $P < 0,05$] e 2 horas [$H(5) = 14,55$; $P < 0,05$] após o tratamento. Os animais tratados intraperitonealmente com AR-A014418 na dose de 1 mg/kg apresentaram diminuição da nocicepção ao estímulo mecânico somente 1 hora após a injeção [$H(5) = 20,24$; $P < 0,05$].

O cálculo da área sob a curva (Figura 36, painel B) revelou que os animais que receberam injeções de AR-A014418 (0,3 e 1 mg/kg) diferiram do grupo controle (que recebeu veículo) [$H(5) = 20,99$; $P < 0,05$ e $H(5) = 20,24$; $P < 0,05$, respectivamente], mas não são diferentes entre eles. Nos próximos experimentos os animais receberam somente a dose de 0,3 mg/kg de AR-A014418.

Os resultados apresentados na Figura 36, painel C mostram que a administração diária (uma vez ao dia) de AR-A14418 (0,3 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente a hiperalgisia ao estímulo mecânico induzida pela PSNL nos dias 7 [$H(2) = 12,38$; $P < 0,01$], 8 [$H(2) = 13,56$; $P <$

0,01], 9 [H(2) = 11,77; $P < 0,01$], 10 [H(2) = 12,81; $P < 0,01$], 11 [H(2) = 15,23; $P < 0,01$], 15 [H(2) = 13,14; $P < 0,01$], 16 [H(2) = 14,70; $P < 0,01$] e 17 [H(2) = 15,23; $P < 0,01$] quando comparados ao grupo PSNL + veículo. A avaliação da hiperalgesia ao estímulo mecânico teve início meia hora após a injeção i.p. de AR-A014418 ou de veículo (controle). O tratamento dos camundongos foi suspenso por 3 dias (12°, 13° e 14° dia após o procedimento cirúrgico) e neste período os animais que haviam recebido injeções i.p. de AR-A014418 do 7° ao 11° dia após o PSNL apresentaram resposta semelhante aos animais que haviam recebido administrações i.p. de veículo (controle) no mesmo período (Figura 36 C). Portanto, diminuição da nocicepção só ocorreu 30 minutos após o tratamento e não 24 horas após o mesmo, não demonstrando assim efeito cumulativo. Além disso, quando o tratamento foi retomado, no 15° dia após a cirurgia, a resposta nociceptiva dos animais foi semelhante aquela avaliada do 7° ao 11° dia após a PSNL, portanto, a interrupção do tratamento não afetou o efeito antinociceptivo produzido pelo AR-A014418 nos dias subsequentes (15° ao 17°) (Figura 36 C).

Figura 36. Efeito do AR-A014418 na hiperalgesia ao estímulo mecânico no modelo da PSNL



Legenda: Nos painéis A e C observa-se que os animais submetidos à ligação parcial do nervo isquiático (PSNL) apresentaram um aumento da nocicepção frente ao estímulo mecânico, esta afirmação está pautada na comparação da resposta nociceptiva dos animais pertencentes aos grupos falso-operado (FO) + veículo com o grupo PSNL + veículo no ponto A (7 dias após a cirurgia, antes do tratamento) ($P < 0,001$; não representado no gráfico). No painel A diferentes grupos de animais receberam injeção de AR-A014418 pela via intraperitoneal, nas doses de 0,03; 0,1; 0,3 ou 1 mg/kg e a resposta nociceptiva dos animais foi avaliada em diferentes tempos após o tratamento dos mesmos (0,5, 1, 2 e 3 horas). O painel B representa a área sob a curva (AUC) dos grupos de animais representados no painel A. No painel C pode-se observar o efeito do tratamento diário (1 vez ao dia) dos animais com AR-A014418 na dose de 0,3 mg/kg, i.p. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ ou # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo PSNL + veículo (10 mL/kg, i.p.). B, limiar basal de retirada da pata frente ao estímulo mecânico; A, 7 dias após a cirurgia, antes do tratamento; AR, AR-A014418; FO: falso-operado; PSNL: ligadura parcial do nervo isquiático. Cada grupo experimental foi composto por 7 animais. Teste análise de variância de Kruskal-Wallis. Os dados comportamentais estão expressos como mediana e intervalos interquartis.

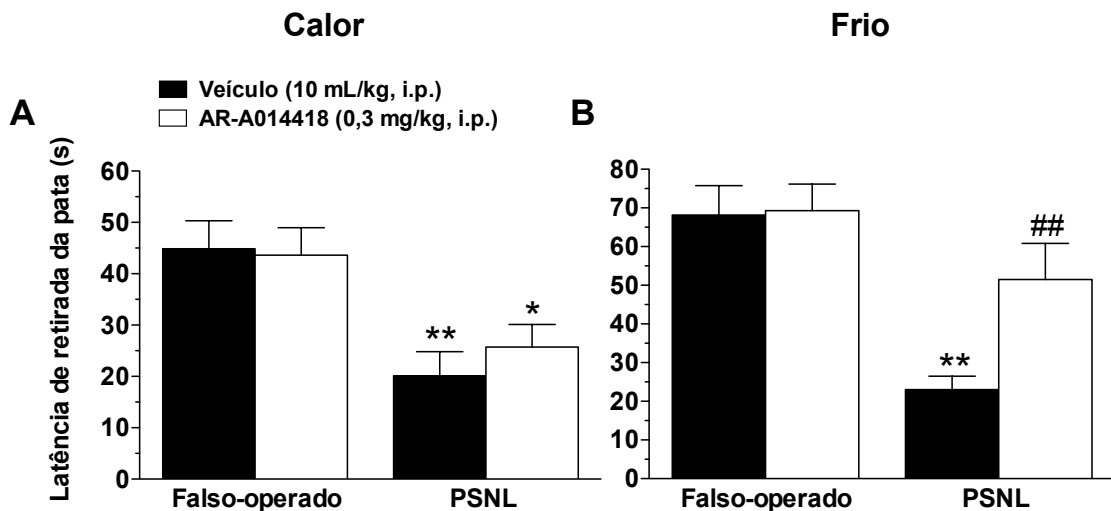
Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

3.7 AR-A014418 REDUZ A HIPERALGESIA AO ESTÍMULO TÉRMICO INDUZIDA PELA PSNL

Sete dias após o procedimento cirúrgico de PSNL os animais apresentaram diminuição da latência de retirada da pata frente a um estímulo térmico: calor (48°C) ou frio (5°C), no teste da placa quente/fria; quando comparados aos camundongos pertencentes ao grupo falso-operados (Figura 37, painel A e B).

A hiperalgesias dos roedores ao calor não foi modificada pela administração de AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do teste nociceptivo (Figura 37 painel A). Entretanto, o tratamento i.p. dos animais com AR-A014418 (0,3 mg/kg) reduziu a hiperalgesia ao frio induzida pela PSNL; a resposta de latência aumentou $41 \pm 5\%$ quando comparado os grupos PSNL + AR-A014418 vs PSNL + veículo (DMSO 0,1%, 10 mL/kg) (Figura 37, painel B). Desta forma os resultados apresentados na Figura 37 (painel B) mostram o efeito da PSNL sobre a hiperalgesia ao frio e a influência do AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) neste modelo. A análise ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da PSNL [$F(1, 24) = 9.10; P < 0.01$] e AR-A014418 [$F(1, 24) = 7.48; P < 0.01$]. As análises *post hoc* revelaram efeitos significativos da PSNL [$F(1, 24) = 9.10; P < 0.01$] e AR-A014418 [$F(1, 24) = 7.48; P < 0.01$], e uma interação PSNL x AR-A014418 [$F(1, 24) = 4.8; P < 0.05$]. As análises *post hoc* (teste de Bonferroni) indicaram que a administração de AR-A014418 reverteu significativamente ($P < 0.01$) a hiperalgesia ao frio ocasionada pela PSNL.

Figura 37. Efeito do AR-A014418 na hiperalgesia ao estímulo térmico no modelo da PSNL.



Legenda: Nos gráficos acima podem-se observar os seguintes grupos: falso-operado + veículo (0,1% DMSO, 10 mL/kg, i.p.); falso-operado + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.); PSNL + veículo e PSLN + AR-A014418. A hiperalgesia térmica ao calor em A e ao frio em B foram avaliadas no teste da placa quente/fria; sete dias após o procedimento cirúrgico e meia hora após a injeção i.p. (AR-A014418 ou veículo). O tratamento dos animais com AR-A014418 não reduziu a hiperalgesia ao calor, esta afirmação está baseada na resposta similar apresentada pelos grupos PSNL + veículo e PSNL + AR-A014418 (painel A). Por outro lado, a resposta nociceptiva diferiu entre os grupos PSNL + veículo e PSNL + AR-A014418 (painel B) indicando que o tratamento dos animais com o inibidor da GSK3 preveniu a hiperalgesia ao frio resultante do procedimento de PSNL. Cada ponto representa a média de 7 animais, as linhas verticais indicam o E.P.M. Os astertiscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo falso-operado + veículo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. O jogo da velha indica diferença estatística do grupo PSNL + veículo, ## $P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* teste de Bonferroni.

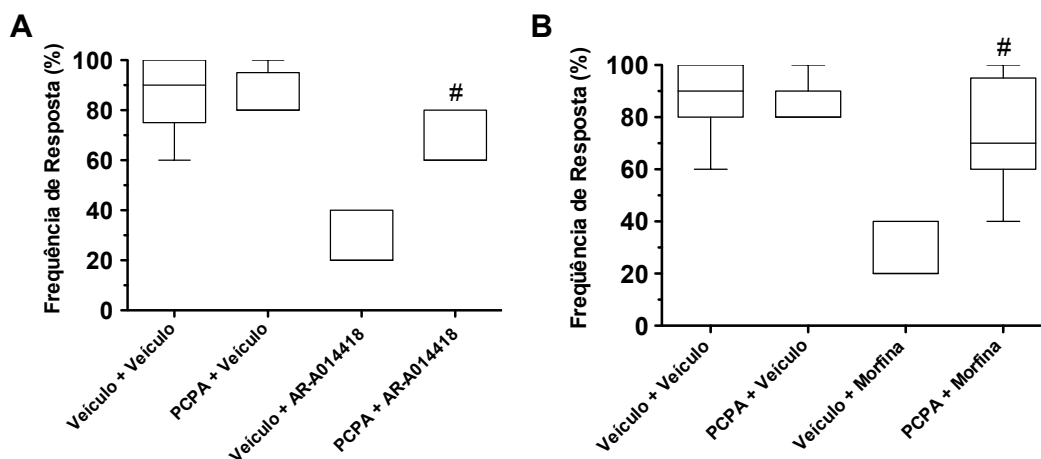
Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

3.8 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO AR-A014418

A Figura 38 (painel A) demonstra o efeito do tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p.; um inibidor da síntese de serotonina) na diminuição da nocicepção promovida pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) na dor neuropática induzida pelo modelo da PSNL. A análise ANOVA de duas vias (Scheirer–Ray–Hare, extensão do teste Kruskal–Wallis) revelou efeitos significativos do pré-tratamento dos animais com PCPA e AR-A014418, e uma interação pré-tratamento com PCPA x AR-A014418 [$H(1) = 5,63$; $P < 0,05$].

Na Figura 38 (painel B) observa-se o efeito do PCPA na diminuição da nocicepção causada pela morfina (5 mg/kg, s.c.) no modelo da PSNL. A análise *post hoc* (Scheirer–Ray–Hare, extensão do teste Kruskal–Wallis) indicou que a pré-administração de PCPA preveniu significativamente a antinocicepção ocasionada pela morfina [$H(1) = 4,13$; $P < 0,05$].

Figura 38. Participação do sistema serotoninérgico no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção.



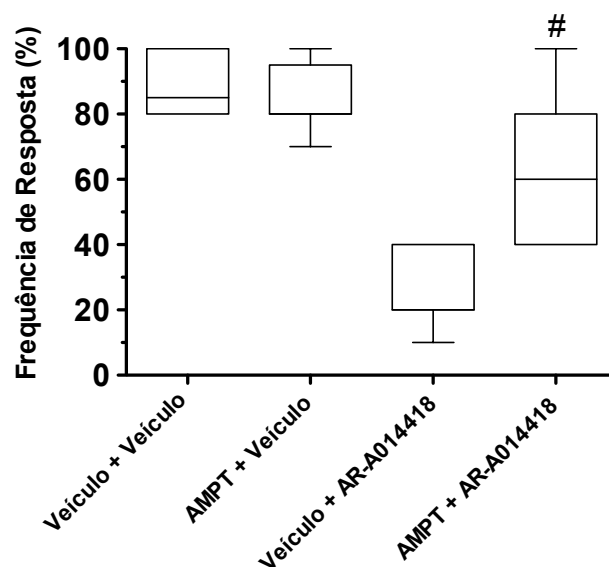
Legenda: Os gráficos acima representam o efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p.; um inibidor da síntese de serotonina) na antinocicepção de camundongos tratados com AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p., painel A) ou com morfina (5 mg/kg, s.c., painel B) na dor neuropática. O símbolo jogo da velha denota o nível de significância quando comparado com o grupo veículo (10 mL/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) (painel A) e com o grupo veículo (10 mL/kg, i.p.) + Morfina (5 mg/kg, s.c.) (painel B); # $P < 0,05$. Teste de análise de variância de Kruskal–Wallis. Os dados experimentais estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

3.9 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO AR-A014418

Os resultados demonstrados na Figura 39 mostram o efeito do pré-tratamento dos animais com AMPT (100 mg/kg, um inibidor da tirosina hidroxilase) no efeito antinociceptivo ocasionado pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) no modelo de PSNL. A análise *post hoc* (Scheirer–Ray–Hare, extensão do teste Kruskal–Wallis) indicou que a pré administração de AMPT preveniu a antinocicepção ocasionada pelo AR-A014418 [$H(1) = 4,53$; $P < 0,05$].

Figura 39. Participação do sistema catecolaminérgico no efeito antinociceptivo do AR-A014418.



Legenda: No gráfico acima pode-se constatar o efeito do AMPT (100 mg/kg, i.p.; um inibidor da tirosina hidroxilase) sobre no efeito antinociceptivo induzido pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) no modelo da PSNL. O símbolo denota o nível de significância quando comparado com o grupo veículo (10 mL/kg, i.p.) + AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.), # $P < 0,05$. Teste de análise de variância de Kruskal–Wallis. Os dados comportamentais estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

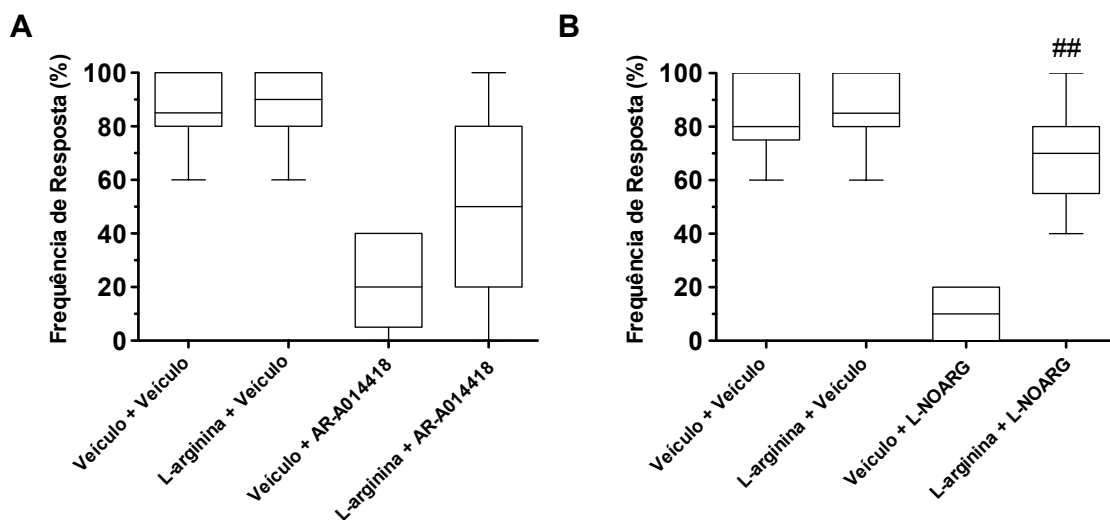
3.10 ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO NA ANTINOCICEPÇÃO OCACIONADA PELO AR-A014418

A Figura 40 (painel A) mostra o efeito do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (600 mg/kg, i.p., uma precursora do óxido nítrico) na antinocicepção ocasionada pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) em roedores submetidos a PSNL. A análise estatística (Scheirer–Ray–Hare, extensão do teste Kruskal–Wallis) revelou que o pré-

tratamento dos animais com L-arginina não alterou o efeito de diminuir a nocicepção produzido pelo AR-A014418 [$H(1) = 0,41$; $P > 0,05$].

Na Figura 40 (painel B) está representado o efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito de diminuir a nocicepção promovido pela L-NOARG (75 mg/kg, uma inibidora da óxido nítrico sintase induzível), no modelo da PSNL. A análise estatística (Scheirer–Ray–Hare, extensão do teste Kruskal–Wallis) indicou que a pré-administração de L-arginina preveniu o efeito de diminuição da nocicepção ocasionado pela L-NOARG [$H(1) = 6,82$; $P < 0,01$].

Figura 40: Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção ocasionada pelo AR-A014418.



Legenda: Nos gráficos acima pode-se observar o efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) na antinocicepção ao estímulo mecânico promovida pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) e L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) no modelo da PSNL. O símbolo denota o nível de significância quando comparado ao grupo veículo (10 mL/kg, i.p.) + L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) (painel B). ## $P < 0,01$. Teste de análise de variância de Kruskal–Wallis. Os dados comportamentais estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

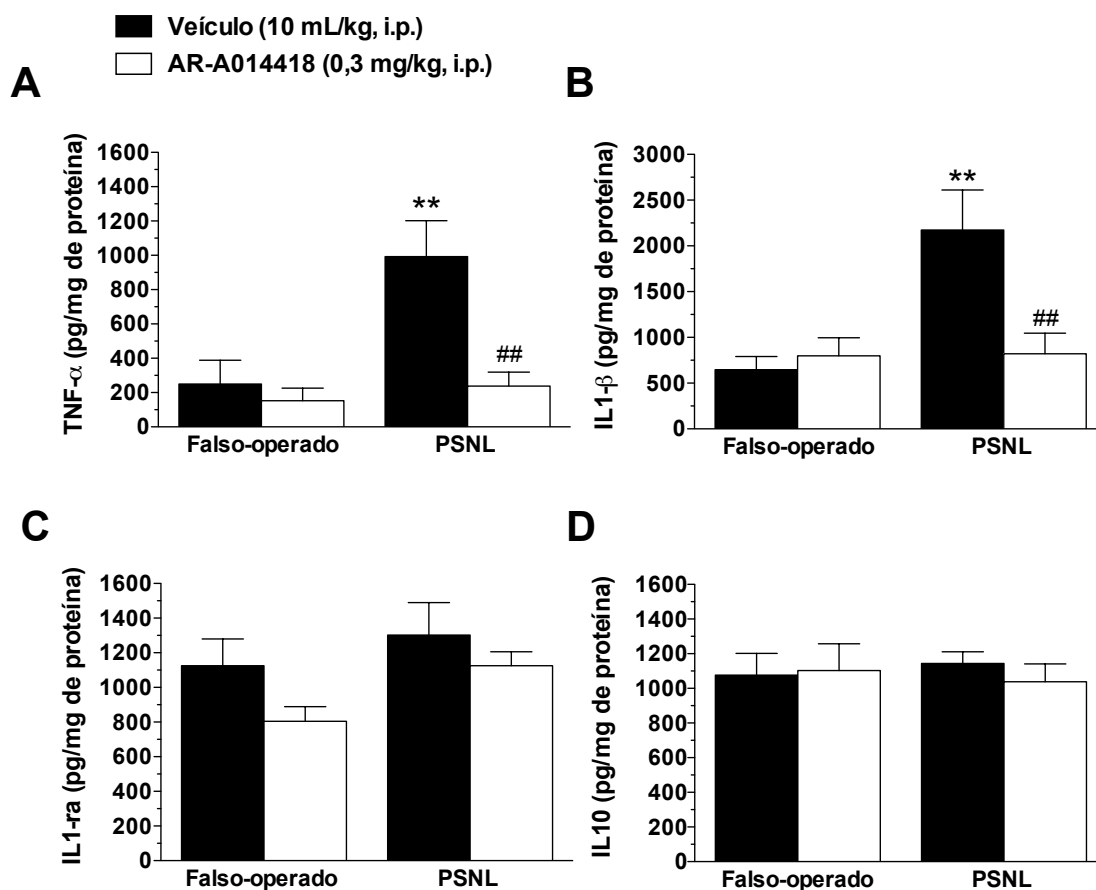
Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

3.11 AR-A014418 DIMINUI OS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS LESÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

A Figura 41 (painel A) mostra o efeito da PSNL sobre os níveis de TNF- α e a influência exercida pelo AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) na concentração desta citocina, é importante enfatizar que os animais foram tratados do 7° ao 11° dia após a PSNL e, 30 minutos após a última administração, foi retirado o tecido para análise (segmentos medulares L1-L6), esta informação se aplica para todas as citocinas avaliadas. A análise ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da PSNL [F(1, 24) = 12,35; $P < 0,01$] e do AR-A014418 [F(1, 24) = 9,87; $P < 0,01$], e uma interação PSNL x AR-A014418 [F(1, 24) = 6,15; $P < 0,05$]. A análise *post hoc* demonstrou que a administração de AR-A014418 preveniu significativamente (inibição de 76 \pm 8%) o aumento dos níveis de TNF- α ocasionados pela PSNL ($P < 0,01$).

Os resultados expostos na Figura 41 (painel B) mostra o efeito da PSNL e do AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) sobre os níveis da citocina IL-1 β na medula espinal. A análise ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da PSNL [F(1, 24) = 9,09; $P < 0,01$] e do AR-A014418 [F(1, 24) = 12,19; $P < 0,01$]; e uma interação entre PSNL x AR-A014418 [F(1, 24)=11,32; $P < 0,01$]. A análise *post hoc* mostrou que a administração de AR-A014418 preveniu significativamente (inibição de 62 \pm 10%) o aumento dos níveis de IL-1 β causados pela PSNL ($P < 0,001$). A administração intraperitoneal de AR-A014418 não modificou os níveis de IL1-ra e IL-10 quando comparados aos outros grupos experimentais (painéis C e D).

Figura 41. Efeito do AR-A014418 sobre a concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias na medula espinal de camundongos submetidos a PSNL.



Legenda: Na figura acima evidencia-se o efeito do tratamento dos animais com AR-A014418 (0,3 mg/kg, i.p.) sobre os níveis das citocinas pró (TNF- α e IL-1 β , painel A e B, respectivamente) e anti-inflamatórias (IL1-ra e IL-10) nos segmentos medulares L1-L6 de camundongos submetidos a PSNL. O tecido foi retirado no 11^o dia após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeções i.p. de AR-A014418 ou veículo uma vez ao dia do 7^o ao 11^o dia após a PSNL. Cada ponto representa a média de 7 animais, as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparados ao grupo falso-operado + veículo (10 mL/kg, i.p.), $**P < 0,01$. O jogo da velha indica diferença significativa do grupo PSNL + veículo (10 mL/kg, i.p.), $##P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Mazzardo-Martins et al. (2012).

3.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A administração i.p. de AR-A014418 (0,1, 0,3 e 1 mg/kg), realizada 30 minutos antes do experimento, não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, quando comparado com o grupo de camundongos que recebeu veículo (controle) (DMSO 0,1%, 10 mL/kg, i.p.). A média \pm E.P.M. para o número de cruzamentos foi de 111 ± 10 para o grupo controle e de 109 ± 10 , 102 ± 9 , 96 ± 9 para os grupos tratados com AR-A014418: 0,1; 0,3 e 1 mg/kg (dado não mostrado).

4 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra que a inibição da GSK3 induz diminuição da resposta nociceptiva observada em modelos clássicos de nocicepção aguda (modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, nocicepção induzida pela formalina e injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos e citocinas pró-inflamatórias) e crônica (PSNL, ao estímulo mecânico e ao frio) realizados em camundongos. O mecanismo de ação para este efeito parece envolver a ativação dos sistemas inibitórios endógenos da dor como o serotoninérgico e o catecolaminérgico, bem como a inibição do sistema glutamatérgico e das citocinas pró-inflamatórias. No texto que segue procura-se abordar a relação da GSK3 com os sistemas supracitados.

4.1 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3

Foi evidenciado que o tratamento dos animais com AR-A014418 (inibidor da GSK3) diminuiu a nocicepção causada pela: formalina, ácido acético ou agonistas dos receptores para glutamato, NMDA e para trans-ACPD injetados intratecalmente; e no modelo de nocicepção crônica: PSNL (MARTINS et al., 2011; MAZZARDO-MARTINS et al., 2012). Como enfatizado no desenvolvimento deste trabalho a participação do glutamato é crucial em todos os testes nociceptivos citados, portanto discute-se a seguir a relação entre este neurotransmissor e a enzima GSK3.

Uma hipótese muito interessante cunhada por Chen et al., (2007) foi a de que o receptor glutamatérgico do tipo NMDA seria um importante alvo da GSK3, mas como ela teria a capacidade de agir sobre ele? Vamos analisar com mais detalhes este estudo (CHEN et al., 2007), onde os autores examinaram o impacto da GSK3 sobre a função do receptor NMDA em neurônios piramidais corticais. Assim, foi observado que a corrente do receptor NMDA estava reduzida na presença de inibidores da GSK3, como o 4-benzil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-dione (TDZD) e SB216763. Evidências adicionais foram obtidas quando a proteína celular GSK3 estava com sua expressão diminuída por um RNA silenciador, no qual a corrente basal do receptor NMDA foi menor e o efeito modulatório dos inibidores da GSK3 foram abolidos. Como a diminuição da expressão da GSK3 já foi suficiente para diminuir a corrente do receptor NMDA, sugeriu-se que a GSK3 endógena, constitutivamente ativa, desempenha importante papel na manutenção da expressão dos receptores NMDA funcionais na superfície dos neurônios corticais sob condições basais (CHEN et al., 2007).

Evidências sugerem que o tráfego do receptor NMDA envolve múltiplos passos que são altamente regulados, incluindo a saída do retículo endoplasmático, transporte ao longo dos microtúbulos nos dendritos pela proteína motora cinesina KIF17, entrega na densidade pós-sináptica enriquecida em actina, internalização da superfície celular e, difusão nos sítios sináptico e extra-sináptico na membrana plasmática (WENTHOLD et al., 2003). As habilidades da GSK3 em regular a dinâmica dos microtúbulos (ZHOU, SNIDER, 2005) e descarregar as vesículas da família da proteína cinesina (MORFINI et al., 2002) a torna

uma candidata em potencial envolvida no transporte baseado no microtúbulo/KIF17 dos receptores NMDA (YUEN et al., 2005). Entretanto, os dados do trabalho de Chen et al., (2007) utilizando agentes que manipulam os microtúbulos e o oligonucleotídeos (utilizando *antisense*) sugere que a GSK3 não regula o tráfego do receptor NMDA ao longo dos microtúbulos dendríticos. Os agentes que manipularam a actina também falharam em afetar a regulação dos receptores NMDA pela GSK3 (CHEN et al., 2007).

Foi demonstrado que inativando a GSK3 promove-se a reciclagem das integrinas internalizadas através de um mecanismo não nuclear (ROBERTS et al., 2004). Para testar o possível envolvimento da GSK3 na regulação da internalização do receptor NMDA, Chen et al., (2007) examinaram o efeito dos inibidores da GSK3 na endocitose dos receptores NMDA mediada pela clatrina, que é a forma mais prevalente de endocitose regulada. Na presença de um peptídeo inibitório, a dinamina, para prevenir a endocitose através de vesículas revestidas por clatrina (GOUT et al., 1993), os inibidores da GSK3 falharam em regular a corrente do receptor NMDA, que suporta o papel da GSK3 na internalização deste receptor. O envolvimento da GSK3 na internalização do receptor NMDA dependente de clatrina/dinamina também foi demonstrado em experimentos com Rab5. Rab5 é um membro da família Rab de pequenas GTPases que funcionam como reguladores específicos do transporte vesicular entre organelas (ZERIAL, MCBRIDE, 2001), é um coordenador chave dos eventos de tráfego endocítico inicial, incluindo a fusão inicial do endossomo, internalização e formação de vesícula revestida por clatrina. Rab5 dominante negativo bloqueia o efeito dos inibidores da GSK3 sobre a

corrente do receptor NMDA, sugerindo que a GSK3 regula a corrente do receptor NMDA por afetar a internalização deste receptor mediada por clatrina/Rab5 (CHEN et al., 2007). Evidências mais diretas vêm de estudos bioquímicos e imunocitoquímicos: em resposta ao tratamento com o inibidor da GSK3 os neurônios corticais mostram um nível reduzido de NR1 e NR2B na superfície e aumentam significativamente o nível de NR1 e NR2B internalizados. Em contraste, os inibidores da GSK3 não apresentam um efeito significativo na subunidade NR2A na superfície, consistente com achados eletrofisiológicos de que os receptores NMDA contendo NR2B são o principal alvo da GSK3 (CHEN et al., 2007).

A proteína de ancoragem PSD-95 afeta a internalização do receptor NMDA (ROCHE et al., 2001). Pela capacidade da GSK3 de regular a internalização do receptor NMDA, Chen et al., (2007) investigaram o envolvimento da PSD95 neste efeito. Evidências bioquímicas indicaram que a associação dos receptores NMDA com a PSD-95 é reduzida em resposta aos inibidores da GSK3 (CHEN et al., 2007). Além disso, dados eletrofisiológicos demonstraram que afetando o complexo NR2-PSD-95 causou uma diminuição gradual na corrente do receptor NMDA e bloqueou o efeito dos inibidores da GSK3 aplicados subsequentemente (CHEN et al., 2007). Assim, a GSK3 constitutivamente ativa é importante para estabilizar e/ou promover a expressão dos receptores NMDA de superfície que é afetada pela ligação entre PSD-95 e os receptores NMDA (CHEN et al., 2007).

Outra constatação a respeito da GSK3 e sua relação com os receptores NMDA nos é fornecida pelo trabalho de Yuan et al. (2013), eles observaram que o remifentanil, um potente agente opióide de curta

duração, fornece analgesia ótima durante a cirurgia, mas gera uma hiperalgesia pós-operatória, o que é desafiador para os anesthesiologistas. Assim, foi demonstrado que o tráfego e a ativação dos receptores NMDA têm um papel importante no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia pós-operatória induzida por este fármaco (YUAN et al., 2013). A hiperalgesia pós-operatória induzida pelo remifentanil, indicada pela diminuição do limiar térmico e mecânico na pata de ratos, foi prevenida pelo pré-tratamento dos animais com TDZD-8 (um inibidor da GSK3) (YUAN et al., 2013). A infusão com remifentanil aumentou a expressão do RNAm para GSK3 β e proteína na medula espinal. Além disso, a infusão intra-operatória do remifentanil aumentou o tráfego das subunidades do receptor NMDA (NR1 e NR2B) do pool intracelular para o pool na superfície da medula espinal, que foi atenuado pelo TDZD-8 (YUAN et al., 2013).

De acordo com o exposto acima as evidências experimentais demonstram que a inibição da GSK3 exerce importante efeito sobre os receptores NMDA, através de sua internalização. Talvez este seja um dos mecanismos envolvidos na diminuição da nocicepção ocasionada pelo tratamento dos animais com AR-A014418 nos modelos da nocicepção induzida pelo ácido acético, pela formalina (quando o inibidor foi administrado i.p. ou i.t.) e no modelo da PSNL. Entretanto, acreditamos que seja pouco provável que a internalização do receptor NMDA seja a principal responsável pela diminuição da nocicepção quando o AR-A014418 foi co-administrado com agonistas de receptores glutamatérgicos ou quando foi administrado juntamente com a formalina na superfície ventral da pata dos animais, pois, a internalização necessita de um certo tempo para ocorrer e como o inibidor da GSK3 foi injetado

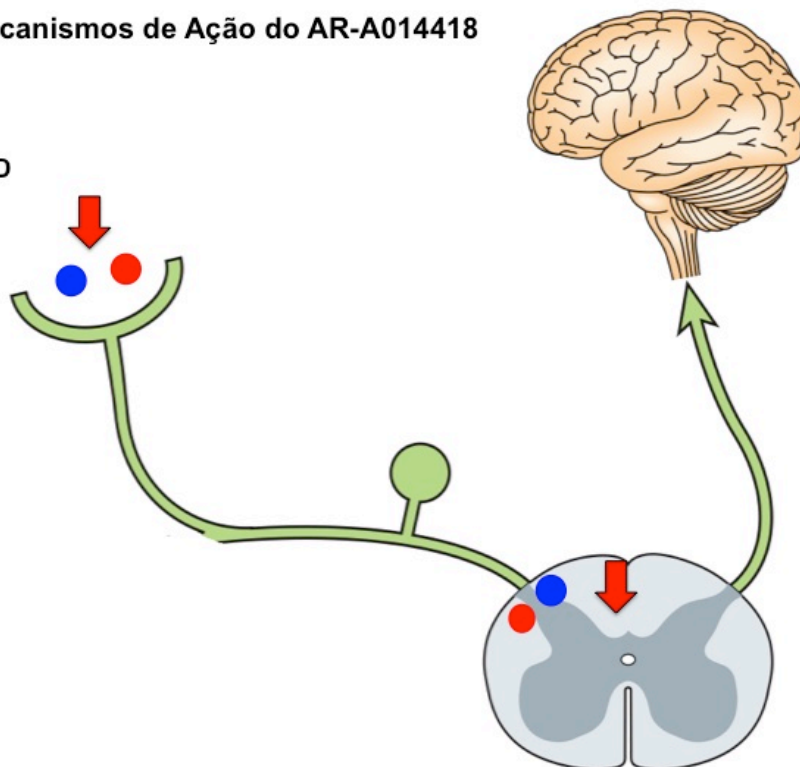
juntamente com o agente causador do comportamento nociceptivo a internalização destes receptores não seria a principal responsável por essa diminuição da nocicepção. Especula-se que o AR-A014418 possa agir diretamente nesses receptores, diminuindo a sua ativação, mas não encontramos dados na literatura para comprovar ou refutar esta hipótese. Na Figura 42 observa-se um esquema da participação dos receptores glutamatérgicos no efeito antinociceptivo do AR-A014418.

Figura 42- Participação do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do AR-A014418.

Prováveis Mecanismos de Ação do AR-A014418

● NMDA

● Trans-ACPD



Legenda: Acredita-se que o AR-A014418 possa exercer seu efeito antinociceptivo através da diminuição da ativação dos receptores para o glutamato: NMDA (ionotrópico), bem como trans-ACPD (metabotrópico). Este efeito pode ocorrer tanto periféricamente, evidenciado pela diminuição da nocicepção quando o AR-A014418 foi co-administrado com a formalina (agente flogístico); bem como centralmente, visto que a co-administração do AR-A014418 com agonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA ou trans-ACPD no espaço subaracnóideo lombar acarretou em diminuição da nocicepção quando comparados aos animais tratados com veículo + agonista glutamatérgico (NMDA ou trans-ACPD).

Fonte: adaptado de Scholz e Woolf (2002).

4.2 ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3

Neste estudo o inibidor da GSK3, o AR-A014418, diminuiu a nocicepção aguda ocasionada pela administração intratecal das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α e IL-1 β . Em outro experimento, realizado separadamente, utilizando um modelo de dor neuropática, a PSNL, foram avaliados os níveis das citocinas pró-inflamatórias supracitadas (TNF- α e IL-1 β), bem como de outras duas citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 e IL-1ra, nos segmentos lombares da medula espinal de camundongos neuropáticos, empregando a técnica de ELISA. A administração do inibidor da GSK3 foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α e IL-1 β na medula espinal e não alterou os níveis da IL-10 e da IL-1ra. Portanto, parece que a inibição da GSK3, através da utilização de seu inibidor, atua preponderantemente sobre as citocinas pró-inflamatórias nos modelos que foram usados nesta pesquisa.

A GSK3 é um fator vital para o processo inflamatório (MARTIN et al., 2005). Conseqüentemente, seus inibidores fornecem forte proteção anti-inflamatória (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). A inflamação é uma função crucial no sistema imune dos mamíferos, envolvendo muitos tipos de células e utilizando muitos mediadores de sinalização para fornecer proteção contra patógenos (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). As respostas do sistema imune são classificadas como adaptativas ou inatas baseadas no tempo de ativação e antígeno (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). A primeira linha de defesa contra patógenos é fornecida pelas células imunes inatas que atuam como sentinelas para detectar sinais de perigo, que incluem

células como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos etc. (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). Quando ativados, os macrófagos sentinelas e outras células liberam mediadores solúveis da inflamação, como citocinas e quimocinas, que promovem infiltração de outras células imunes no tecido lesado (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

A resposta imune adaptativa, por outro lado, é uma resposta mais lenta, dependente de células T e células B que reagem com células apresentadoras de antígenos. Assim, juntos, a resposta imune inata e adaptativa estão amplamente envolvida no controle do processo inflamatório. A desregulação do sistema imunológico pode contribuir para uma variedade de condições patológicas (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

As células da microglia são consideradas equivalentes aos macrófagos da parte periférica do sistema nervoso e acredita-se que sejam células imunes chave da parte central do sistema nervoso (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007; MATYSZAK, 1998). Uma variedade de estressores ativam a glia, como isquemia, trauma, infecção, e muitas doenças neurodegenerativas, levando a duas principais respostas da glia: inflamação e migração (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007; MATYSZAK, 1998). Agudamente, as respostas da glia são benéficas porque elas permitem que a glia migre para os locais lesados, onde ela produz citocinas e fatores de crescimento que podem contribuir para a recuperação dos neurônios afetados (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007; MATYSZAK, 1998; SCHWARTZ ET AL., 2006). De forma inversa, a resposta inflamatória de longa duração, mediada pela ativação crônica da glia parece ser prejudicial à função e sobrevivência neuronais

(JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007; MATYSZAK, 1998; SCHWARTZ et al., 2006).

Portanto, é de interesse que a GSK3 foi identificada como uma forte reguladora da inflamação e da migração celular. Esses relatos demonstram que a GSK3 pode contribuir para os efeitos prejudiciais de longa duração da inflamação nas partes periférica e central do sistema nervoso e de que condições que envolvam inflamação crônica possam ser melhoradas pela aplicação terapêutica de inibidores da GSK3 (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

A identificação da GSK3 como a principal reguladora das respostas inflamatórias periféricas mostrou que ela promove a produção, induzida por estímulo, de várias citocinas e, subsequente, desenvolvimento dos sintomas de doenças em modelos animais de condições inflamatórias. Este papel da GSK3 na inflamação foi primeiramente estabelecido pela demonstração de que a atividade da GSK3 é necessária para a total estimulação da produção de várias citocinas inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α), após estimulação de vários tipos de receptores *Toll-like* (3, 4, 5 e 9) em leucócitos e em células mononucleares sanguíneas periféricas (MARTIN et al., 2005). De maneira inversa, a GSK3 reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Reciprocamente, inibidores da GSK3 reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Isto levantou uma nova hipótese, de que os inibidores da GSK3 poderiam ter efeitos benéficos em condições que envolvem a resposta inflamatória (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). Os inibidores da

GSK3 reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pela família de receptores *Toll-like* pela inibição da atividade transcricional do fator nuclear (NF)- κ B (MARTIN et al., 2005). Isso foi suportado pelo achado prévio de que a GSK3 é necessária para a completa atividade transcricional do NF- κ B (HOEFLICH et al., 2000). Interessantemente, foi demonstrado que a GSK3 realiza a atividade transcricional do NF- κ B de uma maneira promotor-específica, demonstrando que ela seletivamente favorece a expressão de um subgrupo de genes ativado pelo NF- κ B (STEINBRECHER et al., 2005). Por exemplo, a expressão de IL-6 e proteína 1 quimioatrativa de monócitos mediada pelo NF- κ B requer GSK3 para eficiente expressão, mas o I κ B α e a proteína 2 inflamatória de macrófago não (STEINBRECHER et al., 2005). Esta ação seletiva da GSK3 sobre a expressão gênica induzida por NF- κ B facilita o uso terapêutico anti-inflamatório, visto que isto indica que a inibição da GSK3 não interfere nas outras ações do NF- κ B (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). O envolvimento da GSK3 nas respostas inflamatórias foram expandidos a outras condições, os inibidores da GSK3 reduzem a resposta inflamatória sistêmica, disfunção renal e hepatotoxicidade associada a endotoxemia em ratos (DUGO et al., 2005). Em outras condições inflamatórias, os inibidores da GSK3 diminuem as respostas inflamatórias em colite experimental induzida em ratos (WHITTLE et al., 2006) e na artrite causada pela administração de colágeno tipo II em camundongos (CUZZOCREA et al., 2006). Artrite e peritonite também foram reduzidas em camundongos pela administração de lítio, um inibidor da GSK3 (HU et al., 2006).

De modo geral, é evidente que a GSK3 é um componente importante da resposta inflamatória e de que a utilização de inibidores da GSK3 podem ter efeitos terapêuticos em várias condições associadas a inflamação (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007).

Os modelos nociceptivos utilizados no presente trabalho apresentam um importante componente inflamatório, evidenciado por trabalhos publicados na literatura, por exemplo, a dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β encontram-se aumentadas no fluido cerebrospinal de camundongos submetidos à nocicepção induzida pelo ácido acético (i.p.) e pela formalina (i.pl.) (THOMAZZI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2000; CASTILLO et al., 1995; MALMBERG et al., 1997; OKUDA et al., 1984; SCHAIBLE; SCHMIDT, 1985) e, no modelo da PSNL, a ativação microglial libera quantidade expressiva destas mesmas citocinas na medula espinal de camundongos neuropáticos (WOODCOCK; WITTER; DIONNE, 2007), portanto, um mecanismo relevante através do qual o inibidor utilizado neste estudo possa exercer sua ação é através da diminuição da liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β .

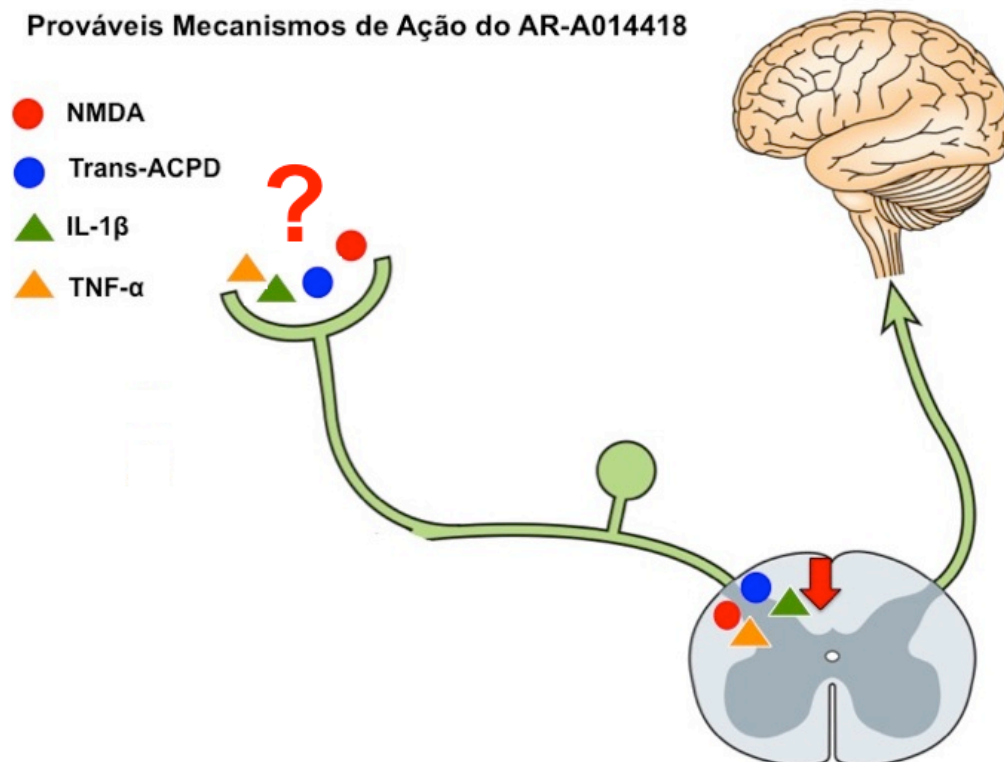
A ativação glial é uma reação típica a lesão da parte central e periférica do sistema nervoso (OSIKOWICZ et al., 2012). Muitos estudos mostram aumento da imunoreatividade da microglia e astrócitos no segmento ipsilateral da medula espinal após lesão nervosa (WEN et al., 2011; OSIKOWICZ et al., 2012). Os astrócitos ativados após lesão nervosa liberam glutamato, que aumenta a excitabilidade neuronal em neurônios do corno dorsal por ativarem receptores ionotrópicos (PIANI et al., 1993) ou metabotrópicos (MILLS et al., 2000) para o glutamato. A microglia ativada expressa marcadores de superfície e receptores e

libera substâncias como o glutamato, citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas (HANISCH, 2002).

Um estudo publicado por Beurel e Jope (2010) destaca um dos papéis da GSK3 na regulação da tolerância inflamatória em astrócitos. A tolerância inflamatória é a down-regulação da inflamação sob estímulos repetidos, sua ocorrência é bem estabelecida em células imunes periféricas (BEUREL; JOPE, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre esta tolerância inflamatória no encéfalo, embora ela possa fornecer um importante mecanismo de proteção em casos de inflamação prolongada, que ocorre em casos de doenças neurodegenerativas e em estados de dor crônica (BEUREL; JOPE, 2010).

Beurel e Jope (2010) realizaram duas estimulações sequenciais com lipopolissacarídeo (LPS) em astrócitos e a inibição da GSK3 aumentou a tolerância e reduziu a sensibilização destas células gliais. Estes achados identificam o importante papel dos inibidores da GSK3 em reduzir a neuroinflamação por promover tolerância (BEUREL; JOPE, 2010). Um esquema demonstrando a participação das citocinas pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo do AR-A014418 pode ser observado na Figura 43.

Figura 43- Participação das citocinas pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo do AR-A014418.



Legenda: Além da diminuição da ativação dos receptores para o glutamato: NMDA (ionotrópico) e trans-ACPD (metabotrópico) centralmente. O AR-A014418 foi capaz de diminuir a nocicepção dos animais quando co-administrado com as seguintes citocinas pró-inflamatórias: TNF- α e IL-1 β no espaço subaracnóideo lombar. A participação destas citocinas pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo do AR-A014418 foi confirmada pela dosagem das mesmas nos segmentos lombares da medula espinal de camundongos no modelo da PSNL. Acreditamos que a inibição dos receptores para o glutamato e a diminuição da liberação das citocinas pró-inflamatórias também esteja ocorrendo no terminal periférico do neurônio aferente primário, contribuindo para a diminuição da sua ativação.

Fonte: adaptado de Scholz e Woolf (2002).

4.3 ENVOLVIMENTO DAS CATECOLAMINAS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA INIBIÇÃO DA GSK3

4.3.1 GSK3 e serotonina

O neurotransmissor serotonina é extremamente importante nas vias descendente inibitórias da dor e há evidências de que a neurotransmissão serotoninérgica está prejudicada em estados de dor crônica (WEI; GU; CHU, 2012; LIU et al., 2010). Liu et al. (2010) demonstraram uma diminuição do conteúdo de serotonina e do ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) e um aumento da taxa de *turnover* da serotonina (5-HIAA/5-HT) no corno dorsal da medula espinal lombar ipsilateral ao local de realização da ligação do nervo espinal. Estes dados indicam uma perda ou diminuição do sistema inibitório serotoninérgico sobre o processamento espinal da informação nociceptiva após lesão do nervo espinal e esta diminuição do sistema inibitório serotoninérgico está envolvida no desenvolvimento da sensibilização central e dor neuropática induzida pela lesão nervosa (LIU et al., 2010).

Portanto, uma das hipóteses formuladas neste estudo, foi a de que a inibição da GSK3 poderia diminuir a nocicepção dos animais por atuar nas vias serotoninérgicas. Neste trabalho, evidenciamos que o efeito antinociceptivo do AR-A014418, no modelo de dor neuropática induzida por PSNL, foi prevenido quando os animais receberam injeções i.p. (por 4 dias consecutivos) de ρ -clorofenilalanina metil éster (PCPA), um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, enzima esta importante na produção de serotonina. Mas existem relatos na literatura relacionando este importante neurotransmissor com a atividade da

GSK3? De fato, encontram-se algumas evidências que a GSK3 é capaz de alterar a atividade de um autoreceptor para serotonina, maiores detalhes são observados no texto que segue.

A GSK3 β , mas não a GSK3 α , foi identificada como moduladora direta dos receptores 5-HT1B (CHEN et al., 2011). Os receptores 5-HT1B contêm oito locais de fosforilação para GSK3 (DOBLE; WOODGETT, 2003), que se localizam nas alças intracelulares 1, 2 e 3 do receptor acoplado a proteína G (GPCR) (POLTER; LI, 2011; CHEN; SALINAS; LI, 2009).

O efeito da GSK3 β sobre os receptores 5-HT1B é facilitar a atividade deste receptor, que é o oposto de outras proteínas cinases que regulam os GPCR (GAINETDINOV et al., 2004). O receptor 5-HT1B é um autoreceptor, que é definido como o receptor presente no terminal do qual o transmissor é liberado e, normalmente, limitam a liberação adicional de serotonina (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2003).

No tecido encefálico de camundongos, o pré-tratamento de fatias corticais com inibidores da GSK3 aboliu completamente o efeito inibitório dos receptores 5-HT1B sobre a liberação de [H^3]-serotonina radiotiva evocada por cloreto de potássio (CHEN et al., 2011), uma função característica dos autoreceptores 5-HT1B nos terminais axonais de neurônios serotoninérgicos (TRILLAT et al., 1997; SARI, 2004; RIAD et al., 2000). Outro aspecto importante é de que os inibidores da GSK3 também apresentam atividade tipo antidepressiva evidenciado em modelos comportamentais como o teste de suspensão da cauda e teste do nado forçado (BUDNI et al., 2012; GOULD et al., 2004; ROSA et al., 2008) e também facilitam o efeito anti-imobilidade do agonista do

receptor 5-HT1B, anpirtolina, no teste de suspensão da cauda (CHEN et al., 2011).

No estudo de Zhou et al., (2012) foram utilizados camundongos *knockout* para GSK3 β em neurônios serotoninérgicos (snGSK3 β -KO), para examinar os efeitos da GSK3 β sobre os autoreceptores 5-HT1B. Os resultados desta pesquisa demonstraram que a GSK3 β modula a função dos neurônios serotoninérgicos, um destes efeitos é modular seletivamente a atividade dos autoreceptores 5-HT1B que tem impacto sobre o disparo de neurônios serotoninérgicos, produção de AMPc e liberação de serotonina (ZHOU et al., 2012).

A taxa de disparo neuronal (neurônios serotoninérgicos presentes no núcleo da rafe) é maior em camundongos snGSK3 β -KO em condições fisiológicas, uma evidência que demonstra que a GSK3 β ativa contribui para o limiar da atividade neuronal serotoninérgica sob condições fisiológicas (ZHOU et al., 2012). Também levanta a possibilidade de que durante condições patológicas, onde a GSK3 β esteja hiperativa, a inibição terapêutica apropriada da GSK3 β possa restaurar a atividade neuronal serotoninérgica (ZHOU et al., 2012). Os achados deste estudo fornecem uma nova evidência, fisiológica e comportamental, de que a GSK3 β modula a sinalização mediada pelo autoreceptor 5-HT1B, o que intitula a GSK3 β como um modulador ativo da neurotransmissão serotoninérgica (ZHOU et al., 2012). Isso pode ser parcialmente explicado pelos diversos efeitos da GSK3 β nos comportamentos relacionados a emoção, ansiedade e atividade (LI; JOPE, 2010). Notavelmente, dentre os efeitos *in vivo* do lítio (FRELAND; BEAULIEU, 2012; VALVEZAN; KLEIN, 2012), um inibidor da GSK3, foi observado que ele inibe os receptores 5-HT1B e

este receptor foi proposto como sendo um alvo terapêutico para o lítio (MASSOT et al., 1999). Os achados de que o lítio rompe a interação direta entre GSK3 β e receptores 5-HT1B em células transfectadas (CHEN; SALINAS; LI, 2009), demonstra que o provável efeito do lítio sobre a função do receptor 5-HT1B seja resultado da inibição da GSK3 (ZHOU et al., 2012).

As evidências experimentais supracitadas comprovam a hipótese de que a diminuição da atividade da GSK3; seja através da administração de inibidores *in vivo* e *in vitro*, ou da utilização de animais geneticamente modificados, como os animais *knockouts* para GSK3 β em neurônios serotoninérgicos presentes no núcleo da rafe; é capaz de aumentar a neurotransmissão serotoninérgica (ZHOU et al., 2012). Possivelmente este seja um dos mecanismos pelos quais o AR-A014418 esteja diminuindo a nocicepção nos modelos utilizados neste trabalho.

4.3.2 GSK3 e dopamina

Outra substância que foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do AR-A014418, no modelo da PSNL, foi a α -metil- ρ -tirosina (AMPT), um inibidor da enzima tirosina hidroxilase. A administração do AMPT nos possibilitou investigar a participação dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no efeito antinociceptivo deste inibidor da GSK3. Serão citados alguns detalhes sobre a GSK3 e os receptores dopaminérgicos e um breve comentário sobre os receptores noradrenérgicos, tendo em vista os escassos dados literários

relacionando esta importante enzima com a neurotransmissão noradrenérgica.

Os receptores para dopamina são receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que medeiam a neurotransmissão lenta (MISSALE et al., 1998; GREENGARD, 2001). A dopamina tem um importante papel na modulação da neurotransmissão mediada por GABA e glutamato, e está envolvida em funções encefálicas como: movimento, emoção, recompensa e afeto (GREENGARD, 2001; GAINETDINOV; SOTNIKOVA; CARON, 2002). Conseqüentemente as drogas que atuam na neurotransmissão dopaminérgica são ferramentas amplamente usadas no manejo de transtornos neuropsiquiátricos múltiplos, incluindo esquizofrenia, transtornos de humor, doença de Parkinson, transtorno de hiperatividade déficit de atenção e síndrome de Tourette (GREENGARD, 2001; GAINETDINOV; SOTNIKOVA; CARON, 2002). A principal região que contém neurônios dopaminérgicos no encéfalo é no sistema nigro-estriatal, compreendem neurônios que contêm dopamina e que chegam da substância negra e da área tegmental ventral que se projeta a neurônios contendo GABA nos núcleos putâmen e accumbens (estriado) (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007).

Classicamente, as funções dos receptores dopaminérgicos estão associadas com a regulação da proteína cinase A (PKA)/AMPC através de sinalização mediada por proteína G (MISSALE et al., 1998; GREENGARD, 2001). Duas classes de GPCR medeiam as funções da dopamina. A classe de receptores D_1 (D_1 a D_5), acoplados principalmente a $G\alpha_s$, estimula a produção do segundo mensageiro AMPC e a atividade da PKA. Pelo contrário, a classe de receptores D_2

(receptores D₂, D₃ e D₄) acoplados a G $\alpha_{i/o}$, que regula negativamente a produção de AMPc, resultando na diminuição da atividade da PKA. A classe de receptores D₂ também modula os níveis intracelulares de Ca²⁺ agindo em canais iônicos ou ativando a liberação dos estoques intracelulares de Ca²⁺ (MISSALE et al., 1998; GREENGARD, 2001). Outro mecanismo de sinalização relevante é a via que envolve a proteína cinase B (PKB/Akt)-GSK3, para a expressão de comportamentos associados à dopamina e ação de drogas dopaminérgicas (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007).

A sinalização e função dos receptores dopaminérgicos também pode ocorrer por um mecanismo independente de AMPc, destacando-se o papel das β -arrestinas. As β -arrestinas podem atuar como mediadores de sinalização independentes da proteína G, por ancorar outras proteínas como as cinases e seus substratos (LUTTRELL et al., 2001; SHENOY et al., 2006; LEFKOWITZ; SHENOY, 2005). Interessantemente, camundongos knockout para β -arrestina 1 e β -arrestina 2 apresentam reduzidas respostas comportamentais ao agonista do receptor para a dopamina, a apomorfina (BEAULIEU et al., 2005; GAINETDINOV et al., 2004). Um desses mecanismos foi identificado e mostra que a β -arrestina 2 é uma sinalização intermediária implicada na regulação da Akt e GSK3 pela dopamina, que é independente de AMPc (BEAULIEU et al., 2006; BEAULIEU et al., 2004). Investigações da sinalização celular em resposta aos níveis extracelulares persistentemente elevados de dopamina identificaram uma redução na fosforilação da Akt e a inativação da Akt nestes camundongos resulta em concomitante ativação da atividade da GSK3 (BEAULIEU et al., 2004). Estas mudanças bioquímicas são revertidas pela inibição da síntese de dopamina, pelo

bloqueio do receptor D₂ ou administração de lítio (inibidor da GSK3) (BEAULIEU et al., 2004). Esses dados demonstram o envolvimento da GSK3 como importante mediadora na ação da dopamina e da ação do lítio *in vivo* e sugere que a modulação da via Akt/GSK3 possa ser relevante para doenças relacionadas com a dopamina, como transtorno de hiperatividade déficit de atenção e esquizofrenia (BEAULIEU et al., 2004).

A Akt e a GSK3 são reguladas pelos receptores da classe D₂ (BEAULIEU et al., 2004). Além do mais, os antagonistas dos receptores da classe D₂ e o antipsicótico haloperidol leva a aumentada fosforilação da Akt e a inibição da GSK3 em camundongos (NORTON et al., 2007). A administração de anfetamina ou do agonista não-seletivo do receptor para dopamina, a apomorfina; resulta em inibição da atividade da Akt, confirmando a regulação da via Akt-GSK3 pela dopamina (BEAULIEU et al., 2005; BEAULIEU et al., 2004). Os inibidores da GSK3 podem reduzir a atividade locomotora em animais tratados com anfetamina (BEAULIEU et al., 2004; GOULD et al., 2004).

A Akt e a GSK3 estão envolvidas na ação de drogas antipsicóticas como o haloperidol, que exerce a maioria de suas ações bloqueando a classe de receptores D₂, dando suporte ao papel da neurotransmissão dopaminérgica na etiologia da esquizofrenia, por exemplo (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007). Estudos de associação genética estabeleceram uma ligação entre a desregulação da sinalização da Akt, atividade ou níveis de expressão reduzidos, e a esquizofrenia (EMAMIAN et al., 2004; ZHAO et al., 2006).

Os denominados antipsicóticos atípicos ativam a Akt (KANG et al., 2004) ou mimetizam a atividade da Akt, aumentando a fosforilação

de seu substrato, a GSK3 (tornando-a menos ativa) (LI et al., 2006). Os antipsicóticos atípicos podem ser distinguidos funcionalmente dos antipsicóticos típicos por sua reduzida afinidade e baixa especificidade pelos receptores D₂ (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007).

Além disso, drogas que afetam a neurotransmissão serotoninérgica, tais como os inibidores da recaptação de serotonina, inibidores da monoamina oxidase e antidepressivos tricíclicos, amplificam a ação dos antipsicóticos atípicos sobre a GSK3 (LI et al., 2006). Interessantemente, foi relatado aumento da atividade da GSK3 no córtex pré-frontal de vítimas suicidas deprimidas (KAREGE et al., 2007). A Akt e a GSK3 funcionam como integradoras de sinal para a transmissão dopaminérgica e serotoninérgica, e contribuem para a ação de drogas nesses sistemas de neurotransmissores (BEAULIEU, 2007).

A Akt e a GSK3 foram associadas com a ação do estabilizador de humor, lítio. O lítio é um inibidor direto da GSK3, que pode inibir a atividade desta cinase em células, através de um mecanismo indireto, envolvendo a ativação da Akt (BEAULIEU et al., 2004; BEAULIEU, 2007; DE SARNO; LI; JOPE, 2002). Administração aguda e crônica do lítio inibe a atividade da GSK3 encefálica em camundongos, como revelado pelo aumento da fosforilação do domínio regulatório N-terminal (BEAULIEU et al., 2004; DE SARNO; LI; JOPE, 2002). Além disso, inibidores da GSK3 e reduzida expressão da GSK3 reproduzem algumas ações comportamentais do lítio em roedores, incluindo sua ação inibitória sobre a hiperatividade locomotora dependente de dopamina (BEAULIEU et al., 2004; GOULD et al., 2004; O'BRIEN et al., 2004).

Pelos relatos expostos acima pode-se perceber que ativação da neurotransmissão dopaminérgica é capaz de reduzir a atividade da Akt e

consequentemente, aumentar a atividade da GSK3. Como é bem aceito que a neurotransmissão dopaminérgica está relacionada com a diminuição da nocicepção (WEI; VIISANEN; PERTOVAARA, 2009; mais detalhes no próximo parágrafo) não encontramos explicação plausível sobre o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito de diminuir a nocicepção ocasionado pelo AR-A014418.

Relatos na literatura demonstram a participação do sistema dopaminérgico na diminuição da nocicepção, como exemplo pode-se citar o trabalho de Wei; Viisanen e Pertovaara (2009). Eles determinaram o papel dos receptores D₂ no grupo de células A11 na modulação descendente da hipersensibilidade ao estímulo mecânico (utilizando filamentos de von Frey) induzida pela ligação do nervo espinal em ratos (WEI; VIISANEN; PERTOVAARA, 2009). A administração de quinpirola (agonista de receptores de dopamina D₂/D₃) das células da região A11 atenuou a hipersensibilidade dos animais e este efeito foi prevenido pelas administrações de: L-741,626 (antagonista dos receptores D₂), racloprida (antagonista dos receptores D₂/D₃) e bicuculina (antagonista dos receptores GABA_A) em A11 (WEI; VIISANEN; PERTOVAARA, 2009). Além disso, a administração espinal de atipamezola (antagonista dos adrenoceptores α_2) e WAY-100635 (antagonista do receptor 5-HT_{1A}), mas não de racloprida ou bicuculina, reduziram o efeito antinociceptivo da quinpirola injetada em A11 (WEI; VIISANEN; PERTOVAARA, 2009). Estes resultados indicam que a ativação de receptores D₂ em A11 pode diminuir a hipersensibilidade neuropática, por mecanismos que envolvem receptores GABA_A no hipotálamo e pelas vias noradrenérgicas descendentes agindo em adrenoceptores α_2 espinais,

possivelmente com contribuição da via descendente serotoninérgica agindo em receptores 5-HT_{1A} espinais (WEI; VIISANEN; PERTOVAARA, 2009).

4.3.3 GSK3 e norepinefrina

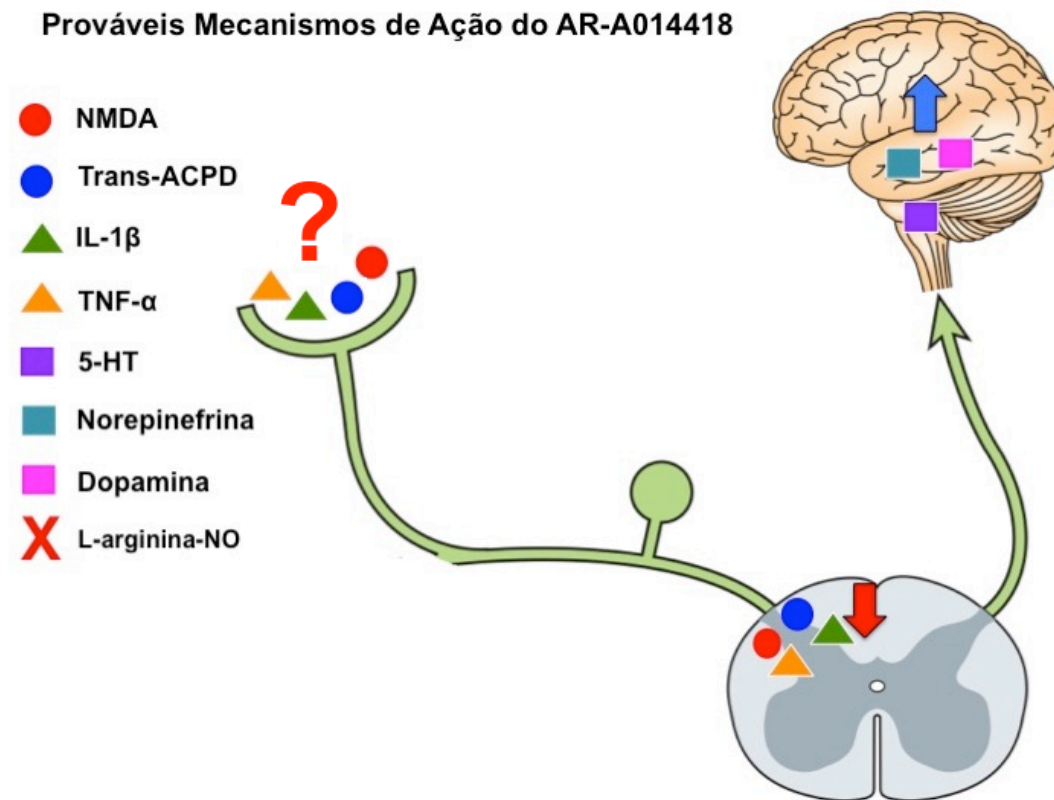
É escassa a publicação de artigos científicos que relatam a relação entre a GSK3 e a norepinefrina. No entanto, Siraskar et al. (2011) demonstraram que a GSK3 é fosforilada e sua atividade é inibida pela proteína cinase B (PKB/ Akt) e pelas isoformas das cinases induzíveis por glicocorticoide e soro (SGK), que são ativadas por fatores de crescimento através da sinalização da fosfatidilinositol (PI) 3 cinase (SIRASKAR et al. 2011). A inibição da GSK3 dependente de PI3/PKB/SGK é interrompida em camundongos *knockin* para os genes alvos, com mutação e assim resistente PKB/SGK, onde o resíduo de serina do sítio de fosforilação PKB/SGK foi substituído pelo resíduo alanina (SIRASKAR et al. 2011). Os resultados deste estudo mostram que as concentrações de norepinefrina estavam aumentadas nestes animais quando comparados aos animais selvagens (SIRASKAR et al. 2011). Portanto, a atividade abolida da GSK3, através de manipulação genética, foi capaz de aumentar a concentração de norepinefrina no plasma e urina destes animais, revelando uma nova função para a via supracitada, a de regular a liberação de norepinefrina (SIRASKAR et al. 2011).

Corroborando com os achados do artigo de Siraskar et al., (2011) estão os de Marioka et al., (2010) pois eles demonstram que a

norepinefrina, agindo em receptores β_2 , fosforila a tirosina 216 da GSK3, ativando-a (MORIOKA et al., 2010).

Os resultados destas pesquisas nos levam a acreditar que o aumento da atividade da GSK3 é capaz de aumentar os níveis de norepinefrina, bem como a norepinefrina, agindo em seus receptores D_2 , também é capaz de aumentar a atividade da GSK3. Encontramos situação semelhante à exposta no item anterior (4.3.2), tornando difícil a compreensão de como a administração de AMPT foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do AR-A014418. Na Figura 44 está representada a possível participação das catecolaminas no efeito do AR-A014418 em diminuir a nocicepção e para completar os mecanismos de ação avaliados no presente trabalho também está demonstrado que a via L-arginina-óxido nítrico parece não participar do efeito antinociceptivo do AR-A014418.

Figura 44. Participação das catecolaminas no efeito antinociceptivo do AR-A014418.



Legenda: Além da participação do sistema glutamatérgico (receptores NMDA e trans-ACPD) e das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no efeito antinociceptivo do AR-A014418 evidenciamos a participação das catecolaminas nesta diminuição da nocicepção; isto ficou evidente pela prevenção da antinocicepção ocasionada pelo AR-A014418 quando os animais foram pré-tratados com PCPA ou AMPT no modelo da PSNL. A via L-arginina-óxido nítrico parece não estar envolvida na diminuição da nocicepção ocasionada por este inibidor da GSK3 (o pré-tratamento dos animais com L-arginina não alterou o efeito antinociceptivo do AR-A014418 na PSNL).

Fonte: adaptado de Scholz e Woolf (2002).

4.4 RELAÇÃO ENTRE CATECOLAMINAS, GLUTAMATO E CITOCINAS

Pesquisando a relação entre serotonina e receptores NMDA encontram-se trabalhos interessantes relacionando estes temas na depressão (Para revisão consultar MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011). Como a depressão e a dor compartilham muitos mecanismos neuropatológicos achamos conveniente mencionar estes estudos. Os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina são drogas efetivas para a depressão, portanto, não há dúvidas da importância da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica na patofisiologia da depressão (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011). Na depressão maior (MD) a hiperfunção glutamatérgica parece estar intimamente relacionada com a deficiência da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica. A função do sistema glutamatérgico está relacionada ao sistema imune e ao metabolismo triptofano-cinurenina, ambos desempenhando um papel chave na patofisiologia da MD (MÜLLER; SCHWARZ, 2007). Embora o sistema glutamatérgico possa influenciar diretamente ou indiretamente a transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, poucos dados foram publicados relacionando esta interação. Antagonistas do receptor NMDA aumentam os níveis de serotonina no encéfalo (YAN et al., 1997; MARTIN P; CARLSSON; HJORTH, 1998). Estudos demonstraram a atividade aumentada do sistema glutamatérgico no plasma de pacientes depressivos (KIM et al., 1982; ALTAMURA et al., 1993; MAURI et al., 1998). Consistente com o ponto de vista de que uma aumentada atividade do sistema glutamatérgico e o agonismo do receptor NMDA estão associados ao humor deprimido, uma redução da atividade glutamatérgica pelo

antagonismo do receptor NMDA pode exercer efeitos antidepressivos (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011). Antagonistas do receptor para NMDA como MK-801 (MAJ et al., 1992; TRULLAS; SKOLNICK, 1990), cetamina (YILMAZ et al., 2002) e memantina (OSSOWSKA; KLENK-MAJEWSKA; SZYMCZYK, 1997) exibiram efeitos antidepressivos em diferentes modelos animais.

No artigo de Müller; Myint e Schwarz (2011) constam também informações relevantes sobre as citocinas pró e anti-inflamatórias e a neurotransmissão glutamatérgica, que complementam as informações citadas no item 4.2. Vamos relatá-las em maiores detalhes no texto que segue.

Um modelo inflamatório de MD é o ‘comportamento de doença’ (*sickness behaviour*), uma reação do organismo à infecção e inflamação. Esse comportamento de doença é caracterizado por fraqueza, mal-estar, apatia, dificuldade de concentração, letargia, interesse diminuído pelo ambiente e reduzida ingestão de alimentos – que são sintomas tipo depressivos (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011). Os sintomas psicopatológicos relacionados com a doença durante infecção e inflamação são mediados por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e interferon gama (IFN- γ). O caminho (via) destas citocinas do sistema imune periférico para o encéfalo é através de neurônios aferentes e através de um direcionamento direto na amígdala e outras regiões após difusão nos órgãos circunventriculares e plexos corioides (DANTZER, 2001). Além disso, as citocinas podem se ligar (prender) ao endotélio vascular induzindo a geração de mediadores centrais como as prostaglandinas; e também podem entrar no encéfalo por um sistema de transporte ativo (BANKS; KASTIN; BROADWELL, 1995).

Os mecanismos que contribuem para a inflamação e que podem causar estados depressivos estão sob influência indireta de moléculas inflamatórias como a proteína C-reativa (CRP) ou prostaglandina E2 (PGE2) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sobre os processos no SNC (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011):

i) uma influência direta das citocinas pró-inflamatórias sobre o metabolismo da serotonina e noradrenalina;

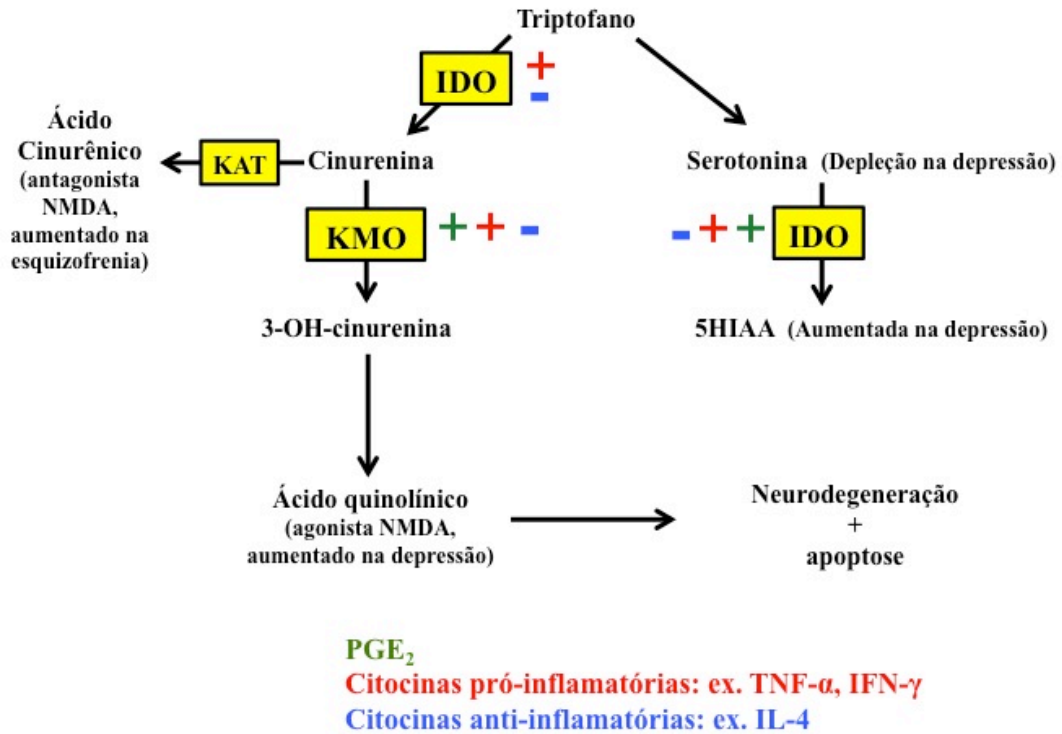
ii) um desequilíbrio da resposta imune tipo 1-tipo 2, levando a um aumentado metabolismo do triptofano e serotonina por ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no CNS que está associada com: uma diminuída disponibilidade de triptofano e serotonina e uma alteração do metabolismo da cinurenina com um desequilíbrio em favor da produção do ácido quinolínico, agonista do receptor NMDA.

Características da ativação imune na MD inclui números aumentados de linfócitos circulantes e células fagocíticas, níveis aumentados no soro de indicadores de células imunes ativadas (neopterina, receptores solúveis IL-2), concentrações aumentadas no soro de proteínas da fase aguda (APP's) positivas, acoplado com reduzidos níveis de APP's negativas, bem como, liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como: IL-1, IL-2, TNF- α e IL-6 através de macrófagos ativados e IFN- γ através de células T ativadas (IRWIN, 1999; MAES et al., 1995 a, b; MIKOVA et al, 2001; MÜLLER et al., 1993; NUNES et al., 2002).

A enzima IDO metaboliza triptofano a cinurenina, a cinurenina é então convertida a ácido quinolínico através do intermediário 3-HK pela enzima cinurenina hidroxilase (MELLOR; MUNN, 1999). Ambos IDO e cinurenina hidroxilase são induzidas pela citocina do tipo 1, a IFN- γ

(MELLOR; MUNN, 1999). A atividade da IDO é um importante componente regulatório no controle da proliferação dos linfócitos, ativação da resposta imune tipo 1 e a regulação do metabolismo do triptofano (MELLOR; MUNN, 1999). Ela induz uma parada no ciclo celular do linfócito devido ao catabolismo do triptofano (MUNN et al., 1999). Diferente das citocinas do tipo 1, as citocinas do tipo 2: IL-4 e IL-10 inibem o catabolismo do triptofano mediado pela IDO e induzido pelo IFN- γ (WEISS et al., 1999) (Figura 45). A IDO está localizada em vários tipos de células, incluindo monócitos e células microgliais (ALBERATI-GIANI et al., 1996). Uma diminuição da disponibilidade da triptofano no CNS mediada pela IDO e induzida por IFN- γ pode levar à deficiência serotoninérgica no CNS, considerando que a disponibilidade da triptofano é uma das limitações para a síntese de serotonina. Outras moléculas pró-inflamatórias, como: PGE2 ou TNF- α , entretanto, induzem sinergicamente com a IFN- γ um aumento na atividade da IDO (BRAUN; LONGMAN; ALBERT, 2005; KWIDZINSKI et al., 2005; ROBINSON; HALE; CARLIN, 2005).

Figura 45. Influência das citocinas sobre as enzimas do metabolismo do triptofano- serotonina-cinurenina na depressão.



Legenda: influência das citocinas pró- e anti-inflamatórias sobre as enzimas do metabolismo triptofano-serotonina-cinurenina na depressão. A preponderância das citocinas pró-inflamatórias na MD está associada com atividade aumentada da IDO e KMO, por exemplo, aumentada degradação de serotonina a 5-HIAA e em favor da via da síntese do ácido quinolínico. As citocinas anti-inflamatórias (por exemplo a IL-4) inibem a atividade da IDO.

Fonte: adaptado de Müller; Myint e Schwarz (2011).

Um estudo interessante mostrou que a imunoterapia com IFN- α foi seguida por um aumento dos sintomas depressivos e das concentrações de cinurenina no soro e, por reduzidas concentrações de triptofano e serotonina (BONACCORSO et al., 2002). A razão cinurenina/triptofano, que reflete a atividade da IDO, aumentou significativamente (BONACCORSO et al., 2002). Mudanças nos sintomas depressivos foram positivamente correlacionados com

cinurenina e negativamente correlacionados com as concentrações de serotonina (BONACCORSO et al., 2002). O estudo de Bonaccorso et al. (2002) e de Capuron et al. (2003) mostram claramente que a atividade da IDO é aumentada pelo IFN, levando a produção aumentada de cinurenina e a uma depleção da triptofano e da serotonina. O metabolismo subsequente da cinurenina, entretanto, parece desempenhar um papel importante nos estados psicopatológicos: ácido quinolínico – um dos produtos finais do metabolismo da cinurenina – apresenta efeitos neurodegenerativos e está aumentado no encéfalo de pacientes com MD (LEONARD; MYINT, 2006), enquanto que o aumento do ácido cinurênico estava aumentado no encéfalo de pacientes esquizofrênicos (OLSSON et al., 2009).

Além dos efeitos da resposta imune pró-inflamatória sobre o metabolismo da serotonina, outros sistemas de neurotransmissores, em particular o sistema catecolaminérgico, estão envolvidos na depressão (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2011). Embora a relação da ativação imune e a deficiência da neurotransmissão catecolaminérgica ainda não ter sido bem estudada, o aumento da atividade da enzima monoamina oxidase, que leva a diminuída neurotransmissão noradrenérgica, pode ser um efeito indireto da produção aumentada de cinurenina e ácido quinolínico (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

Schipke, Heuser e Peters (2011) também destacam o papel do glutamato nos transtornos do humor e sua sinalização. Os astrócitos estão envolvidos no metabolismo do glutamato e a interessante observação deste grupo de pesquisadores foi de que a serotonina (amina neurotransmissora derivada do triptofano) causa uma sinalização de cálcio nos astrócitos (retardada, assincrônica e algumas vezes de forma

oscilatória), que é inibida pela presença do glutamato; estes experimentos foram realizados em fatias do córtex pré-frontal de camundongos (SCHIPKE; HEUSER; PETERS, 2011). Portanto, a sinalização de cálcio nos astrócitos causada pela serotonina pode ser uma ligação entre as vias de sinalização serotoninérgicas e glutamatérgicas (SCHIPKE; HEUSER; PETERS, 2011).

5 CONCLUSÕES

De acordo com o exposto no presente estudo constata-se que:

- a) O tratamento intraperitoneal dos animais com os dois inibidores da GSK3, AR-A014418 ou NP031115, foram eficazes em reduzir a nocicepção aguda (induzida pelo ácido acético ou formalina);
- b) O AR-A014418, quando administrado periféricamente (i.pl.) e centralmente (espinal) também diminuiu a nocicepção ocasionada pela formalina;
- c) A inibição do sistema glutamatérgico e das citocinas pró-inflamatórias, espinal, parece contribuir para o efeito antinociceptivo do AR-A014418;
- d) O tratamento com AR-A014418 (i.p.) diminuiu a nocicepção ocasionada pelo estímulo mecânico e ao frio, em camundongos neuropáticos;
- e) Os sistemas serotoninérgico e catecolaminérgico, mas não a via L-arginina-óxido nítrico, contribuem para a antinocicepção induzida pelo AR-A014418;
- f) A administração do AR-A014418 não alterou a atividade locomotora dos animais.

Desta forma, o conjunto de resultados apresentados nesta tese fornecem as primeiras evidências na literatura de que a inibição da GSK3 pode ser uma estratégia terapêutica para o controle da dor aguda e crônica. Acredita-se que com a descoberta deste novo alvo para o tratamento da dor, futuros estudos clínicos possam ser realizados na busca de uma terapia mais efetiva para o controle da dor, principalmente para a dor crônica.

6. PERSPECTIVAS

Além dos experimentos demonstrados nesta tese temos evidências adicionais de que o AR-A014418 também exerce diminuição da nocicepção ao estímulo mecânico e térmico ao frio no modelo de isquemia e reperfusão da pata de camundongos (modelo de nocicepção crônica), estes resultados são muito semelhantes aos obtidos no modelo da PSNL. Experimentos adicionais estão sendo conduzidos para demonstrar o papel da inibição da GSK3 na diminuição do estresse oxidativo ocasionado pelo modelo de isquemia e reperfusão da pata. As informações contidas no presente parágrafo fazem parte de um terceiro artigo que estamos respondendo aos revisores e após a conclusão dos experimentos será ressubmetido a revista *The Journal of Pain*.

7. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. **The Journal of Pain**. v. 11, n.12, p. 1384-1393, 2010.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociceptive effects of (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal of Pain**. v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.

MARTINS, D. F. et al. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. **The Journal of Pain**. v. 12, n. 3, p. 315-322, 2011.

COELHO, V. R. et al. (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. **Phytomedicine**. v. 18, n. 10, p. 896-901, 2011.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. **Pain**. v. 152, n. 11, p. 2653-2661, 2011.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**. v. 194, n. 1, p. 337-348, 2011.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. **Pain Medicine**. v. 13, n. 8, p. 1049-1058, 2012.

MOTA, B. C. et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. **Neurotoxicity Research**. v. 21, n. 2, p. 175-184, 2012.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. **Neuroscience**. v. 226, n. 1, p. 411-420, 2012.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 1, p. 170-178, 2012.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization affects postoperative pain through peripheral and central adenosine A1 receptors. **Physical Therapy**. v. 93, n. 3, p. 401-412, 2013.

MARTINS, D. F. et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. **Neuroscience**. v. 234, n. 1, p. 69-76, 2013.

COELHO, V. et al. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**. Epub ahead of print. 2013.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- α levels after sciatic nerve crush in mice.

European Journal of Pain. v. 17, n. 8, p. 1193-1204, 2013.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. **Lasers in Medical Science**. Epub ahead of print. 2013

DAL BÓ, W. et al. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. v. 27, n. 5, p. 517-525, 2013.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V. et al. Improving the efficiency of the formalin test. **Pain**. v. 83, n. 3, p. 561-569, 1999.

AKIYAMA, T.; CARSTENS, M. I.; CARSTENS, E. Spontaneous itch in the absence of hyperalgesia in a mouse hindpaw dry skin model. **Neuroscience Letters**. v. 484, n. 1, p. 62-65, 2010.

ALBERATI-GIANI, D. et al. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 66, n. 3, p. 996-1004, 1996.

ALI, A.; HOEFLICH, K. P.; WOODGETT, J. R. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. **Chemical Reviews**. v. 101, n. 8, p. 2527-2540, 2001.

ALTAMURA, C. A. et al. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. **The American Journal of Psychiatry**. v. 150, n. 11, p. 1731-1733, 1993.

ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European Journal of Neurology**. v. 17, n. 9, p. 1113-1188, 2010.

ATTAL, N. et al. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**. v. 41, n. 2, p. 235-251, 1990.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociceptive effects of (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal of Pain**. v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 405, n. 3, p. 359-379, 1999.

- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**. v. 2, n. 4, p. 241-248, 1995.
- BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain: a clinical perspective. **Nature Clinical Practice. Neurology**. v. 2, n. 2, p. 95-106, 2006.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v.1, n. 211, p. 39-50, 2012.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of Neurology**. v. 4, n. 5, p. 451-462, 1978.
- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 28, n. 4, p. 166-172, 2007.
- BEAULIEU, J. M. et al. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. **Cell**. v. 122, n. 2, p. 261-273, 2005.
- BEAULIEU, J. M. et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 101, n. 14, p. 5099-5104, 2004.
- BEAULIEU, J. M. et al. Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 43, p. 32072-32080, 2006.
- BEAULIEU, J. M. Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 10, n. 1, p. 3-6, 2007.
- BEECHER, H. K. Pain in Men Wounded in Battle. **Annals of Surgery**. v. 123, n.1, p. 96-105, 1946.

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 Research**. v. 924, n. 2, p. 219-228, 2002.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**. v. 71, n. 3, p. 217-221, 2008.

BEUREL, E. et al. Regulation of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis by glycogen synthase kinase-3. **Journal of Immunology**. v. 190, n. 10, p. 5000-5011, 2013.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes. **Neuroscience**. v. 169, n. 3, p. 1063-1070, 2010.

BEUREL, E.; MICHALEK, S. M.; JOPE, R. S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). **Trends in Immunology**. v. 31, n. 1, p. 24-31, 2010.

BEUREL, E. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 1, n.1, p. 4-18, 2011.

BHAT, R. et al. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 46, p. 45937-45945, 2003.

BIJUR, G. N.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. **Neuroreport**. v. 14, n. 18, p. 2415-2419, 2003.

BILIM, V. et al. Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. **British Journal of Cancer**. v. 101, n. 12, p. 1005-1014, 2009.

BINGEL, U.; TRACEY, I. Imaging CNS modulation of pain in humans **Physiology (Bethesda)**. V. 23, n. 1, p. 371-380, 2008.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**. v. 194, n. 1, p. 337-348, 2011.

BOLÓS, M; FERNANDEZ, S.; TORRES-ALEMAN, I. Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 23, p. 17693-17700, 2010.

BONACCORSO, S. et al. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v. 22, n. 1, p. 86-90, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAUN, D.; LONGMAN, R. S.; ALBERT, M. L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. **Blood**. v. 106, n. 7, p. 2375-2381, 2005.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**. v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006.

BRENCHAT, A. et al. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. **Pain**. v. 141, n. 3, p. 239-247, 2009.

BUDAI, D.; HARASAWA, I.; FIELDS, H. L. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. **Journal of Neurophysiology**. v. 80, n. 5, p. 2244-2254, 1998.

BUDNI, J. et al. Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **Journal of Psychopharmacology**. v. 26, n. 5, p. 714-726, 2012.

CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **Lancet Neurology**. v. 11, n. 7, p. 629-642, 2012.

CAPONE, F.; ALOISI AM. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Annali Dell'Instituto Superiore di Sanità**. v. 40, n. 2, p. 223-229, 2004.

CAPURON, L. et al. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. **Biological Psychiatry**. v. 54, n. 9, p. 906-914, 2003.

CAROZZI, V.; MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. Focus on the role of Glutamate in the pathology of the peripheral nervous system. **CNS and Neurological Disorders Drug Targets**. v. 7, n. 4, p. 348-360, 2008.

CASTILLO, J. et al. Amino acid transmitters in patients with headache during the acute phase of cerebrovascular ischemic disease. **Stroke, a journal of cerebral circulation**. v. 26, n. 11, p. 2035-2039, 1995.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**. v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America**. v. 106, n. 22, p. 9075-9080, 2009.

CHEN, L. et al. Glycogen synthase kinase-3 β is a functional modulator of serotonin-1B receptors. **Molecular Pharmacology**. v. 79, n. 6, p. 974-986, 2011.

CHEN, L. et al. Reduction of mitochondrial H₂O₂ by overexpressing peroxiredoxin 3 improves glucose tolerance in mice. **Aging Cell**. v. 7, n. 6, p. 866-878, 2008.

CHEN, L.; SALINAS, G. D.; LI, X. Regulation of serotonin 1B receptor by glycogen synthase kinase-3. **Molecular Pharmacology**. v. 76, n. 6, p. 1150-1161, 2009.

CHEN, P. et al. Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. **Molecular Pharmacology**. v. 72, n. 1, p. 40-51, 2007.

CHOI, S. S. et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sciences**. v. 73, n. 4, p. 471-485, 2003.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. v. 59, n. 3, p. 369-376, 1994.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia and decreases spinal cord and sciatic nerve tumour necrosis factor- α levels after sciatic nerve crush in mice.

European Journal of Pain. v. 17, n. 8, p. 1193-1204, 2013.

CIDRAL-FILHO, F. J. et al. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. **Lasers in Medical Science**. Epub ahead of print. 2013.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 12, n. 9, p. 3665-3670, 1992.

COELHO, V. R. et al. (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. **Phytomedicine**. v. 18, n. 10, p. 896-901, 2011.

COELHO, V. et al. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**. Epub ahead of print. 2013.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. v. 2, n. 10, p. 169-776, 2001.

CÓRDOVA, M. M. et al. Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. **Carbohydrate Polymers**. v. 92, n. 2, p. 2058-2064, 2013.

COULL, J. A. et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. **Nature**. v. 424, n. 6951, p. 938-942, 2003.

CUI, M, et al. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, n. 2, p. 868-876, 1999.

CUNHA, M. P. et al. Evidence for the involvement of 5-HT(1A) receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Brain Research Bulletin**. Epub ahead of print. 2013.

CUZZOCREA, S. et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. **Clinical Immunology**. v. 120, n. 1, p. 57-67, 2006.

DAL BÓ, W. et al. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. Epub ahead of print, 2012.

DA MATTA, C. B. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**. v. 9, n. 3, p. 307-318, 2011.

DE MATTOS, E. S. et al. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, n. 1, p. 1-6, 2007.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DE SARNO, P. et al. In vivo regulation of GSK3 phosphorylation by cholinergic and NMDA receptors. **Neurobiology of Aging**. v. 27, n. 3, p. 413-422, 2006.

DE SARNO, P.; LI, X.; JOPE, R. S. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharmacology**. V. 43, n. 7, p. 1158-1164, 2002.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **Journal of Cell Science**. v. 116, n. 7, p. 1175-1186, 2003.

DUGO, L. et al. GSK-3beta inhibitors attenuate the organ injury/dysfunction caused by endotoxemia in the rat. **Critical Care Medicine**. v. 33, n. 9, p. 1903-1912, 2005.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Research**. v. 1280, n. 1, p. 52-59, 2009.

DOLY, S. et al. Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT7 receptor in rat dorsal spinal cord: immunocytochemical evidence. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 490, n. 3, p. 256-269, 2005.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v. 4, n. 2, p. 161-174. 1977.

EISENACH, J. C.; HOOD, D. D.; CURRY, R. Intrathecal, but not intravenous, clonidine reduces experimental thermal or capsaicin-induced pain and hyperalgesia in normal volunteers. **Anesthesia and Analgesia**. v. 87, n. 3, p. 591-196, 1998.

EMAMIAN, E. S. et al. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. **Nature Genetics**. v. 36, n. 2, p. 131-137, 2004.

EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. **European Journal of Biochemistry**. v. 107, n. 2, p. 519-527, 1980.

ERIKSEN, J. et al. Critical issues on opioids in chronic non-cancer pain: an epidemiological study. **Pain**. v. 125, n. 1, p. 172-179, 2006.

FANG, X. et al. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. **The Journal of Physiology**. v. 565, n. 3, p. 927-943, 2005.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M, eds. **Textbook of Pain**. 5. ed. Elsevier Health Sciences: Burlington, Massachusetts, USA. p.125-142, 2005.

FIONDA, C. et al. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 Increases NKG2D Ligand MICA Expression and Sensitivity to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Multiple Myeloma Cells: Role of STAT3. *Journal of Immunology*. Epub ahead of print, 2013.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**. V. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

FRELAND, L.; BEAULIEU, J. M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 5, n. 14, p. (epub ahead of print), 2012.

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

GAINETDINOV, R. R. et al. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. **Annual Review of Neuroscience**. v. 27, n. 1, p. 107-144, 2004.

GAINETDINOV, R. R.; SOTNIKOVA, T. D.; CARON, M. G. Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 23, n. 8, p. 367-373, 2002.

GAO, C. et al. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. **Reviews in Neurosciences**. v. 23, n. 1, p. 1-11, 2011.

GASSNER, M.; RUSCHEWEYH, R.; SANDKÜHLER J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. **Pain**. v. 145, n. 1, p. 204-210, 2009.

GIAMBERARDINO, M. A. et al. Artificial ureteral calculosis in rats: behavioural characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. **Pain**. v. 61, n.3, p. 459-469, 1995.

GOULD, T. D. et al. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 7, n. 4, p. 387-390, 2004.

GOUT, I. et al. The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. **Cell**. v. 75, n. 1, p. 25-36, 1993.

GRAY, A. M.; SPENCER, P. S.; SEWELL, R. D. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. **British Journal of Pharmacology**. v. 124, n. 4, p. 669-674, 1998.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**. v. 294, n. 5544, p. 1024-1030.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. **Progress in Neurobiology**. v. 65, n. 4, p. 391-426, 2001.

HAINS, B. C. et al. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 20, p. 4832-4839, 2004.

HAMMOND, D. L.; TYCE, G. M.; YAKSH, T. L. Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. **The Journal of Physiology**. v. 359, n. 1, p. 151-162, 1985.

HAMMOND, D. L.; YAKSH, T.L. Antagonism of stimulation-produced antinociception by intrathecal administration of methysergide or phentolamine. **Brain Research**. v. 298, n. 2, p. 329-337, 1984.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**. v. 40, n. 2, p. 140-155, 2002.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Research Reviews**. v. 61, n. 2, p. 105-123, 2009.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, n. 7, p. 1558-1568, 2011.

HOEFLICH, K. P. et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. **Nature**. v. 406, n. 6791, p. 86-90, 2000.

HOFMANN, C. et al. Glycogen synthase kinase 3- β : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. **Inflammatory Bowel Disease**. v. 16, n. 11, p. 1850-1858, 2010.

HOGAN, Q. Animal pain models. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**. v. 27, n. 4, p. 385-401, 2002.

HU, X. et al. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. **Immunity**. v. 24, n. 5, p. 563-574, 2006.

HUDSON, L. J. et al. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. **The European Journal of Neuroscience**. v. 13, n. 11, p. 2105-2114, 2001.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, n. 1, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HURLEY, R. W.; HAMMOND, D. L. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. **The Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 3, p. 1249-1259, 2000.

IRWIN, M. Immune correlates of depression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 461, n. 1, p. 1-24, 1999.

JENDŽELOVSKÝ, R. et al. Inhibition of GSK-3 β reverses the pro-apoptotic effect of proadifen (SKF-525A) in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **Toxicology In Vitro**. v. 26, n. 6, p. 775-782, 2012.

JENSEN, M. P.; CHODROFF, M. J.; DWORKIN, R. H. The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. **Neurology**. v. 68, n. 15, p. 1178-1182, 2007.

JENSEN, T. S. et al. A new definition of neuropathic pain. **Pain**. v. 152, n. 10, p. 2204-2205, 2011.

JENSEN, T. S.; YAKSH, T. L. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. **Brain Research**. v. 321, n. 2, p. 287-297, 1984.

Jl, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology Disease**. v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 29, n. 2, p. 95-102, 2004.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochemical Research**. v. 32, n. 4, p. 577-595, 2007.

KALINICHEV, M.; DAWSON, L. A. Evidence for antimanic efficacy of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitors in a strain-specific model of acute mania. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 14, n. 8, p. 1051-1067, 2011.

KANG, U. G. et al. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. **FEBS Letters**. v. 560, n. 1, p. 115-119, 2004.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princípios da Neurociência**. Manole: São Paulo, 2003. 1412 p.

KAREGE, F. et al. Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Biological Psychiatry**. v. 61, n. 2, p. 240-245, 2007.

KASTER, M. P. et al. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. **European Journal of Pharmacology**. v. 565, n. 1-3, p. 119-124, 2007.

KASTER, M. P. et al. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A 2A receptors. **Purinergic Signalling**. Epub ahead of print. 2013.

KELTNER, J. R. et al. Isolating the modulatory effect of expectation on pain transmission: a functional magnetic resonance imaging study. **The Journal of Neuroscience**. v. 26, n. 16, p. 4437-4443, 2006.

KENNY, P. J.; MARKOU A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 25, n. 5, p. 265-272, 2004.

KHASABOVA, I. A. et al. Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. **Pharmacology Research**. v. 64, n. 1, p. 60-67, 2011.

KIM, C.H. et al. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. **Journal of Neuroscience Research**. v. 86, n. 1, p. 1-10, 2008.

KIM, J. S. et al. Increased serum glutamate in depressed patients. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**. v. 232, n. 4, p. 299-304, 1982.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KIM, H. M. et al. CG0009, a novel glycogen synthase kinase 3 inhibitor, induces cell death through cyclin D1 depletion in breast cancer cells. **PLOS One**. v. 4, n. 4, p. e60383, 2013.

KONDA, V. R. et al. META060 inhibits osteoclastogenesis and matrix metalloproteinases in vitro and reduces bone and cartilage degradation in a mouse model of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**. v. 62, n. 6, p. 1683-1692, 2010.

KING, T. D.; BIJUR, G. N.; JOPE, R. S. Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. **Brain Research**. v. 919, n. 1, p. 106-114, 2001.

KOH, S. H. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 suppresses the onset of symptoms and disease progression of G93A-SOD1 mouse model of ALS. **Experimental Neurology**. v. 205, n. 2, p. 336-346, 2007.

KREBS, H. A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **The Biochemical Journal**. v. 29, n. 8, p. 1951-1969, 1935.

KWIAT, G. C.; BASBAUM, A. I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosensory and Motor Research**. v. 9, n. 2, p. 157-173, 1992.

KWIDZINSKI, E. et al. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **FASEB Journal**. v. 19, n. 10, p. 1347-1349, 2005.

LAI, J.; HUNTER, J. C.; PORRECA, F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 13, n. 3, p. 291-297, 2003.

LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science**. v. 308, n. 5721, p. 512-517, 2005.

LEONARD, B. E.; MYINT, A. Inflammation and depression: is there a causal connection with dementia? **Neurotoxicity Research**. v. 10, n. 2, p. 149-160, 2006.

LI, X. et al. Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 10, n. 1, p. 7-19, 2007.

LI, X.; JOPE, R. S. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? **Neuropsychopharmacology**. v. 35, n. 11, p. 2143-2154, 2010.

LIU, F. Y. et al. Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. **Brain Research**. v. 1330, n. 1, p. 45-60, 2010.

LIU, Y. et al. Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. **Diabetologia**. v. 53, n. 12, p. 2600-2610, 2010.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LUIZ, A. P. et al. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, n. 3, p. 355-363, 2007.

LUO, Z. D. et al. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 6, p. 1868-1875, 2001.

LUTTRELL, L. M. et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, n. 5, p. 2449-2454, 2001.

LY, P. T. et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 123, n. 1, p. 224-235, 2013.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**. v. 587, n. 1-3, p. 163-168, 2008.

MAES, M. et al. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. **Journal of Affective Disorders**. v. 34, n. 4, p. 301-309, 1995 a.

MAES, M. et al. Plasma-soluble interleukin-2 and transferrin receptor in schizophrenia and major depression. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**. v. 244, n. 6, p. 325-329, 1995 b.

MAJ, J. et al. Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **European Neuropsychopharmacology**. v. 2, n. 1, p. 37-41, 1992.

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, p. 215-222, 1998.

MALMBERG, A. B. et al. The effect of alpha-trinositol (D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate) on formalin-evoked spinal amino acid and prostaglandin E2 levels. **Brain Research**. v. 747, n. 1, p. 160-164, 1997.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 6, n. 7, p. 521-532, 2005.

MARTIN, P.; CARLSSON, M. L.; HJORTH, S. Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. **Neuroreport**. v. 9, n. 13, p. 2985-2988, 1998.

MARTIN, M. et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nature Immunology**. v. 6, n. 8, p. 777-784, 2005.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. **Pain Medicine**. v. 13, n. 8, p. 1049-1058, 2012.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. **Pain**. v. 152, n. 11, p. 2653-2661, 2011.

MARTINS, D. F. et al. Ankle joint mobilization affects postoperative pain through peripheral and central adenosine A1 receptors. **Physical Therapy**. v. 93, n. 3, p. 401-412, 2013.

MARTINS, D. F. et al. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. **Neuroscience**. v. 234, n. 1, p. 69-76, 2013.

MARTINS, D. F. et al. The antinociceptive effects of AR-A014418, a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, in mice. **The Journal of Pain**. v. 12, n. 3, p. 315-322, 2011.

MASSOT, O. et al. 5-HT1B receptors: a novel target for lithium. Possible involvement in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**. v. 21, n. 4, p. 530-541, 1999.

MATYSZAK, M. K. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. **Progress in Neurobiology**. v. 56, n. 1, p. 19-35, 1998.

MAURI, M. C. et al. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**. v. 37, n. 3, p. 124-129, 1998.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. **Neuroscience**. v. 226, n. 1, p. 411-420, 2012.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. **The Journal of Pain**. v. 11, n. 12, p. 1384-1393, 2010.

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. 52-58, 2002.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.

MEDINA, M.; AVILA, J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**. v. 16, n. 25, p. 2790-2798, 2010.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**. v. 10, n. 1, p. 469-473, 1999.

MIKOVA, O. et al. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. **European Neuropsychopharmacology**. v. 11, n. 3, p. 203-208, 2001.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v. 66, n. 6. p. 355-474, 2002.

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

MILLER, K. E. et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 130, n. 3, p. 283-309, 2011.

MILLER, K. E.; RICHARDS, B. A.; KRIEBEL, R. M. Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. **Brain Research**. v. 945, n. 2, p. 202-211, 2002.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 10, n. 1, p. 23-26, 2009.

MILLS, C. D. et al. AIDA reduces glutamate release and attenuates mechanical allodynia after spinal cord injury. **Neuroreport**. v. 11, n. 14, p. 3067-3070, 2000.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**. v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MIÜLLER, N.; SCHWARZ, M. J. The immunological basis of glutamatergic disturbance in schizophrenia: towards an integrated view. **Journal of Neural Transmission Supplementum**. v. 72, n. 1, p. 269-280, 2007.

MOORE, K. A. et al. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 15, p. 6724-6731, 2002.

MORFINI, G. et al. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. **The EMBO Journal**. v. 21, n. 3, p. 281-293, 2002.

MORIOKA, N. et al. Noradrenaline induces clock gene Per1 mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A - cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK-3beta). **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 113, n. 3, p. 234-245, 2010.

MOTA, B. C. et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. **Neurotoxicity Research**. v. 21, n. 2, p. 175-184, 2012.

MOULIN, D. E. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. **Pain Research and Management**. v. 12, n. 1, p. 13-21, 2007.

MÜLLER, N. et al. Investigations of the cellular immunity during depression and the free interval: evidence for an immune activation in affective psychosis. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 17, n. 5, p. 713-730, 1993.

MÜLLER, N.; MYINT, A. M.; SCHWARZ, M. J. Inflammatory biomarkers and depression. **Neurotoxicity Research**. v. 19, n. 2, p. 308-318, 2011.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, M. J. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. **Molecular Psychiatry**. v. 12, n. 11, p. 988-1000, 2007.

MUNN, D. H. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 189, n. 9, p. 1363-1372, 1999.

NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 319, n. 2, p. 507-514, 2006.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors: important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**. v. 98, n. 1, p. 1-8, 2002.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 100, n. 4, p. 656-664, 2012.

NOWAK, L. et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**. v. 307, n. 5950, p. 462-465, 1984.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 1, p. 170-178, 2012.

NUNES, S. O. et al. Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, n. 5, p. 581-587, 2002.

O'BRIEN, W. T. et al. Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. **The Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 30, p. 6791-6798, 2004.

O'CONNOR, T. M. et al. The role of substance P in inflammatory disease. **Journal of Cellular Physiology**. v. 201, n. 2, p. 167-180, 2004.

OKUDA, K. et al. Arthritis induced in cat by sodium urate: a possible animal model for tonic pain. **Pain**. v. 18, n. 3, p. 287-297, 1984.

OLIANAS, M. C.; DEDONI, S.; ONALI, P. Regulation of PI3K/Akt signaling by N-desmethylclozapine through activation of δ -opioid receptor. **European Journal of Pharmacology**. v. 660, n. 2, p. 341-150, 2011.

OLIVERAS, J. L. et al. Analgesic electrical stimulation of the feline nucleus raphe magnus: development of tolerance and its reversal by 5-HTP. **Brain Research**. v. 146, n. 2, p. 404-409, 1978.

OLSSON, S. K. et al. Elevated levels of kynurenic acid change the dopaminergic response to amphetamine: implications for schizophrenia. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 12, n. 4, p. 501-512, 2009.

OSIKOWICZ, M.; MIKA, J.; PRZEWLOCKA, B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. **Experimental Physiology**. v. 92, n. 2, p. 372-284, 2013.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**. v. v. 120, n. 11, p. 3779-2787, 2010.

OSSIPOV, M.H. et al. Antinociceptive interaction between opioids and medetomidine: systemic additivity and spinal synergy. **Anesthesiology**. v. 73, n. 6, p. 1227-1235, 1990.

OSSIPOV M. H. et al. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 909, n. 1, p. 12-24, 2000.

OSSOWSKA, G.; KLENK-MAJEWSKA, B.; SZYMCZYK, G. The effect of NMDA antagonists on footshock-induced fighting behavior in chronically stressed rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 48, n. 1, p. 127-135, 1997.

PARR, C. et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein. **Molecular and Cellular Biology**. v. 32, n. 21, p. 4410-4418, 2012.

PATAPOUTIAN, A. et al. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 4, n. 7, p. 529-539, 2003.

PAULUS, W.; TRENKWALDER, C. Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. **Lancet Neurology**. v. 5, n. 10, p. 878-886, 2006.

PAVAO-DE-SOUZA, G. F. et al. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI(3)K and microglia in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 101, n. 3, p. 320-328, 2012.

PERQUIN, C. W. et al. Pain in children and adolescents: a common experience. **Pain**. v. 87, n. 1, p. 51-58, 2000.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**. v. 80, n. 2, p. 53-83, 2006.

PHILLIPS, C. J.; HARPER, C. The economics associated with persistent pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 5, n. 2, p. 127-130, 2011.

PIANI, D. et al. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. **Journal of Neuroimmunology**. v. 48, n. 1, p. 99-104, 1993.

PIERCE, P. A. et al. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. **Neuroscience**. v. 70, n. 2, p. 553-559, 1996.

PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nature reviews. Neuroscience**. v. 9, n. 6, p. 423-436, 2008.

POLTER, A. M.; LI, X. Glycogen Synthase Kinase-3 is an Intermediate Modulator of Serotonin Neurotransmission. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 4, n. 31, p. (epub ahead of print), 2011.

PRICE, M. P. et al. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. **Neuron**. v. 32, n. 6, p. 1071-1083, 2001.

PROUDFIT, H. The behavioural pharmacology of the noradrenergic system. In: Guilbaud G, ed. **Towards. The use of noradrenergic agonists for the treatment of pain**. Elsevier: Amsterdam, Nederland. p.119–136, 1992.

RAHMAN, W. et al. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Molecular Pain**. v. 5, n. 1, p. 45-62, 2009.

RANG, H. P., et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. China: Elsevier. 7.ed. 2012.

RIAD, M. et al. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 417, n. 2, p. 181-194, 2000.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

ROBERTS, M.S. et al. Protein kinase B/Akt acts via glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. **Molecular and Cellular Biology**. v. 24, n. 4, p. 1505-1515, 2004.

ROBERTSON, B. et al. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. **Neuroreport**. v. 8, n. 5, p. 1311-1316, 1997.

ROBINSON, C. M.; HALE, P. T.; CARLIN, J. M. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 25, n. 1, p. 20-30, 2005.

ROCHE, K. W. et al. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. **Nature Neuroscience**. v. 4, n. 8, p. 794-802, 2001.

ROSA, A. O, et al. Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 32, n. 6, p. 1549-1556, 2008.

ROVEDO, M. A.; KRETT, N. L.; ROSEN, S. T. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 increases the cytotoxicity of enzastaurin. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 131, n. 7, p. 1442-1449, 2011.

ROWSE, A. L. et al. Lithium controls central nervous system autoimmunity through modulation of IFN- γ signaling. **Plos One**. v.7, n.12, p.e52658, 2012.

SAARTO, T.; WIFFEN, P. J. Antidepressants for neuropathic pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. V. 17, n. 4, p. CD005454, 2007.

SALAZAR, M. et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 21, p. 14841-14851, 2006.

SARI, Y. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 28, n. 6, p. 565-582, 2004.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **Journal of Neurophysiology**. v. 54, n. 5, p. 1109-1122, 1985.

SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 29, n. 2, p. 201-217, 2005.

SCHIPKE; HEUSER; PETERS. Antidepressants act on glial cells: SSRIs and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. **Journal of Psychiatric Research**. v. 45, n. 2, p. 242-248, 2011.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. v. 5, n. 1, p. 1062-1067, 2002.

SCHWARTZ, M. et al. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends in Neurosciences**. v. 29, n. 2, p. 68-74, 2006.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**. v. 298, n. 5594, p. 789-791, 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. 205-218, 1990.

SHAKOORI, A. et al. Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. **Cancer Science**. v. 98, n. 9, p. 1388-1393, 2007.

SHENOY, S. K. et al. Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 2, p. 1261-1273, 2006.

SHIMASAKI, T. et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. **Journal of Gastroenterology**. v. 47, n. 3, p. 321-333, 2012.

SINGH, L. et al. The antiepileptic agent gabapentin (Neurontin) possesses anxiolytic-like and antinociceptive actions that are reversed by D-serine. **Psychopharmacology**. v. 127, n. 1, p. 1-9, 1996.

SIRASKAR, B. et al. Enhanced catecholamine release in mice expressing PKB/SGK-resistant GSK3. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**. v. 462, n. 6, p. 811-819, 2011.

SKERRY, T. M.; GENEVER, P. G. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 22, n. 4, p. 174-181, 2001.

SOMMER, C. Painful neuropathies. **Current Opinion in Neurology**. v. 16, n. 5, p. 623-628, 2003.

STEINBRECHER, K. A. et al. Glycogen synthase kinase 3 β functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, n. 19, p. 8444-8455, 2005.

SUZUKI, R.; RYGH, L. J.; DICKENSON, A. H. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 25, n. 12, p. 613-617, 2004.

TABER, R. I. et al. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 169, n. 1, p. 29-38, 1969.

TADANO, T. et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sciences**. v. 65, n. 3, p. 255-261, 1999.

TAL, M.; BENNETT, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**. v. 57, n. 3, p. 375-382, 1994.

THOMAZZI, S. M. et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediators of Inflammation**. v. 6, n. 3, p. 195-200, 1997.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 11, n. 12, p. 823-836, 2010.

TOKITA, K.; YAMAJI, T.; HASHIMOTO, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 100, n. 4, p. 688-704, 2012.

TRACEY, I.; JOHNS, E. The pain matrix: reloaded or reborn as we image tonic pain using arterial spin labelling. **Pain**. v. 148, n. 3, p. 359-360, 2010.

TRILLAT, A. C. et al. Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT1B receptors: in vivo microdialysis studies. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, n. 5, p. 2019-2025, 1997.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology**. v. 185, n. 1, p. 1-10, 1990.

TSAI, G.; COYLE, J. T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 42, n. 1, p. 165-179, 2002.

VALVEZAN, A. J.; KLEIN, P. S. GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 5, n. 1, p. (epub ahead of print), 2012.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research. Brain Research Reviews**. v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004.

VAN LEEUWEN, M. T. et al. Chronic pain and reduced work effectiveness: the hidden cost to Australian employers. **European Journal of Pain**. v. 10, n. 2, p. 161-166, 2006.

VAZ, Z. R. et al. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 278, n. 1, p. 304-312, 1996.

WALKER, K.; FOX, A. J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Molecular Medicine Today**. v. 5, n. 7, p. 319-321, 1999.

WASNER, G. et al. Postherpetic neuralgia: topical lidocaine is effective in nociceptor-deprived skin. **Journal of Neurology**. v. 252, n. 6, p. 677-686, 2005.

WASNER, G. et al. Topical menthol: a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**. v. 127, n. 5, p. 1159-1171, 2004.

WEI, F.; GU, M.; CHU, Y. X. New tricks for an old slug: descending serotonergic system in pain. **Sheng Li Xue Bao**. v. 64, n. 5, p. 520-530, 2012.

WEI; VIISANEN; PERTOVAARA. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. **Pharmacological Research**. v. 59, n. 5, p. 355-363, 2009.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. **Neuro-Signals**. V. 14, n. 4, p. 166-174, 2005.

WEISS, G. et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 116, n. 3, p. 435-440, 1999.

WILLIS, W. D. Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. **Brain Research Reviews**. v. 55, n. 2, p. 297-313, 2007.

WEN, Y. R. et al. Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. **Journal of the Formosan Medical Association**. v. 110, n. 8, p. 487-494, 2011.

WENTHOLD, R. J. et al. Trafficking of NMDA receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 43, n. 1, p. 335-358, 2003.

WHITTLE, B. J. et al. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, n. 5, p. 575-582, 2006.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 6, n. 9, p. 703-710, 2007.

WOODGETT, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **The EMBO Journal**. v. 9, n. 8, p. 2431-2438, 1990.

WOODGETT, J. R.; COHEN, P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). **Biochimica and Biophysica Acta**. v. 788, n. 3, p. 339-347, 1984.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. **Neuron**. v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bulletin of World Health Organization**. v. 81, n. 9, p. 646-656, 2003.

WU, G. et al. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 8, p. RC140, 2001.

XU, Q.; YAKSH, T. L. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. **Current Opinion Anaesthesiology**. v. 24, n. 4, p. 400-407, 2011.

YAKSH, T. L.; WILSON, P. R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 208, n. 3, p. 446-453, 1979.

YAN, Q. S. et al. Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. **Brain Research**. v. 765, n. 1, p. 149-158, 1997.

YEOMANS, D. C.; PROUDFIT, H. K. Projections of substance P-immunoreactive neurons located in the ventromedial medulla to the A7 noradrenergic nucleus of the rat demonstrated using retrograde tracing combined with immunocytochemistry. **Brais Research**. v. 532, n. 1, p. 329-332, 1990.

YILMAZ, A. et al. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 71, n. 1, p. 3410344, 2002.

YUAN, Y. et al. Glycogen synthase kinase-3 β contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia via regulating N-methyl-D-aspartate receptor trafficking. **Anesthesia and Analgesia**. v. 116, n. 2, p. 473-481, 2013.

YUEN, E. Y. et al. Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. **The Journal of Neuroscience**. v. 25, n. 23, p. 5488-5501, 2005.

ZERIAL, M.; MCBRIDE, H. Rab proteins as membrane organizers. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. v. 2, n. 2, p. 107-117, 2001.

ZHAO, Z. et al. Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction. **Schizophrenia Research**. v. 84, n. 1, p. 1-14, 2006.

ZHOU, F. Q.; SNIDER, W. D. Cell biology. GSK-3 β and microtubule assembly in axons. **Science**. v. 308, n. 5719, p. 211-214, 2005.

ZHOU, W. et al. The effects of glycogen synthase kinase-3 β in serotonin neurons. **PLOS One**. v. 7, n. 8, p. e-4362, 2012.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v.16, n.2, p. 109-110, 1983.