



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

RENATA FREITAS DE ARAUJO OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA LEVEDURA
*KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

Feira de Santana, BA

2015



RENATA FREITAS DE ARAUJO OLIVEIRA



**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA LEVEDURA
*KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Flávia Oliveira de Lima.

Co- Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis

Feira de Santana, BA

2015

RENATA FREITAS DE ARAUJO OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA LEVEDURA *KLUYVEROMYCES
MARXIANUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Banca Examinadora em 26 de maio de 2015.

Prof^a. Dr^a. Flávia Oliveira de Lima
Orientadora/UEFS

Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Gomes Guerrero
Membro Convidado/ FIOCRUZ-MS

Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Júnior
Membro Convidado/UEFS

Feira de Santana, BA

2015

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me permitir concluir esta etapa na minha vida, pelo amor, carinho e cuidado que me tem dedicado.

Aos meus pais, **João Araujo de Oliveira** e **Evanilda Freitas de Oliveira** pelo amor, incentivo e por ser minha fonte de inspiração.

Ao meu marido **Rodrigo Tripodi Calumby** pela alegria, carinho, cumplicidade, cuidado e estímulo em alcançar novos horizontes.

Às minhas orientadoras **Flávia O. Lima** e **Sandra A. de Assis**, pela orientação e incentivo.

Aos meus avôs (*in memóriam*): **José Fernandes do Carmo** e **Zilda Freitas do Carmo**; **Pedro Araujo da Silva** e **Zulmira Costa de Oliveira** pelo ensino e carinho.

Às minhas irmãs, **Vanessa Freitas de Araujo Leite** e **Adriana Freitas de A. Oliveira** e ao meu cunhado **Inácio Leite** e **Diogo Lee** pelo carinho, ajuda e incentivo. E em especial ao meu pequeno **Daniel** pela alegria que me trás.

A todos os meus familiares e a família Tripodi pela torcida, em especial a **tio Agripino Costa Oliveira**, **tia Esmeralda Sanches de Oliveira**, **Tia Cau Tripodi**, **Rosa Maria Tripodi**, **Luisa Tripodi**, **Ana Tripodi**, **Vicente Tripodi** e **Vó Voninha**.

Aos meus amigos que me incentivaram em todos os momentos, em especial a **Mirelle Almeida Gonçalves**, **Márcia Almeida Nogueira**, **Bruna Maria Castro Salomão Quaresma**, **Thiago Amador Coelho**, **Rebecca Lustosa Silva de Almeida Luz**, **George Henrique**, **Naiana Manuela**, **Tâmara Suzart** e **Ana Paula Almeida**.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, amizade e companheirismos, em especial a **Afrânio**, **Bruno**, **Renata**, **Graziela**, **Gildomar**, **Junior**, **Bete**, **Flávia**, **Patrícia**, **Cleisiane** e **Fernando**.

Aos funcionários do Biotério-UEFS, onde conquistei amigos que sempre contribuiram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora **Cristiane Flora Villarreal** pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório.

A **Thiago Mattar Cunha**, **Ieda Regina dos Santos** e **Rangel Leal Silva** pelo tratamento e hospitalidade.

Aos professores de graduação e colegas que contribuíram com a minha formação, em especial ao Professor **Manoelito Coelho dos Santos Junior** e a **Thereza Christina Bahia Coelho**.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo conhecimento, crescimento e aprendizado e a CAPES pelo apoio financeiro. ´

À **Helton** por ser sempre prestativo e atencioso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram comigo, estando presente em todos os dias de minha vida, pela cumplicidade e companheirismo de dividir comigo momentos tristes e alegres. Enfim, minha gratidão a todos que torceram, acreditaram e contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;
glória, pois, a Ele eternamente.

Romanos 11:36

RESUMO

As leveduras produzem diferentes tipos de metabólitos e macromoléculas com enorme potencial biotecnológico. Dentre essas, destaca-se a *Kluyveromyces marxianus*, espécie que desperta interesse industrial e econômico por apresentar qualidades, como a tolerância térmica, altas taxas de crescimento, amplo espectro de substrato e modulação da resposta imune. O presente estudo investigou os efeitos do tratamento com o polissacarídeo extraído da levedura *Kluyveromyces marxianus* (poly322) em modelos experimentais de dor e inflamação. As propriedades farmacológicas do poly322 foram avaliadas nos testes de contorções abdominais, formalina, nocicepção manifesta por CFA, retirada da cauda, placa quente e edema de pata. Os níveis de citocinas foram determinados por ELISA e os efeitos sobre o desempenho motor foram avaliados pelos testes do cilindro giratório e campo aberto. O pré-tratamento com o poly322 resultou na redução da hipernocicepção induzida pelo ácido acético, CFA e formalina (segunda fase). Além disso, os animais tratados com o poly322 exibiram uma redução significativa no edema de pata e no aumento local dos níveis de IL-6 induzidos pela carregenina. Em contraste, o tratamento com o poly322 não alterou o limiar de resposta a estímulo térmico nos testes de retirada da cauda e placa quente, indicando ausência de ação central. Confirmando a especificidade da ação sugerida pelos testes nociceptivos, o tratamento com o poly322 não induziu comprometimento motor. Os resultados demonstram que o poly322 possui um potente efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, possivelmente mediado pela inibição da produção e/ou liberação da citocina IL-6.

Palavras-chaves: *Kluyveromyces marxianus*. Antinocicepção. Anti-inflamatório. Polissacarídeos.

ABSTRACT

The yeasts produce different types of metabolites and macromolecules with huge biotechnological potential. Among them, the *Kluyveromyces marxianus*, species attracts industrial and economic interests for presenting certain qualities, such as thermal tolerance, high growth rates, broad substrate spectrum and modulation of immune response. This work investigated the effects of treatment with the polysaccharide extracted from the *Kluyveromyces marxianus* yeast (poly322) in pain and inflammation experimental models. The poly322 pharmacological properties were evaluated with writhing, formalin, nociception (manifested by CFA), tail flick, hot-plate and paw edema tests. The cytokine levels were determined by ELISA and the effects on motor performance were evaluated by rotarod and open field tests. The pretreatment with poly322 resulted in reduced nociception induced by acetic acid, CFA and formalin (late phase). Furthermore, animals treated with poly322 exhibited a significant reduction in mechanical hypernociception, paw edema, and local IL-6 levels increase induced by carrageenan. In contrast, treatment with poly322 did not alter the thermal stimulus response threshold in the tail flick and hot plate tests, indicating no central action. Confirming the specificity of the action suggested by nociceptive tests, the treatment with poly322 did not induce motor impairment. These results demonstrate that the poly322 has a potent antinociceptive and anti-inflammatory effects, possibly mediated by the inhibition of the production and/or release of the IL-6 cytokine.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*. Antinociceptive. Anti-inflammatory.

Polysaccharide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do mecanismo de transmissão da dor.	21
Figura 2	Representação esquemática dos principais componentes da parede celular dos fungos.	27
Figura 3	Avaliação do comportamento nociceptivo no teste de contorções abdominais, através da administração intraperitoneal do ácido acético.	34
Figura 4	Avaliação do comportamento nociceptivo através da administração de formalina no dorso da pata traseira por via intraplantar.	35
Figura 5	Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de imersão da cauda.	37
Figura 6	Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de placa quente.	38
Figura 7	Avaliação do comprometimento motor realizado através do teste do cilindro giratório.	39
Figura 8	Avaliação do comprometimento motor realizado através do teste do campo aberto.	40
Figura 9	Pletismômetro (Ugo Basile, Comerio, Itália).	41
Figura 10	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolado da <i>K. marxianus</i> (poly322) no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos.	44
Figura 11	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da <i>K. marxianus</i> (poly322) sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.	46
Figura 12	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da <i>K. marxianus</i> (poly322) sobre a nocicepção induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos.	48
Figura 13	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da <i>K. marxianus</i> (poly322) no teste de imersão de cauda em camundongos.	50
Figura 14	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da <i>K. marxianus</i> (poly322) no teste da placa quente em camundongos.	52

Figura 15	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da <i>K. marxianus</i> (poly322) no teste do cilindro giratório em camundongos.	54
Figura 16	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do <i>K. marxianus</i> (poly322) no teste do campo aberto em camundongos.	56
Figura 17	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do <i>K. marxianus</i> (poly322) na avaliação da atividade antiedematogênica induzido por carragenina, em camundongos	58
Figura 18	Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do <i>K. marxianus</i> (poly322) na determinação dos níveis de citocinas IL-6 e IL-1 β induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 μ g/100 μ l) em camundongos.	60

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

BSA- Albumina Sérica Bovina

δ - Média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas

Δ - Delta

AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA- Análise de Variância

CCM- Coleção de Cultura de Micro-organismo

CCMB- Coleção de Cultura de Micro-organismo da Bahia

CD4- Grupamento de diferenciação 4 (cluster of differentiation)

CD8- Grupamento de diferenciação 8 (cluster of differentiation)

CFA- Adjuvante Completo de Freund

Cg- Carragenina

cm- Centímetros

COX- cicloxigenase

D- Enantiômero dextrógiro

Dexa- Dexametasona

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Teste imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)

EPM- Erro padrão da média

EUA- Estados Unidos da América

FT-IV- Espectroscopia de infravermelho

g- Grama

h- Hora

i.p.- Intraperitoneal

IA- Índice de anti-nocicepção

IASP- Associação internacional para o estudo da dor (International Association for Study of Pain)

IFN- Interferons

IL- Interleucina

IL-1Ra- Antagonista do receptor de interleucina 1

Indo- Indometacina

L- Enantiômero levógiro
k- Valor obtido de acordo com cada padrão de respostas positivas e negativas
K- Kluyveromyces
Kg- Quilograma
LAEN- Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações
LPS- Lipopolissacarídeo
YM- Leveduras do malte (meio de cultura)
M- Molar
mg- Miligrama
mim- Minutos
mL- Mililitro
MIP- Proteína inflamatória de macrófagos
 μ L- Microlitros
 μ g- Microgramas
N- Número
NaOH- Hidróxido de sódio
NO- Óxido nítrico
Nm- Nanômetros
PAF- Fator de ativação plaquetária
PBS- Tampão fosfato-salino
pg/ml- Picograma por mililitro
PG- Prostaglandina
pH- Potencial de hidrogênio
Poly322- Polissacarídeo extraído da levedura *Kluyveromycesmarxianus*
Ppm- Parte por milhão
OVA- Ovalbumina
RMN- Espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear
Rpm- Rotação por minuto
s- Segundos
s.c.- Via subcutânea
SBDE- Sociedade Brasileira para Estudo da Dor
SNC- Sistema nervoso central
SOD- Enzima superóxido dismutase
Th- Célula T auxiliar (*helper*)

Th17- Células T auxiliares que produzem interleucina 17

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

Tris-HCL- Tris amino metano hidrocloreto

TRPV-1- Receptor vanilóide (transient receptor potential vaniloid)

v/v- Volume por volume

UEFS- Universidade Estadual de Feira de Santana

Xf- Valor logaritmo da força proporcionada pelo último filamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	A dor	19
2.2	Inflamação e da dor inflamatória	22
2.3	Produtos naturais como fonte de medicamentos	25
2.4	A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> extraída do semi-arido baiano	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Obtenção de polissacarídeo a partir de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	32
3.2	Animais experimentais	33
3.3	Droga e diluentes	33
3.4	Ensaio farmacológicos	34
3.4.1	Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	34
3.4.2	Teste de formalina	35
3.4.3	Modelo de dor inflamatória induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)	36
3.4.4	Teste de imersão da cauda	36
3.4.5	Teste da placa quente	37
3.4.6	Teste do cilindro giratório	38
3.4.7	Teste do campo aberto	39
3.4.8	Teste de edema de pata induzido por carragenina	40
3.4.9	Determinação dos níveis de IL-6 e IL-1 β	41
3.5	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Ensaio Farmacológicos	43
4.1.1	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	43
4.1.2	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de formalina	45
4.1.3	Efeito do pré-tratamento com poly322 na avaliação do comportamento	47

	nociceptivo através da administração intraplantar de CFA	
4.1.4	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de imersão da cauda	49
4.1.5	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste da placa quente	51
4.1.6	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste do cilindro giratório	53
4.1.7	Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste do campo aberto	55
4.1.8	Efeito do pré-tratamento com poly322 na mensuração do edema de pata induzido por carragenina	57
4.1.9	Efeito do pré-tratamento com poly322 na redução dos níveis de citocinas	59
5	DISCUSSÕES	61
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	81
	ANEXO A- PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	81
	ANEXO B- FT-IR ESPECTRO DO POLISSACARÍDEO PRODUZIDO A PARTIR DA <i>K. MARXIANUS</i> CCMB 322.	82
	ANEXO C- ¹³ CNMR ESPECTRO DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDA DA <i>K. MARXIANUS</i> (CCMB 322)	83

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças apresentam como principal sintoma a dor, a qual pode ser iniciada por meio de um estímulo mecânico, térmico, químico ou qualquer outro estímulo que excite os terminais periféricos dos neurônios (FERREIRA; SILVA; CALIXTO, 2004). A dor é uma experiência complexa e subjetiva, que envolve a percepção de um estímulo nocivo quando as vias sensoriais são ativadas, mas que também depende de um componente emocional afetivo (BONICA, 1990).

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que procuram consultórios médicos no Brasil, sendo considerada a maior causa de afastamento ao trabalho (ROCHA et al., 2007). Segundo a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED), a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e em até 40% tem duração superior a um dia (SBED, 2015). A Fundação Americana de Dor (*American Pain Foundation*) estima que milhões de indivíduos sofram de dor aguda ou crônica (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2011), o que acarreta num enorme prejuízo social, econômico e de saúde pública. Assim, mediante a prevalência da dor, muitas pesquisas buscam novas opções terapêuticas para o seu controle, em virtude das limitações do tratamento convencional, tais como: efeitos adversos, pacientes refratários à terapia e a não responsividade ao tratamento em alguns casos.

A indústria farmacêutica, desde a descoberta do primeiro antibiótico, que foi extraído de um fungo, já descobriu inúmeros efeitos farmacológicos de moléculas oriundas de fungos e leveduras. Tal diversidade de atividades farmacológicas deve-se ao fato de que estes micro-organismos são uma rica fonte de metabólitos secundários e macromoléculas, apresentando uma grande diversidade de estruturas químicas. Dentre essas estruturas, destacam-se as glucanas por possuírem enorme variedade de configurações estruturais e

efeitos biológicos, como propriedades antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, imunomodulatória e anti-inflamatória (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

A *Kluyveromyces marxianus* é uma espécie de levedura presente no semiárido baiano com reconhecido potencial biotecnológico, por apresentar qualidades como a termotolerância, altas taxas de crescimento, amplo espectro de substrato e metabólitos secundários (FONSECA et al., 2008; BELEM; LEE, 1998; INCHAURRONDO et al., 1994). Estudos recentes demonstraram que o tratamento com o extrato da levedura *Kluyveromyces marxianus* (STEFANOVA et al., 2010) ou com a enzima superóxido dismutase proveniente da mesma (MACAFERRI et al., 2012) modularam a resposta imune, através da redução dos níveis de citocinas inflamatórias.

Com base no descrito, a versatilidade das leveduras do gênero *Kluyveromyces* tem despertado o interesse biotecnológico em explorar seus metabólitos secundários, assim como explorar a microbiota do semi-árido baiano. Neste contexto, motivados pela busca de novas opções terapêuticas para o tratamento de condições dolorosas, investigou-se a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do polissacarídeo (poly322) extraído da levedura *Kluyveromyces marxianus*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

▶ Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do polissacarídeo extraído da levedura *Kluyveromyces marxianus* (poly322).

1.1.2 Objetivos específicos

▶ Avaliar o efeito antinociceptivo do poly322 em modelos experimentais de dor;

▶ Verificar se a ação antinociceptiva do poly322 decorre de ação central e/ou periférica;

▶ Investigar a possível interferência do poly322 na atividade motora dos animais;

▶ Avaliar a atividade anti-inflamatória do poly322 no teste do edema de pata.

▶ Investigar possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do poly322: determinar possível interferência do poly322 na produção e/ou liberação das citocinas IL-1 β e IL-6.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A DOR

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos (IASP, 1994; MERSKEY, 1964). Ela envolve tanto a transdução de estímulos nocivos, quanto o processamento emocional pelo encéfalo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Sendo assim, é um fenômeno bastante complexo, porque se trata de uma experiência subjetiva, com forte componente emocional envolvido em sua percepção (BURGESS; PERL, 1967; MILLAN, 1999).

Para Dias Junior e colaboradores (2004) a dor pode ser definida didaticamente em dois componentes: sensorial-descritivo e emocional-afetivo-cognitivo. O primeiro componente refere-se à detecção da intensidade, localização, duração, padrão temporal e qualidade do estímulo nocivo, já o segundo componente refere-se à reação emocional envolvida em sua percepção.

Na experimentação animal, o componente emocional afetivo é difícil de ser avaliado em virtude de sua subjetividade. Desta forma, alguns autores sugerem a substituição dos termos dor e analgesia, comumente empregado para os seres humanos, pelo termo nocicepção e antinocicepção, quando utilizados para animais (JONES, 1992). O termo nocicepção define a percepção do estímulo nociceptivo, onde os receptores que detectam esses estímulos nocivos são denominados nociceptores. Quando um estímulo nocivo intenso ou persistente provoca alterações nos limiares nociceptivos, ocorrem os fenômenos descritos como alodinia, quando há uma resposta dolorosa a um estímulo que antes não era doloroso e hiperalgesia quando ocorre a resposta

exacerbada a um estímulo doloroso (LOESER; TREEDE, 2008). Devido à grande controvérsia na literatura sobre a utilização desses termos na experimentação animal, foi sugerido o termo hipernocicepção para designar o aumento da resposta nociceptiva comportamental em condições experimentais (PARADA et al., 2003).

Do ponto de vista fisiológico, a dor nos ajuda a evitar uma possível lesão ou o seu agravamento, atuando como alerta precoce ou um sinal protetor. A percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central (SNC) ocorre quando as vias sensoriais nociceptivas são estimuladas, refletindo a magnitude aversiva deste estímulo doloroso (MELZACK; CASEY, 1968). Os fisiologistas distinguem os termos, dor e nocicepção, onde a nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central resultante da ativação dos receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (ANGELOTTI, 2008).

Alguns dos nociceptores possuem corpo celular localizado nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal que se projetam para a periferia do corno dorsal da medula espinhal (Figura 1) e estabelecem conexões sinápticas com neurônios espinais (neurônios de segunda ordem) de distribuição altamente organizada (FEIN, 2011).

A estimulação dos nociceptores gera potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem da medula espinhal (Figura 1). Na medula espinhal, essa informação nociva ascende para o tronco encefálico e para o tálamo que, posteriormente, transmitem a informação para o córtex, onde são processadas as informações, como intensidade e localização da dor e para o sistema límbico onde os aspectos emocionais e afetivos são integrados na experiência da percepção da dor (WALDMANN; LAZDUNSK, 1998). Além do processo de transmissão da dor realizado pelas vias ascendentes, a dor pode ser modulada através das vias descendentes. Essas vias são responsáveis tanto por facilitar quanto por inibir a transmissão nociceptiva, ou seja, estão envolvidas no

processo de analgesia endógeno e contraditoriamente, na manutenção da dor crônica (JULIUS; BAUSBAUM, 2001).

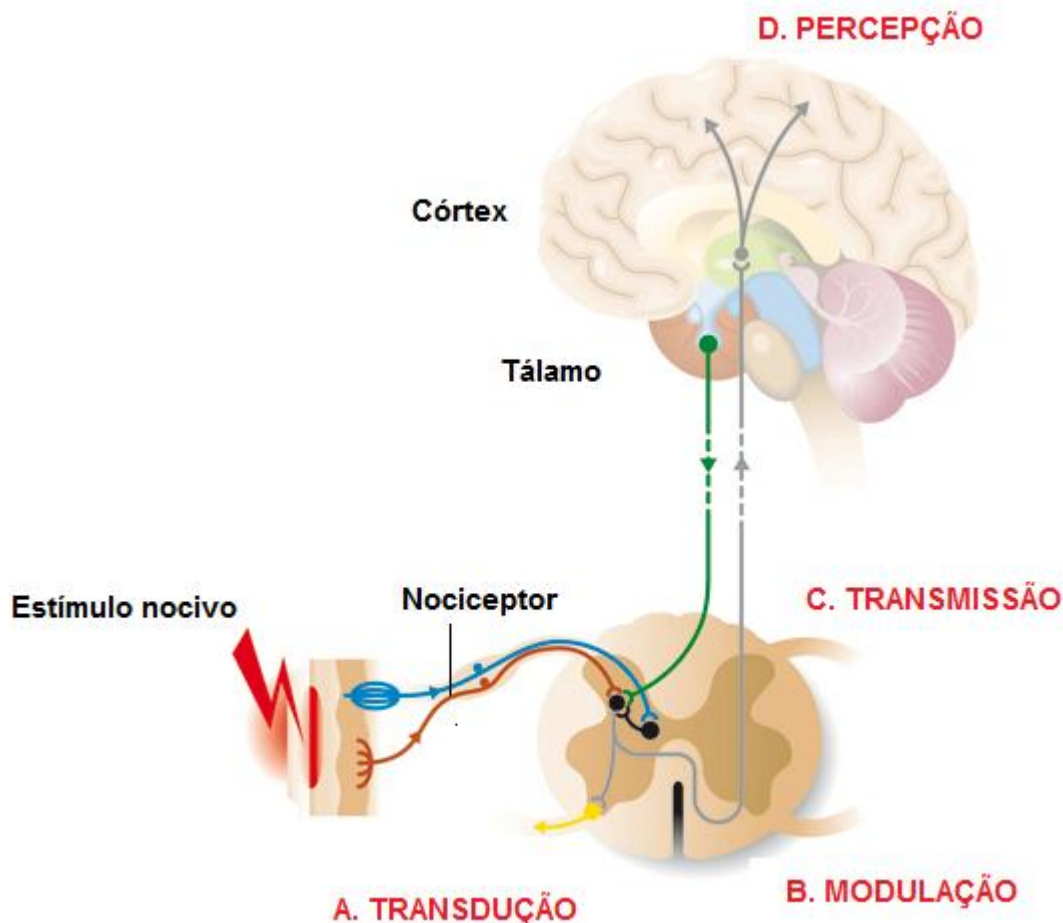


Figura 1. Visão geral do circuito nociceptivo. A transdução (A) consiste na ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nocivo (mecânico, térmico e químico) em potencial de ação; a modulação (B) consiste na supressão ou simplificação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas; a transmissão (C) é o conjunto de eventos que possibilitam que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja transportado para o sistema nervoso central e a percepção (D) envolve o processamento cognitivo ou consciente da dor.

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2009.

A dor pode ser classificada de acordo com um critério temporal em dor aguda ou dor crônica. A dor aguda caracteriza-se por uma resposta protetora que consiste em alertar o organismo sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual, permitindo a ativação de mecanismos de defesa ou de fuga

(ALMEIDA et al., 2006). A dor aguda é o sintoma mais comum em pacientes que procuram assistência médica (principalmente de urgência). Este tipo de dor desempenha o papel de comunicar aos centros superiores que algo está errado e geralmente tende a desaparecer com a remoção do fator causal e resolução do quadro patológico (FERNANDES; GOMES, 2011).

Por sua vez, a dor crônica ocorre quando o organismo não é capaz de resolver a lesão ou quando a plasticidade neuronal ainda mantém a sensação de dor, mesmo após a resolução da lesão, persistindo por meses ou anos, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (COSTIGAN et al., 2009). Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e da duração do estímulo, quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna seu controle (ZIMMERMANN, 2001).

A *American Pain Foundation* (2014) estima que milhões de indivíduos sofram de dor aguda ou crônica a cada ano e os efeitos da dor exigem um custo enorme com cuidados de saúde e reabilitação, além de acarretar a perda de produtividade do trabalhador e da qualidade de vida. Sendo assim, a dor é um problema de saúde de grande gravidade e incidência, acarretando sérias implicações econômicas para a sociedade.

2.2 INFLAMAÇÃO E A DOR INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta imune complexa relacionada a um dano tecidual causado por estímulos físico, químico, imunológico ou microbiano, sendo também considerada uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar o organismo tanto da causa inicial da agressão celular quanto das consequências desta agressão (HUME; FAIRLIE, 2005). As mudanças fisiológicas que acompanham a inflamação aguda local incluem algumas

características principais e envolvem uma sequência de eventos, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (HUERRE; GOUNON, 1996; VIVIER; MALISSEN, 2005).

A dor inflamatória resulta da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios (FERREIRA et al., 2009). Foi demonstrado tanto por modelos experimentais como em humanos, que dentre os principais mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, podemos destacar os metabólitos da ciclooxygenase (principalmente a prostaglandina E_2 e prostaciclina; PGE_2 e PGI_2) e componente simpático como as aminas simpáticas (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978, 1990; NAKAMURA & FERREIRA, 1987). Uma vez liberados, esses mediadores inflamatórios contribuirão para uma modificação fenotípica na fibra aferente primária através da ativação de cascatas de segundo mensageiros, enzimas e proteínas, que resultará na redução do limiar de resposta dessa fibra e aumento de potenciais de ação e da atividade espontânea dos nociceptores (BASBAUM; JESSELL, 2001).

Estudos descreveram a participação de diferentes citocinas no processo de desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória. A $IL-1\beta$, por exemplo, foi associada com a nocicepção inflamatória na experimentação animal (FERREIRA et al., 1998). Foi demonstrado que a administração intraplantar de $IL-1\beta$ induziu hipernocicepção via indução da enzima ciclooxygenase (COX) e consequentemente liberação de prostaglandinas (FERREIRA et al., 1998). Posteriormente, foi demonstrado que a administração intracerebroventricular de $IL-1\beta$ reduziu a latência de retirada no teste placa quente (HORI et al., 1998). Esses dados sugerem que administração periférica ou central de $IL-1\beta$ induz hipernocicepção mediada pela ativação de receptores específicos de membrana e a subsequente síntese de prostaglandinas, já que a

hipernocicepção foi prevenida pelo pré-tratamento com IL-1ra ou inibidor da COX (OKA et al., 1993; HORI et al., 1998).

Além disso, a participação da IL-1 β na indução da hipernocicepção inflamatória foi também demonstrada em modelos de inflamação, tais como a administração local de carragenina, CFA ou lipopolissacarídeo (LPS), no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por OVA e nos modelos de dor manifesta induzida por administração subcutânea de formalina ou administração intraperitoneal de ácido acético ou zimosan (VERRI et al., 2006). Assim, os dados experimentais indicam que a citocina IL-1 β parece ser um bom alvo para o controle da dor inflamatória.

A IL-6 é uma citocina que participa de vários processos inflamatórios, apresentando um papel dual na inflamação (DINARELLO et al., 1997). Reforçando, a importância da participação da IL-6 na instalação da hipernocicepção inflamatória, foi visto que camundongos deficientes de IL-6 exibiram uma menor hipernocicepção mecânica e térmica em resposta à injeção de carragenina nos tecidos periféricos (XU et al., 1997). Além disso, a administração intraplantar de IL-6 produziu uma hipernocicepção mecânica em ratos, o qual foi inibida por indometacina e não por IL-1ra (CUNHA et al., 2005). Sugerindo assim, que a citocina IL-6 precede a liberação de prostaglandinas para indução da hipernocicepção mecânica. Sendo assim, a inibição de IL-6 pode ser uma abordagem alternativa para controle da dor inflamatória.

Novas abordagens terapêuticas têm utilizado novos compostos com a finalidade de reduzir os sinais e sintomas de doenças inflamatórias através da inibição de mediadores inflamatórios, como: IL-1 β e IL-6 (LAVETI et al., 2013). Atualmente, estão disponíveis no mercado brasileiro agentes anti-IL-6 (Tocilizumabe) e anti-IL-1 (Rilonacepte) (SUEHIRO et al., 2010). Entretanto, o tratamento com esses novos agentes biológicos não é acessível para boa parte população, uma vez que o custo elevado e a administração por via parenteral limitam sua utilização de forma mais ampla.

2.3 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS

Ao longo da história da farmacologia, os produtos advindos de fontes naturais, bem como a sua utilização na medicina popular, sempre desempenharam papéis essenciais na evolução do tratamento farmacológico. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). A indústria farmacêutica é responsável por 33% da produção total de produtos químicos existentes no mundo, sendo estes: 65% de origem sintética, 25% extraídos de plantas e 10% de outros organismos vivos (SANT'ANA, 2002).

Até a descoberta da penicilina no início dos anos 40, a maioria das drogas era obtida a partir de plantas (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). O sucesso da penicilina no tratamento de infecção conduziu a uma expansão na descoberta de fármacos a partir de micro-organismos, tendo os fungos e leveduras um importante papel neste desenvolvimento.

Os micro-organismos são fontes abundantes de substâncias bioativas, e têm fornecido importantes contribuições para a descoberta de antibacterianos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (DEWICK, 2002). Outros metabólicos oriundos de micro-organismos são utilizados comercialmente com diferentes finalidades terapêuticas, como: agentes imunossupressores (ciclosporinas e rapamicina), agentes redutores do colesterol (lovastatina e mevastatina), agentes anti-

helmíntico (ivermectina), agente antidiabético (acarbose), vasoconstritores (ergonovina e ergotamina), e agente anticancerígeno (pentostatina, peplomicina, epirrubicina e taxol) (SILVA; COELHO, 2006; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; BUTLER, 2005).

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente a biomassa de fungos e leveduras, já que estes microorganismos são uma fonte abundante de polissacarídeos que possuem reconhecida atividade biológica. Destes polissacarídeos destacam-se as glucanas, mananos e galactanas que apresentam estruturas repetidas, periodicamente, em que as ligações são principalmente do tipo O-glicosídica, que podem estar ligados a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Estes polissacarídeos são classificados conforme o tipo de ligação estereo-química glicosídica do carbono anomérico adiciona-se o prefixo α ou β da cadeia principal (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; PELOSI et al., 2003). Muitos destes polissacarídeos apresentam forma enantiomérica, e usualmente insere-se o prefixo D (dextrógiro) ou L (levógiro), apesar de somente a forma D ser encontrada em plantas e micro-organismos (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINÉZ, 1996). Além disso, estas características químicas dos polissacarídeos afetam os parâmetros físicos, como a solubilidade, a massa molecular e a cor (SUTHERLAND, 1998).

A parede celular fúngica é basicamente composta por quitina, mananos e glucanas (Figura 2), que formam um núcleo interno rígido. Entretanto, vários outros polissacarídeos estruturalmente complexos como, glicoproteínas, enzimas, e os lipídios foram identificados como componentes da parede celular, frequentemente ancorados na camada externa (BERGTER; FIGUEIREDO, 2014).

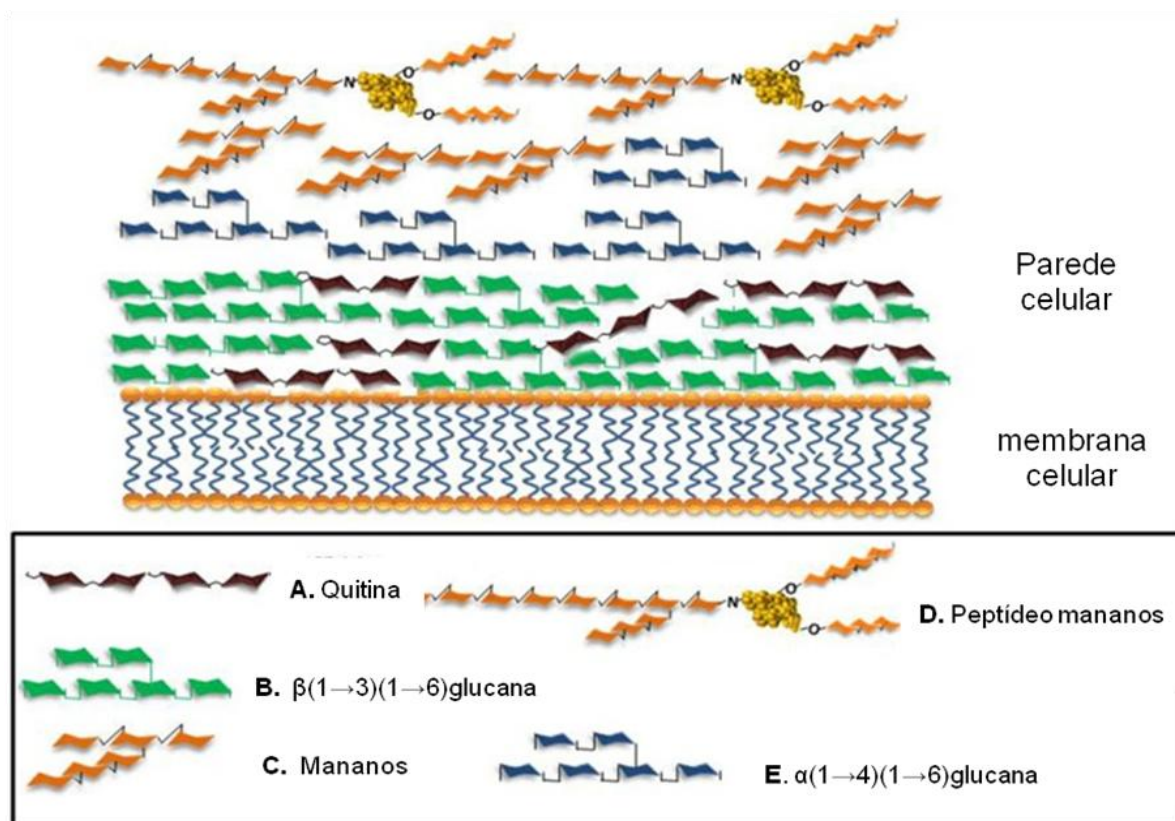


Figura 2. Representação esquemática dos principais componentes da parede celular dos fungos. A quitina (A) e β -glucanas (B) são os polissacarídeos mais abundantes na parede celular que também é constituída de mananos (C), polissacarídeo contendo manose que apresentam ligações covalentes à proteína (D) e as α -glucanas (E).

Fonte: Adaptado de Barreto-Bergter; Figueiredo, 2014.

Vários autores descrevem atividade imunossupressora relacionada com polissacarídeos extraídos de fungos (GOODRIDGE et al., 2009; CARDONE et al., 2014; WANG et al., 2013; ZHU, 2013; VETVICKA et al., 2013). Smeekens e colaboradores (2014) apontam em seu estudo a existência do receptor específico de polissacarídeos que quando ativado, induz especificamente uma resposta anti-inflamatória, através da inibição da citocina IL-1 β . Além disso, os polissacarídeos pode ser utilizado para prevenir ou tratar a ativação microglial excessiva durante as condições inflamatórias crônicas e que estes são capazes de induzem a ativação da via alternativa da cascata do complemento (SHAH, WILLIAMS, KESHVARA, 2009; BOSE et al., 2013).

Os polissacarídeos são também adjuvantes eficientes, que promovem a maturação de células dendríticas, o que desencadeia a ativação de CD4 e de linfócitos CD8 (YOSHITOMI et al., 2005; LEIBUNDGUT-LANDMANN et al., 2008). Pesquisas recentes apontam ação antinociceptiva de polissacarídeos com mecanismo de ação diversificados, extraídos de diferentes microorganismos, tais como: dos fungos *Pleurotus pulmonarius* (BAGGIO et al., 2010), *Amanita muscaria* (RUTHES et al., 2013) e da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (VALASQUES JUNIOR et al., 2014).

Alguns estudos relatam atividade antitumoral ou como adjuvante no tratamento antitumoral relacionado com polissacarídeos (NASROLLAHI et al., 2015; VETVICKA et al., 2014; LEE et al., 2014; PARZONKO et al., 2015; DING, 2015). Schimid et al. (2001) relaciona a atividade antitumoral desempenhada por alguns polissacarídeos com a organização da estrutura ligada em $\beta(1\rightarrow3)$ em tripla hélice e também com a complexidade da ramificação lateral e sua massa molecular.

O uso de polissacarídeos extraídos de fungos e leveduras para fins medicinais é um grande avanço para a medicina, tendo grande impacto sobre a saúde humana e a expectativa de vida da população. Assim, o uso de microorganismos para os processos biotecnológicos em saúde é mundialmente reconhecido, uma vez que estes são uma fonte promissora na busca de novos metabólitos bioativos.

2.4 A LEVEDURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* EXTRAÍDA DO SEMIARIDO BAIANO

O semiárido do estado da Bahia é um ecossistema com enorme potencial de biodiversidade. Assim, estudos que visem à elucidação deste

potencial são de grande importância tanto do ponto de vista da sustentabilidade quanto do ponto de vista econômico (NASCIMENTO, 2010). Neste contexto, a região do semiárido baiano abriga uma vasta diversidade de micro-organismos ainda pouco explorada no Brasil, resistentes a condições extremas e, em consequência, macromoléculas e metabólitos de enorme potencial farmacológico.

Coleções de Culturas de Microrganismos (CCMs) têm assumido papel importante no desenvolvimento de insumos biotecnológicos por serem o depositário para preservação e manutenção de suas características. Dentre estes micro-organismos, as leveduras desempenham importante papel na produção de alimentos, bebidas, enzimas, química fina e reagentes farmacêuticos. Elas também têm sido a vanguarda da pesquisa em genética moderna, biologia molecular e celular, pois há um crescente interesse na aplicação de ferramentas moleculares para compreender e melhorar os processos fermentativos (LANE; MORRISSEY, 2010).

As principais áreas de aplicação das leveduras em biotecnologia são: a indústria química (enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos); a indústria de fermentação (vinhos, cerveja, pão e bioetanol); a indústria farmacêutica (vacinas, probióticos, hormônios e fatores sanguíneos); pesquisas biomédicas (metabolismo de drogas, doenças genéticas humanas, câncer e AIDS); tecnologia ambiental (tratamento de resíduos, esgotos, subprodutos indústrias, controle biológico e bioabsorção de metais); e as pesquisas fundamentais (biologia celular e molecular, bioquímica e genética) (WALKER, 2005).

Dentre a grande variedade de leveduras encontradas no semiárido baiano, pode-se destacar a *Kluyveromyces marxianus*, uma levedura pertencente ao filo *Ascomycota*, à classe *Ascomycetes*, à ordem *Saccharomycetales*, à família *Saccharomycetaceae* e do gênero *Kluyveromyces*. O filo *Ascomycota* apresenta, dentre as principais características, parede celular contendo quitina e glucana, produção de asco e micélio septado. A família *Saccharomycetaceae* inclui leveduras que são

predominantemente unicelulares e podem produzir pseudo micélio, têm reprodução assexuada primariamente por brotamento multilateral e que produzem ascosporos que se originam tanto de um zigoto como partenogeneticamente (ALEXOPOULOS et al., 1996). Possui características fenotípicas, como termotolerância, produção de enzimas e taxa de crescimento rápido, o que torna esta levedura atraente para a produção industrial de etanol a partir de substratos de baixo custo (BELEM; LEE, 1998; INCHAURRONDO et al., 1994).

Uma das principais características de *K. marxianus* é a termotolerância. As linhagens pertencentes a essa espécie são capazes de crescer em temperaturas entre 45 e 49 °C (NONKLANG, 2008). Quanto ao seu metabolismo, tem a capacidade de crescer em um amplo espectro de substratos, apresentando uma das maiores taxas de crescimento entre os organismos eucariotos, com um tempo de geração de 70 minutos (LANE; MORRISSEY, 2010). Algumas linhagens de *K. marxianus* apresentam dimorfismo, podendo apresentar-se na forma de filamentos (ROCHA et al., 2011). Essa é uma característica que pode ser explorada industrialmente para a secreção de proteínas, uma vez que os organismos filamentosos são conhecidos por sua propriedade de secreção eficiente.

Em termos de estudos bioquímicos de interesse industrial, a *K. marxianus* tem sido usada como produtoras de enzimas extracelulares endógenas como inulinase, β -galactosidase, β -glicosidase, endopoligalacturonases e outras proteínas com potenciais aplicações biotecnológicas, tais como proteínas fosfatases, carboxipeptidases e aminopeptidases. Devido a *K. marxianus* ser capaz de secretar uma proteína de alta massa molecular como a inulinase, é suposto que essa seja uma característica favorável para sua aplicação em produção de proteínas heterólogas (ZHANG et al., 2003; PECOTA et al., 2007; YANASE et al., 2010).

Macaferri e colaboradores (2012) investigaram propriedades benéficas da levedura láctica *K. marxianus*, através de ensaios *in vitro*. A *K. marxianus* inibiu as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , e IL-6) em células

mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS. Outro estudo investigou o efeito da enzima superóxido dismutase (SOD) a partir de uma estirpe da levedura *Kluyveromyces marxianus* sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo de artrite. O tratamento com SOD da *Kluyveromyces marxianus* suprimiu eficazmente os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e MIP-1 α), além de inibição direta da destruição do tecido articular (STEFANOVA et al., 2010). Assim, nota-se a importância da identificação de novas moléculas oriundas da levedura *K. marxianus* que modulem o processo inflamatório, tornando esta levedura uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEO A PARTIR DE *K. MARXIANUS*

O polissacarídeo foi previamente caracterizado e produzido pelo Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN). A *K. marxianus* (CCMB 322) pertence a Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB, Feira de Santana, Brasil). Sendo assim, esta levedura foi cultivada em meio de cultura YM por 48 a 144h, sob temperatura a 28 °C para produzir a biomassa. Este meio de cultura foi filtrado e centrifugado (Centrífuga 5804R - Eppendorf, São Paulo, Brasil) durante 15 minutos a 4°C, e o precipitado contendo a biomassa a partir de *K. marxianus*, foi utilizado para extrair os biopolímeros.

O pó seco de biomassa (10 g) foi extraído com 20 volumes de NaOH 0,1M a 40-80°C, durante 45-180 min. A suspensão foi centrifugada a 10.000 xg durante 10 min. O precipitado de polissacarídeos bruto foi seco a 65°C até um peso constante e o polímero foi pesado em balança (Sartorius ALC-110,4, Alemanha).

A homogeneidade do material foi verificada através de cromatografia de permeação em Gel (Sephacryl S-200) (Anexo A). A caracterização do polissacarídeo foi realizada através da técnica de espectroscopia de infravermelho (*PE IR Spectrum Ascii Peds 1.60, Spectrum One FT-IR Spectrometer*) (Anexo B) e análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Anexo C).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos *Swiss Webster* machos adultos (20 a 30 g, n=6-7), mantidos em temperatura controlada (22 ± 2 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com acesso a água e a comida *ad libitum*. Todos os testes comportamentais foram realizados 08:00 -18:00 horas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEFS.

Todos os procedimentos para manejo, uso e condicionamento dos camundongos estão de acordo com as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) sobre o uso de animais em pesquisa da dor (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

3.3 DROGA E DILUENTES

As drogas foram adquiridas da Sigma® (indometacina, carragenina e adjuvante completo de Freund); Merck® (formaldeído e ácido acético); Cristália® (morfina); Hipolabor® (diazepam) e Hypofarma® (dexametasona). A indometacina foi dissolvida em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 mais solução salina fisiológica. Drogas restantes foram dissolvidas em solução salina fisiológica.

3.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

3.4.1 Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os animais foram separados por grupos e tratados, por via intraperitoneal (i.p.) com diferentes doses do poly322 (3, 10 e 30 mg/kg), indometacina (10 mg/kg; controle positivo) ou com a salina (controle negativo). 30 minutos após o pré-tratamento, todos os animais receberam injeção do ácido acético (0,8% v/v, 10 ml/Kg) por via i.p. Collier e colaboradores (1968) descreveram que a resposta de contorção consiste numa contração do músculo abdominal, juntamente com um alongamento dos membros posteriores, produzidas como repostas reflexas à irritação induzida pelo ácido aplicado (Figura 3). Deste modo, a intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada através da contagem do número total de contorções abdominais que ocorreu nos primeiros 30 minutos após a injeção do ácido acético.



Figura 3. Avaliação do comportamento nociceptivo no teste de contorções abdominais, através da administração intraperitoneal do Ácido Acético.

3.4.2 Teste de formalina

Conforme descrito por Dubuisson e Dennis (1977) este método tem por finalidade avaliar a nocicepção manifesta por injeção de agente algésico em camundongos. Foi quantificado como comportamento nociceptivo o tempo que o animal passou a lamber e morder a pata após a injeção intraplantar de formalina (Figura 4). Este comportamento ocorre em padrão bifásico. A primeira fase corresponde aos primeiros 5 minutos e está associada à resposta imediata à formalina, a segunda fase (15 a 30 minutos) decorre da liberação de mediadores hiperalgésicos. Foram administradas três doses por via i.p: 3, 10 e 30 mg/kg do poly322, a salina (controle negativo) e a indometacina 10mg/kg (controle positivo). Após trinta minutos da aplicação, os animais foram cuidadosamente contidos, enquanto no dorso da pata traseira foi administrado 20 μ L de formalina a 2,5%. Após a injeção, os animais foram devolvidos para a câmara de observação, por um período de 30 minutos.



Figura 4. Avaliação do comportamento nociceptivo através da administração de formalina no dorso da pata traseira por via intraplantar 20 μ L (2,5%).

3.4.3 Modelo de dor inflamatória induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)

Os animais foram ambientados 10 minutos antes do experimento e posteriormente, tratados com as doses de 10, 30 e 90 mg/kg (i.p.) do poly322. Trinta minutos depois, os camundongos receberam injeção de CFA (20µL, 1mg/mL) na região intraplantar direita. Foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata por 20 minutos. O controle negativo foi à salina (i.p.) e o controle positivo foi à morfina 5mg/kg, administrado pela via subcutânea (s.c.).

3.4.4 Teste de imersão da cauda

O teste de imersão da cauda em camundongos foi realizado como descrito por Spencer e Sewell (1976), com algumas modificações. Os animais foram ambientados em cilindros de contenção durante 4 dias consecutivos (20 minutos por dia). No quinto dia os animais foram colocados nos cilindros de contenção e a ponta da cauda (2 cm) foi imersa num banho de água a $48^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 5). A latência para o reflexo de retirada da cauda (tempo da resposta) foi mensurada em todos os animais. Os animais que não responderam dentro de 5 segundos foram excluídos do teste.

Os camundongos foram então selecionados e divididos em grupos experimentais: controle negativo (solução salina, i.p.), poly322 (10, 30 e 90 mg/kg, i.p.) e o controle positivo (morfina 5 mg/kg, s.c.). Após a administração das drogas, avaliou-se o reflexo de retirada da cauda nos tempos: 0,5 h, 1 h, 3 h e 5 h. Para evitar danos no tecido da cauda, o tempo de corte foi de 10 segundos. Por fim, o índice de antinocicepção (IA) de cada animal foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IA = \frac{(\text{latência do teste} - \text{latência basal})}{10 - \text{latência basal}} \times 100$$

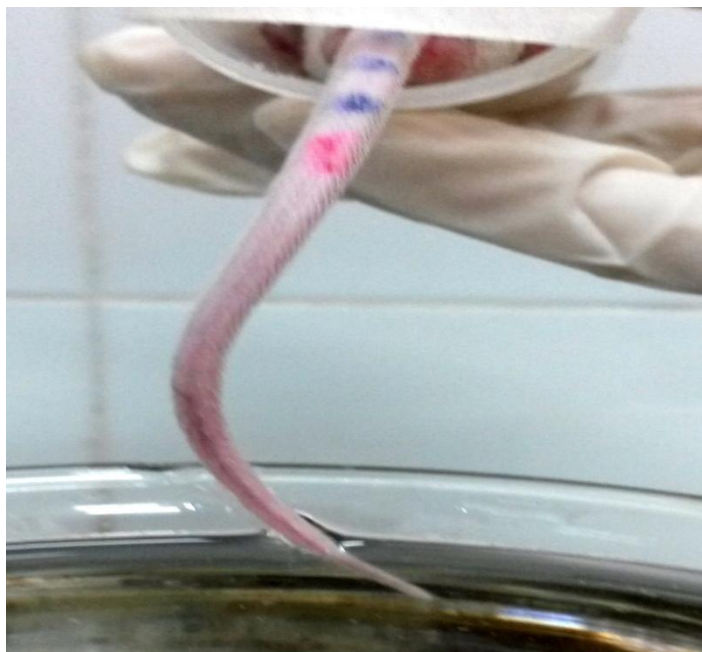


Figura 5. Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de imersão da cauda.

3.4.5 Teste da placa quente

Proposto por Woolfe e Mc Donald (1944) consiste em colocar os animais sobre uma placa quente ($55\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$) e cronometrar o tempo gasto pelo animal para manifestar uma resposta nociceptiva como lambe, morder, saltar ou levantar as patas (Figura 6). Estabelecendo-se um teto de 30 segundos para minimizar a probabilidade de dano tecidual. Foram administradas as doses de 10, 30 e 90 mg/kg do poly322 por via i.p., salina (controle negativo, i.p.) e 5 mg/kg da morfina (controle positivo, s.c.). Desta maneira, cronometrou-se o tempo que os camundongos levaram para manifestar uma resposta nociceptiva nos intervalos: 0,5 h; 1 h; 3 h e 5 h após a aplicação.



Figura 6. Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de placa quente.

A atividade antinociceptiva foi quantificada pelo aumento do índice de antinocicepção, calculado pela seguinte equação:

$$IA = \frac{(\text{latência do teste} - \text{latência basal})}{30 - \text{latência basal}} \times 100$$

3.4.6 Teste do cilindro giratório (Rota rod)

No teste do cilindro giratório os animais foram submetidos a uma análise de pré-seleção dois dias antes do experimento, com a finalidade de selecionar apenas aqueles que se mantivessem em equilíbrio sobre a barra durante dois minutos, por três tentativas. Os animais foram colocados em cilindros com rotação constante (20 rotações por minuto), necessitando locomover-se para permanecer no aparelho. Sendo assim, a capacidade de coordenação é quantificada pelo registro do tempo de permanência. Os resultados foram expressos em média do tempo, ou seja, em segundos de permanência dos

animais no cilindro giratório por 120 segundos (Figura 7). Desta forma, os animais foram tratados, 30 minutos antes do início do teste, com a dose de 90 mg/kg (i.p.) do poly322, a salina (controle negativo, i.p.) e 10mg/kg de diazepam (controle positivo, s.c.).



Figura 7. Avaliação do comprometimento motor realizado através do teste do cilindro giratório.

3.4.7 Teste do campo aberto (open field)

Hall (1934) originalmente descreveu o teste de campo aberto cujo procedimento consiste sujeitar o animal a um ambiente desconhecido. Os animais foram contidos em uma caixa de acrílico opaco (50 cm x 60 cm x 45 cm), com piso demarcado em 12 quadrados iguais. Foi registrado o número de vezes em que os animais cruzam os quadrados com as quatro patas durante o período de três minutos (Figura 8). Os animais foram pré-tratados com a salina (controle negativo, i.p.), com 90 mg/kg do poly322 por via i.p. e com 10 mg/kg de diazepam (controle positivo, s.c.), aplicados 30 minutos antes do início do teste. Os dados foram expressos conforme descrito em Capaz et al. (1981),

como números de campos cruzados pelos animais.



Figura 8. Avaliação da coordenação e atividade exploratória realizada através do teste do campo aberto.

3.4.8 Teste do edema de pata induzido por carragenina

No teste de edema de pata induzido por carragenina, foi administrado 100 μ g de carragenina na pata traseira direita do camundongo. O edema produzido nos animais foi mensurado com um pletismômetro, visualizado na figura 9 (UGO BASILE, COMERIO, ITALY). Sendo assim, o volume da pata do animal foi quantificado conforme descritos por Winter et al. (1962): em volume antes da injeção da carragenina (valor basal) e volume depois da injeção da carragenina (Valor final). Os animais foram pré-tratados 30 minutos antes da administração da carragenina com o poly322 (10, 30 e 90 mg/kg, i.p.), a solução salina (i.p.) ou com a dexametasona (2mg/kg, s.c.). O edema de pata

foi avaliado na 3ª hora após a aplicação da carragenina.



Figura 9. Pletismômetro (Ugo Basile, Comerio, Itália).

3.4.9 Determinação dos níveis de IL-6 e IL1- β

Os níveis IL-6 e IL-1 β das amostras foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche. Os camundongos foram pré-tratados com o poly322 (90mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes de receberem injeção intraplantar de carragenina na pata posterior direita. Depois de 3 horas, os animais de cada grupo foram anestesiados para retirada do tecido da pata. Proteínas do tecido foram extraídas na proporção de 100 mg de tecido/mL PBS (0,05% Tween 20; 0,1mM PMSF; 0,1mM benzametônio; 10mM EDTA; 2ug/ml aprotinina A; 0,5% BSA). As amostras foram centrifugadas por 3000 rpm a 10 minutos e o sobrenadante estocado a -70°C. A dosagem de citocinas foi estimada utilizando o kit de imunoenensaio ELISA para camundongos (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN). A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190–Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450nm. As análises foram realizadas no Software

Softmax 4.3.1 (molecular Devices) e os resultados foram expressos em picogramas de citocina por mililitro de solução de proteínas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o GraphPadPrism (GraphPad Inc., San Diego, CA) e apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de medidas feitas com 6 animais por grupo. A comparação entre grupos distintos de tratamento foi feita utilizando one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Em estudos de medidas repetidas ao longo do tempo, foi utilizado o two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

4.1.1 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A atividade antinociceptiva do poly322 foi inicialmente avaliada no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Após a injeção intraperitoneal (ip) do agente nociceptivo (ácido acético) nos camundongos, os animais tratados pela administração intraperitoneal do poly322 nas doses de 10 e 30 mg/kg produziram uma redução significativa e dose dependente do número de contorções abdominais induzidas por este agente algésico ($p < 0,05$). A indometacina (10mg/Kg) utilizada como controle positivo, também inibiu significativamente o número de contorções abdominais ($p < 0,05$) (Figura 10).

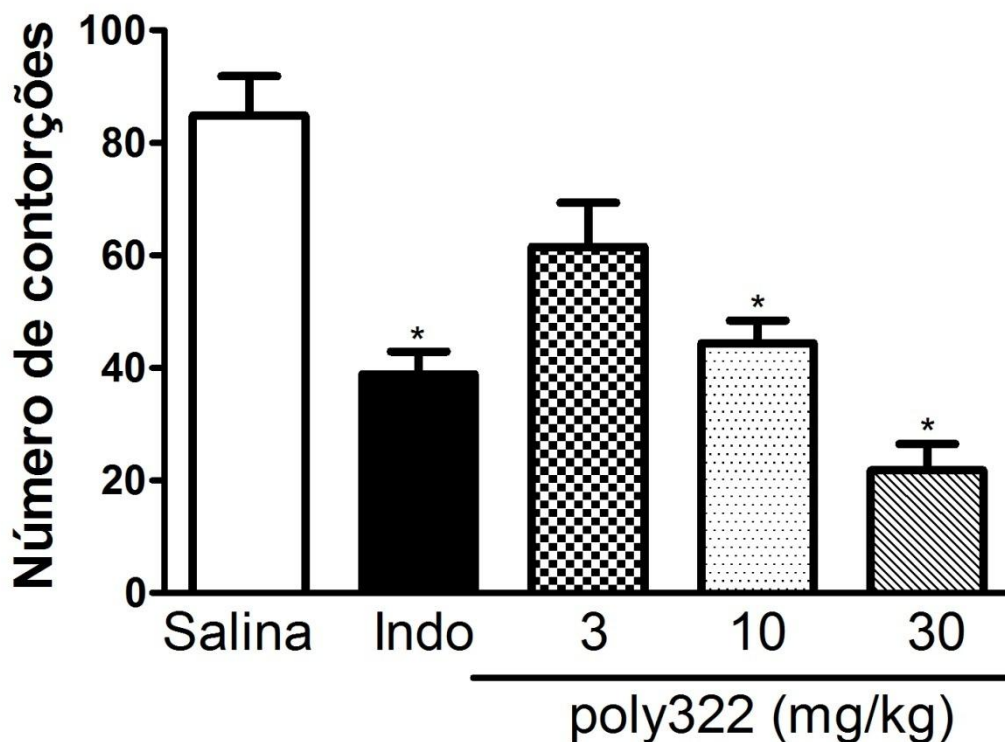


Figura 10. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolado da *K. marxianus* (poly322) no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (3, 10, 30 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes do ácido acético 0,8% (injetado no tempo zero). Indometacina (Indo; 10 mg/kg i.p.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.2 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de formalina

O teste da formalina é caracterizado por apresentar duas fases distintas de nocicepção, uma primeira denominada de fase neurogênica e uma posterior ou tardia denominada de fase inflamatória (HUNSKAAR et al., 1985; DICKENSON; SULLIVAN, 1987; COWAN et al., 1989). Desta forma, a injeção da formalina intraplantar promoveu uma resposta bifásica (Figura 11 A e B).

Na fase da dor neurogênica ou fase precoce (0–05 min) foi possível observar que o pré-tratamento com o poly322 (3, 10 e 30mg/Kg) não inibiu o comportamento nociceptivo dos animais (Figura 11-A). Na segunda fase (15–30min) o pré-tratamento com o poly322 (30mg/Kg) foi capaz de inibir significativamente o comportamento nociceptivo ($p < 0,05$). A indometacina (10mg/kg, i.p.) fármaco de referência, apresentou ação antinociceptiva apenas na segunda fase do teste de formalina (Figura 11 A e B).

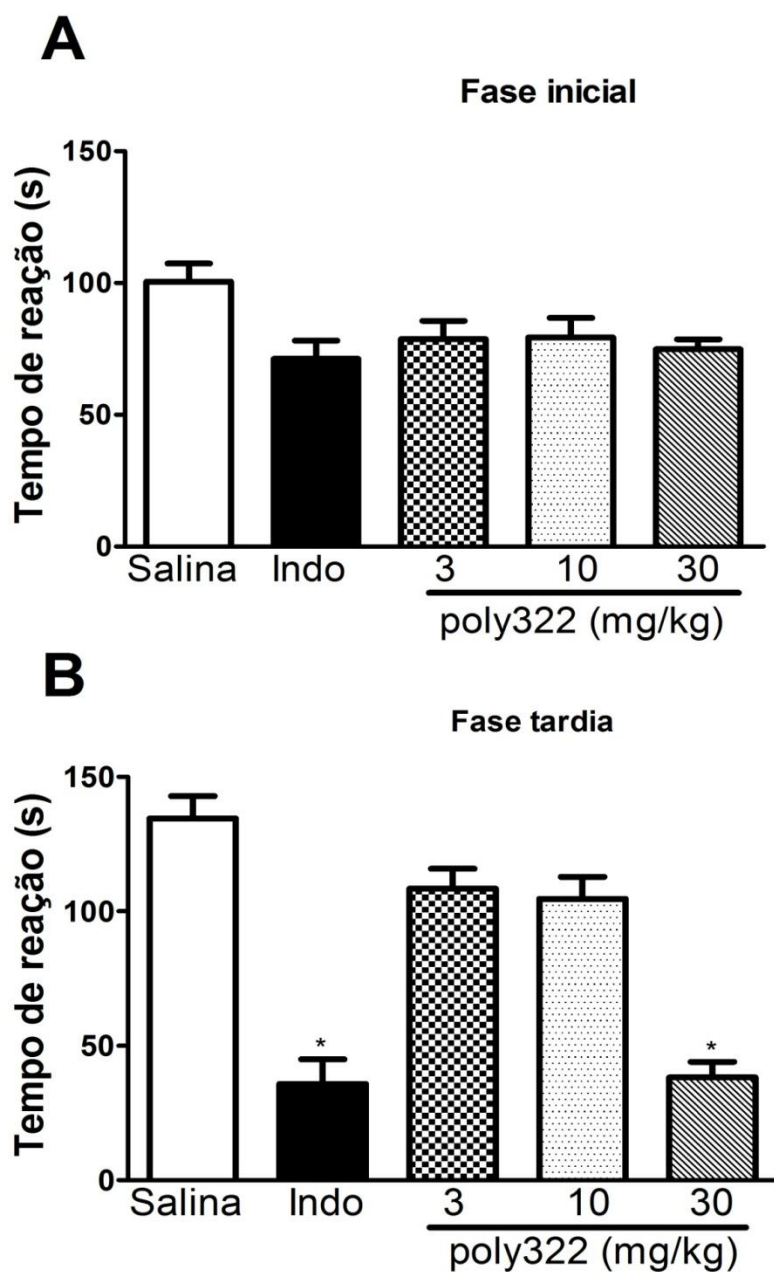


Figura 11. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da *K. marxianus* (poly322) sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos. Os painéis (A) e (B) representa os efeitos do poly322 na fase inicial (A) e na fase tardia (B) de nocicepção induzida por formalina. Os animais foram tratados com o poly322 (3, 10, 30 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração da formalina (injetado no tempo zero). Indometacina (Indo; 10 mg/kg, i.p.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.3 Efeito do pré-tratamento com poly322 no modelo de dor manifesta induzida por CFA

O modelo de nociceção manifesta induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). Neste modelo os animais que foram pré-tratamento com o poly322 nas doses de 30 e 90 mg/Kg diminuíram significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de CFA ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo, resultado este similar ao demonstrado pela droga de referência morfina 5 mg/Kg ($p < 0,05$). Entretanto, a dose de 10mg/Kg não inibiu o comportamento nociceptivo dos animais em relação ao controle negativo (Figura 12).

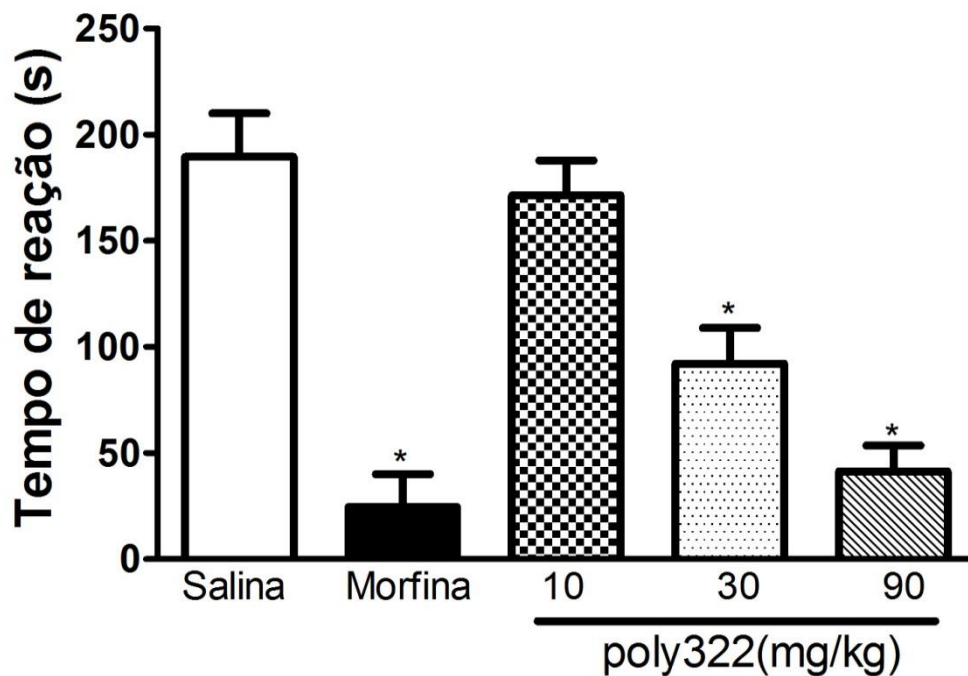


Figura 12. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da *K. marxianus* (poly322) sobre a nocicepção induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (10, 30, 90 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do CFA (injetado no tempo zero). Morfina (5mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.4 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste de imersão da cauda

Este teste teve por finalidade avaliar um possível efeito antinociceptivo central do poly322. O tratamento com o poly322 (10, 30, 90 mg/kg) não foi capaz de alterar o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste de imersão da cauda (Figura 13). Em contraste, os animais que receberam a administração de morfina (5 mg/kg), o fármaco de referência, apresentaram um aumento significativo no tempo de latência 0,5 e 1 hora após a administração ($P < 0,001$). Assim, os resultados sugerem que o Poly322 não é capaz de suprimir a resposta de neurônios espinhais sensíveis ao estímulo térmico nocivo a cauda.

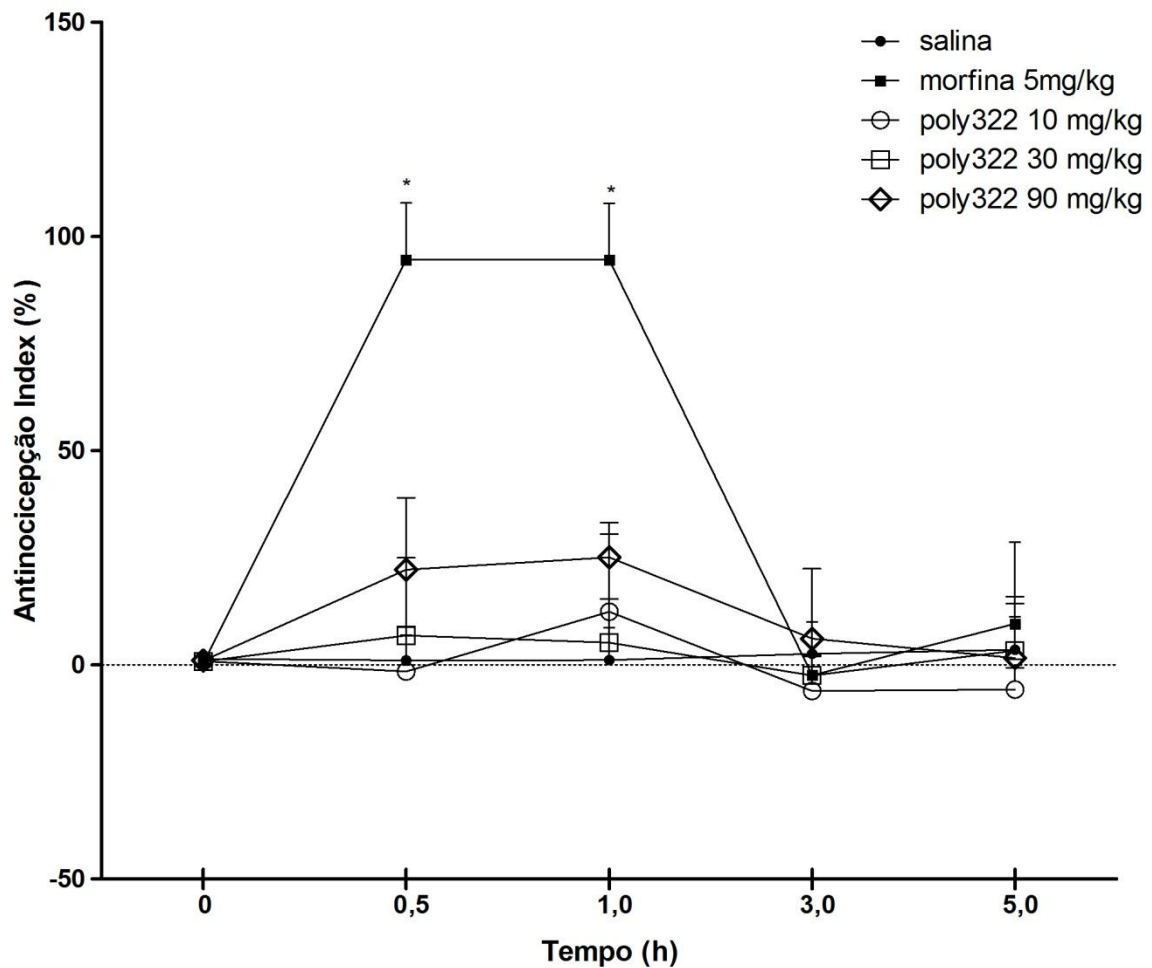


Figura 13. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da *K. marxianus* (poly322) no teste de imersão de cauda em camundongos. A figura mostra dados da latência (reflexo de retirada da cauda) representada como índice de antinocicepção. Para avaliar o curso de tempo do efeito antinociceptivo, o limiar térmico nociceptivo foi avaliado até a 5 horas após a administração Intraperitoneal do poly322 (10, 30 e 90 mg/kg, i.p.) ou solução salina (grupo de controle). A morfina (5 mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n =6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,001$) ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

4.1.5 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste da placa quente

Os resultados representados na Figura 14 demonstram que o pré-tratamento com o poly322 nas diferentes doses (10, 30 e 90 mg/kg, i.p.) não alteraram o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente nos tempos de 0,5, 1,0, 3,0 e 5,0 hora após o tratamento com o poly322. No entanto, o tratamento com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, s.c.) aumentou o período de latência dos animais 0,5 e 1 hora após a administração ($p < 0,0001$). Estes resultados sugerem que a atividade antinociceptiva do poly322 não envolve a participação de neurônios supra-espinhais sensíveis ao estímulo térmico nocivo.

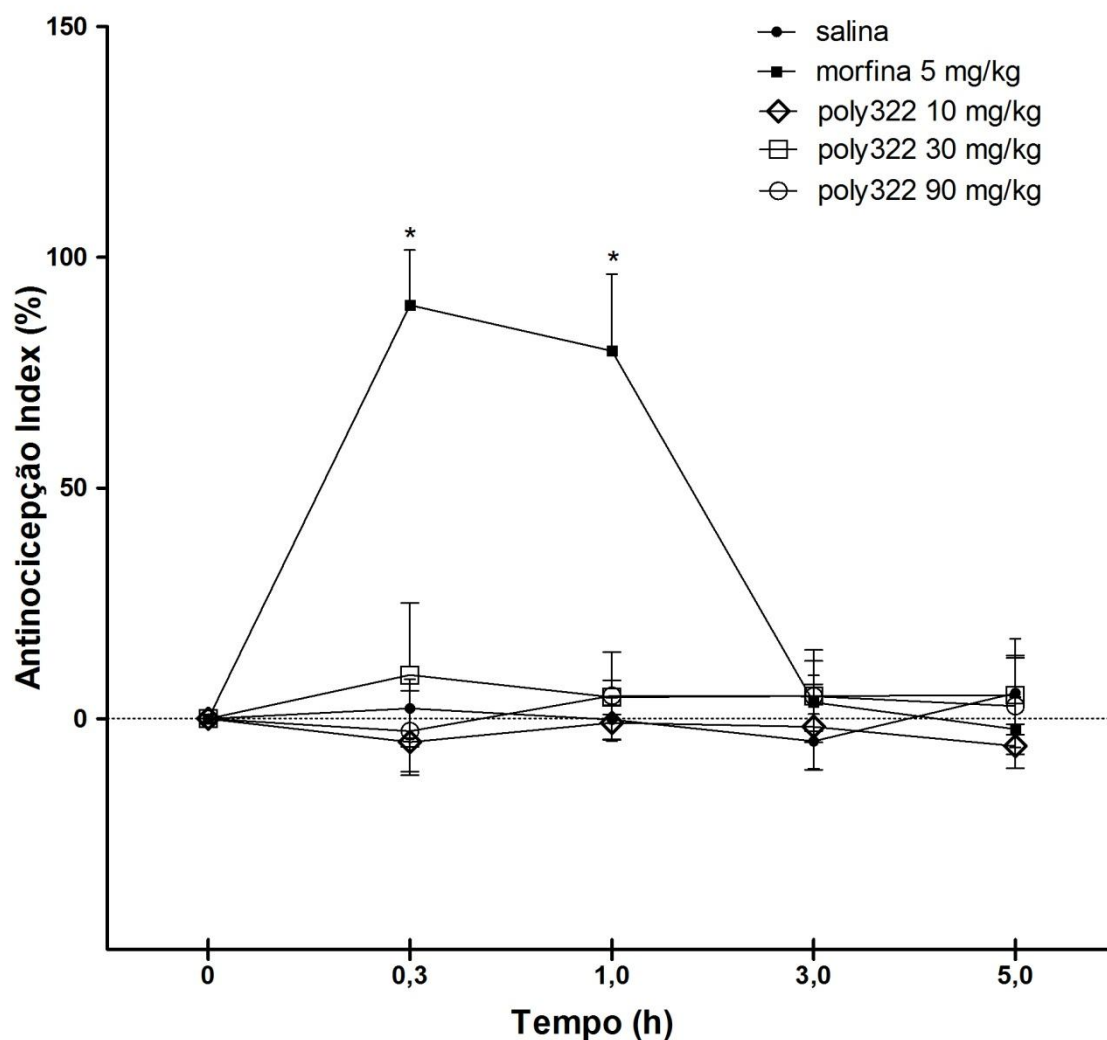


Figura 14. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da *K. marxianus* (poly322) no teste da placa quente em camundongos. A figura mostra dados da latência (reflexo nociceptivo) representada como índice de antinocicepção. Para avaliar o curso de tempo do efeito antinociceptivo, o limiar térmico nociceptivo foi avaliado até 5 horas após a administração intraperitoneal do poly322 (10, 30 e 90 mg/kg, ip) ou solução salina (grupo de controle). A morfina (5 mg/kg s.c.), foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,001$) ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

4.1.6 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste do cilindro giratório

A função motora dos animais foi avaliada no teste do cilindro giratório, sendo realizado após 30 minutos da aplicação intraperitoneal da maior dose utilizada nos teste de avaliação do comportamento nociceptivo do poly322 (90 mg/Kg). Observou-se que o grupo tratado com o poly322 não alterou de forma significativa o tempo de permanência dos animais no cilindro giratório, ou seja, não interferiu na capacidade locomotora dos animais, comparado com os animais que receberam o pre-tratamento com diazepam (10mg/kg), o controle positivo, onde pode-se observar uma redução significativa do tempo de permanência dos animais no cilindro giratório ($p < 0,05$) (Figura 15).

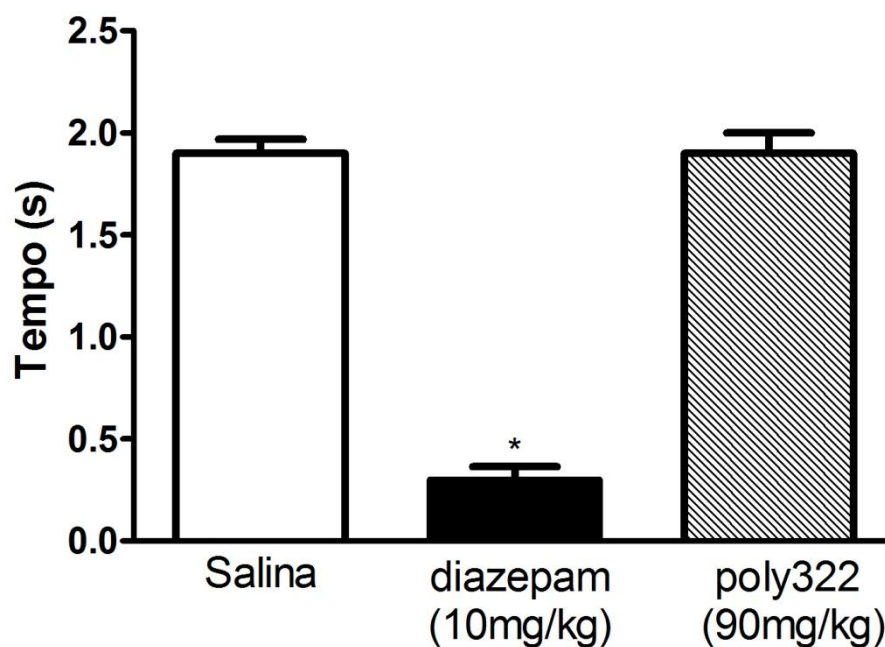


Figura 15. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada da *K. marxianus* (poly322) no teste do cilindro giratório em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (90 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes do início do teste. Diazepam (10 mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.7 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste do campo aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a função motora e exploratória dos animais após a administração do poly322. A administração intraperitoneal do poly322 (90mg/kg) não alterou de forma significativa o número de quadrados atravessados pelos camundongos em relação ao grupo controle, tratado com salina. O diazepam (10mg/kg, s.c.) apresentou redução significativa do número de quadrados percorridos no campo aberto ($p < 0,05$) (Figura 16). Estes resultados demonstraram que o pre-tratamento com o poly322 realizado com a maior dose utilizada nos teste de avaliação do comportamento nociceptivo não comprometeu a atividade exploratória e motora dos animais.

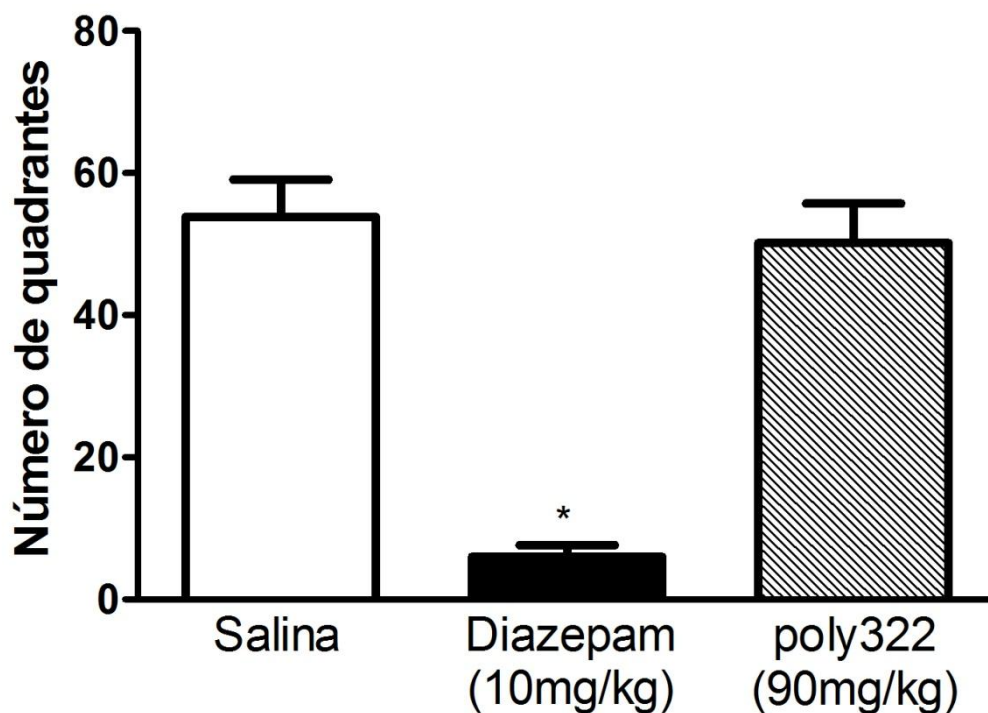


Figura 16. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do *K. marxianus* (poly322) no teste do campo aberto em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (90 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes do início do teste. O Diazepam (10 mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.8 Efeito do pré-tratamento com poly322 no teste do edema de pata induzido por carragenina

O efeito anti-inflamatório do poly322 foi avaliado no teste de edema de pata induzido pela carragenina. O pré-tratamento com o poly322 (30 e 90 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina inibiu significativamente o edema de pata produzido pela carragenina na terceira hora após a aplicação deste estímulo inflamatório ($p < 0,05$) (Figura 17). Em consonância, a dexametasona (2mg/Kg, s.c.), utilizada como droga de referência, também reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina ($p < 0,05$).

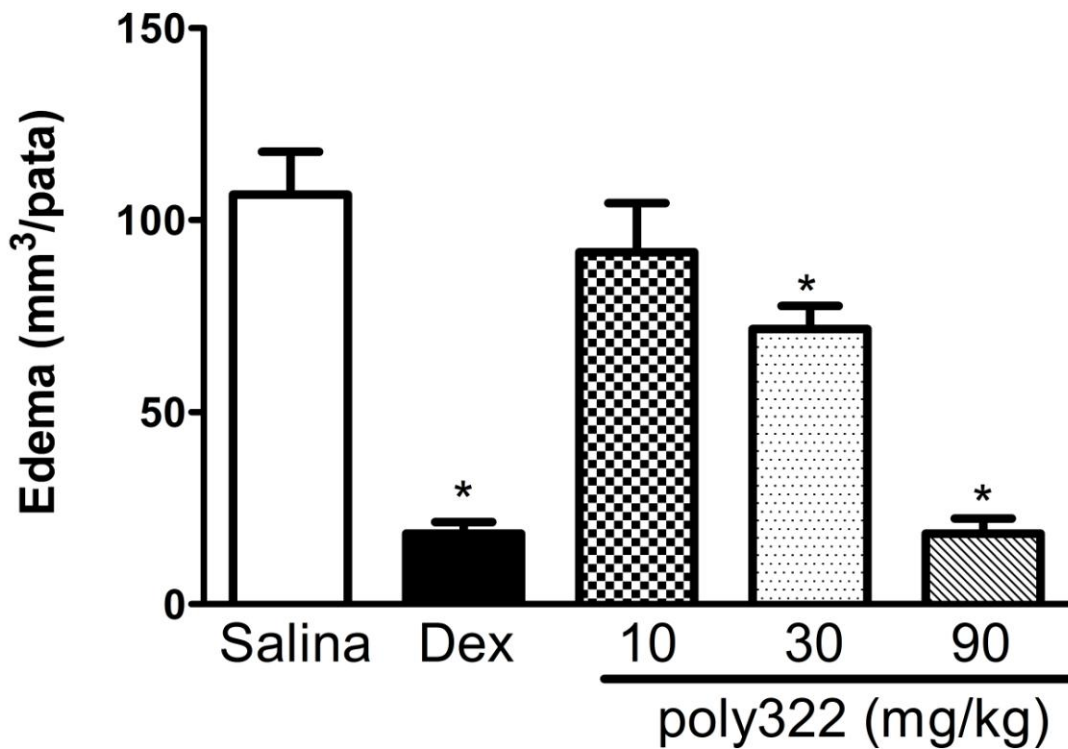


Figura 17. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do *K. marxianus* (poly322) no teste de edema de pata induzido por carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (10, 30 e 90 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração de carragenina (100µg/pata). Dexametasona (2 mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.1.9 Efeito do tratamento com poly322 na redução dos níveis de citocinas

A avaliação da possível interferência do pré-tratamento com o poly322 nos níveis de citocinas foi avaliada através da determinação dos níveis intraplantares das citocinas pró-inflamatórias: IL-6 e IL-1 β . A dexametasona (2 mg/Kg, s.c.) utilizada como droga de referência, reduziu significativamente a concentração (pg/ml) tanto da IL-6, quanto da IL-1 β no tecido plantar analisado ($p < 0,05$). O tratamento com poly322 (90 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção de carragenina, reduziu significativamente os níveis de IL-6 nas patas inflamadas, quando comparado ao grupo tratado com salina ($p < 0,05$). Todavia, a administração do poly322 (90 mg/Kg, i.p.) não apresentou inibição nos níveis de IL-1 β no tecido plantar (Figura 18).

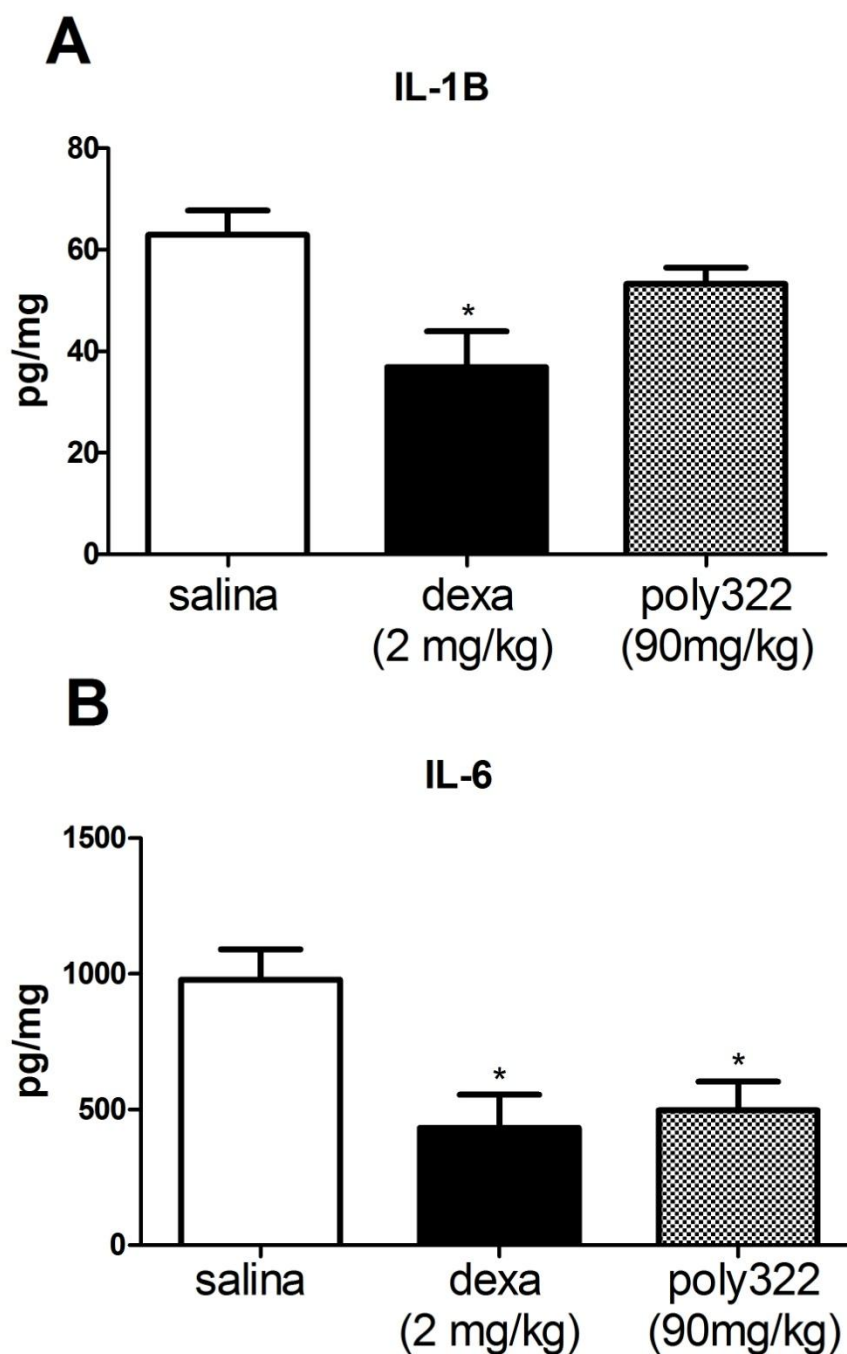


Figura 18. Efeitos da administração intraperitoneal do polissacarídeo isolada do *K. marxianus* (poly322) na determinação dos níveis de citocinas IL-6 e IL-1 β induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 μ g/100 μ l), em camundongos. Os animais foram tratados com o poly322 (90 mg/Kg) ou salina (controle negativo) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina (100 μ g/pata). Dexametasona (2 mg/kg, s.c.) foi à droga de referência. Os dados são expressos como média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente do grupo de controle ($p < 0,05$), tal como determinado por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5 DISCUSSÕES

As atividades biológicas dos polissacarídeos estão intimamente relacionadas com a sua estrutura tridimensional, principalmente com o tipo de ligação estéreo-química glicosídica do carbono anomérico (α ou β) ou a ligação O-glicosídica da cadeia principal (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003; PELOSI et al., 2003). A enorme variabilidade estrutural dos polissacarídeos lhes proporciona a flexibilidade necessária para atuar nos precisos mecanismos regulatórios das interações intermoleculares no organismo (SHARON; LIS, 1993). Em vista disto, a biomassa do polissacarídeo foi purificada em coluna de Sephacryl S-200 e caracterizada através da Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ANEXOS A, B e C).

As características químicas das moléculas de polissacarídeos afetam os parâmetros físicos e a atividade biológica. Existe uma grande diversidade na massa molecular e configuração dependendo do micro-organismo, das condições de cultivo, como temperatura e umidade, que podem levar a respostas farmacológicas diferentes. A literatura descreve que a presença das estruturas que apresentam fração de polissacarídeos β (1-6), β (1-3) são as principais estruturas que apresentaram ação anticancerígena (MIZUNO et al., 1990). Jong (2002) descreve que a ação imunomoduladora está principalmente relacionada a polissacarídeos ligados à proteína. Esta atividade pode estar relacionada com a maior imunogenicidade das proteínas no sistema imunológico (AUDBERT; LISE, 1993).

Os modelos de experimentação animal são uma das mais importantes ferramentas para se entender o processo da dor, sendo também útil para o desenvolvimento de drogas e terapias para alívio deste importante sintoma associado a várias patologias (CUNHA, 2007). Neste contexto, o efeito

antinociceptivo do poly322 foi avaliado, inicialmente, através do modelo químico de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, em camundongos. Este modelo é uma ferramenta de rastreio, comumente empregada como teste de triagem para avaliar drogas com potencial antinociceptivo (ZAKARIA et al., 2006; FISCHER et al., 2008).

O ácido acético quando administrado por via intraperitoneal induz algesia visceral desencadeada pela liberação de mediadores endógenos tais como a histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e outras substâncias liberadas por mastócitos e macrófagos peritoneais, como as citocinas IL-6 e IL1- β , que induzem de forma indireta o aparecimento de contorções abdominais a partir da sensibilização das terminações sensoriais aferentes periféricas (FISCHER et al., 2008; PARVEEN et al., 2007). Isso faz este modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados mecanismos de ação (PERAZA et al., 2007). Além disso, o ácido acético promove em nível celular, a ativação de canais catiônicos não seletivos, localizados principalmente na pele e vísceras (LAPA et al., 2009), induzindo um comportamento nociceptivo caracterizado pela contorção do abdômen.

O pré-tratamento com o poly322 produziu inibição significativa nas doses de 10mg/kg e 30mg/Kg do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este resultado é similar ao observado na presença de Indometacina (10mg/kg) um anti-inflamatório não esteróide, utilizado como droga de referência. Estudos relatam que apesar do método de contorções abdominais apresentar uma boa sensibilidade, tal método apresenta baixa especificidade (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Assim, um resultado positivo pode acabar deixando margem para uma interpretação errônea dos resultados. O amplo espectro de drogas efetivas neste modelo tornam limitadas as conclusões obtidas através de seus resultados (COLLIER et al., 1968; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008).

O teste da formalina, um modelo químico de nocicepção, foi utilizado para confirmar o efeito antinociceptivo do poly322, já que este proporciona uma

resposta mais específica em comparação ao teste de contorção abdominal. Este modelo apresenta duas fases distintas de nocicepção (HUNSKAAR et al., 1985; DICKENSON; SULLIVAN, 1987; COWAN et al., 1989). Assim, a análise do teste é dividida em duas fases, sendo a primeira caracterizada pela estimulação direta dos neurônios nociceptivos (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A segunda fase é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a prostaglandinas, histamina, serotonina, somatostatina, citocinas e bradicinina (SHIBATA et al., 1989; MALMBERG; YAKSH, 1992).

Os camundongos pré-tratados com o poly322 (30mg/kg) apresentaram antinocicepção apenas na segunda fase do teste de formalina. A Indometacina (10mg/kg), semelhante o poly322, inibiu apenas a fase tardia. Considerando que drogas capazes de reduzir a resposta inflamatória, demonstram atividade na segunda fase desse modelo, pode-se inferir que existe uma possível ação anti-inflamatória.

Com intuito de confirmar a ação antinociceptiva do poly322 foi realizado o modelo de dor inflamatória induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). Este estímulo induz uma resposta inflamatória local na área injetada, bem como em regiões subjacentes. O tratamento com o poly322 inibiu a nocicepção inflamatória nas doses de 30 e 90 mg/kg, após a injeção de CFA, assim como a droga utilizada como referência (morfina 5 mg/kg).

Dados da literatura mostram que a injeção intraplantar de CFA produz hipersensibilidade persistente resultante de uma resposta inflamatória de longa duração que se desenvolve rapidamente, dentro de poucas horas (BATISTA et al., 2010). O CFA atua como estímulo de respostas imunológicas a antígenos, incluindo imunidade celular e aumento da produção local e sistêmica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 levando ao desenvolvimento de uma reação inflamatória intensa (INGLIS et al, 2005). Dessa forma, utilizou-se as doses 10, 30 e 90 mg/kg, para a investigação do efeito do poly322 na hipernocicepção mecânica induzida por CFA, no von Frey eletrônico (MOLLER et al., 1998). O tratamento diário com poly322 induziu antinocicepção da hipernocicepção mecânica induzida por

CFA, que foi mantida durante todo o período do tratamento, evidenciando que o tratamento não causou sinais de tolerância nas doses e tempos avaliados

O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste de retirada da cauda descrito por D'Amour (1941), método este amplamente utilizado para avaliar analgésicos de ação central (ZAKARIA et al., 2006; FISCHER et al., 2008). Útil para identificar drogas de ação central, cujos mecanismos se assemelhem aos promovidos pelos analgésicos opióides (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), uma vez que a morfina administrada sistemicamente é capaz de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda (DOUGLASS; CARSTENS, 1997).

A administração do poly322 não inibiu a nocicepção térmica no teste de imersão da cauda. Em contraste, a morfina (5 mg/kg), um analgésico opióide, utilizado como controle positivo, aumentou significativamente o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico. Esse resultado reforça a hipótese de que o poly322 não induz antinocicepção central.

Outro modelo realizado com o intuito de avaliar a nocicepção térmica foi o teste de placa quente, este por sua vez, reflete principalmente resposta supra-espinhal, enquanto o teste da imersão da cauda reflete a respostas espinhais (LANGERMAN et al., 1995; YAKSH; RUDY, 1977; JINSMAA et al., 2004). Este modelo caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores das fibras C e das fibras A δ . As fibras nociceptoras respondem após a ativação dos receptores vanilóides, especificamente o receptor do tipo TRPV-1 (ativado aos 43°C), sendo os receptores mais importantes na medição da resposta aos estímulos térmicos nocivos (JINSMAA et al., 2004; DICKENSON; BESSON, 1997; JULIUS; BAUSBAUM, 2001). No ensaio da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (MOGIL; ADHIKARI, 1999). Por este motivo este modelo é muito utilizado no estudo de drogas analgésicas, principalmente de drogas que possuem ação no sistema nervoso central, tais como os opióides.

O tratamento com o poly322 (10, 30 e 90 mg/kg) não alterou o tempo de latência no teste de placa quente. A morfina (5 mg/kg), um analgésico opióide, utilizado como controle positivo, aumentou significativamente o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico. Este resultado negativo sugere que a atividade antinociceptiva do poly322 não envolve a participação de mecanismos supra-espinais.

Drogas com ação depressora sobre o sistema nervoso central e muscular podem reduzir a coordenação motora em animais, bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOJA et al., 2002). Considerando que alguns dos métodos escolhidos no presente estudo (contorções abdominais, teste de retirada de cauda, placa quente e formalina) para a avaliação da atividade antinociceptiva, exigem respostas motoras dos animais, resultados falso positivos poderiam ser obtidos, caso ocorresse perda da coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. Para descartar tal possibilidade foi realizado o teste do cilindro giratório e o teste do campo aberto.

O teste do cilindro giratório é um dispositivo que mede a atividade forçada, através da avaliação do equilíbrio e da coordenação dos animais, parâmetros esses indicativos de transtornos neurológicos (ROSLAND *et al.*, 1990). Este procedimento requer que o animal mantenha o equilíbrio sobre um cilindro que se movimenta com uma velocidade de rotação constante (DUNHAM; MIYA, 1957). Esse modelo é bastante utilizado para avaliar déficit motor provocado por disfunções cerebelares, injúrias cerebrais provocadas por trauma ou doenças degenerativas induzidas em animais (HAMM, 1994; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006; SHSIOTSUKI et al., 2010).

O tratamento com o poly322 nas doses utilizadas nos testes nociceptivos, não afetou o desempenho motor dos animais no teste do cilindro giratório. O fármaco utilizado como referência, diazepam (10mg/kg), diminuiu significativamente o tempo de permanência dos animais no cilindro giratório. Assim, pode-se inferir que o tratamento com o poly322 não promove alteração na função motora.

Com o intuito de se excluir a possibilidade da ação antinociceptiva do poly322 estar relacionada a distúrbios não-específicos da atividade locomotora dos animais, foi realizado o modelo do campo aberto. Este método, proposto por Hall (1934), permite verificar se a droga em teste é capaz de promover incoordenação motora e diminuição do comportamento exploratório nos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (DUHAM; MYIA, 1957; GASBARRI et al., 2003). O diazepam, um benzodiazepínico, utilizado neste trabalho como controle positivo, apresenta diversos efeitos farmacológicos como a potencialização da atividade dos neurotransmissores inibitórios do SNC (SKARDA et al., 1997), resultando em incoordenação motora.

Assim, o teste do campo aberto foi realizado para confirmar se a droga estudada apresentava uma ação sedativa ou depressora nos animais tratados. A administração do poly322 nas doses utilizadas, não afetou a atividade locomotora dos animais. O fármaco utilizado como referência, diazepam (10mg/kg), inibiu significativamente a coordenação motora e comportamento exploratório dos animais no modelo de campo aberto.

A suposição de que o poly322 é uma droga analgésica com ação sobre a nocicepção de origem inflamatória, tornou-se mais clara quando foi realizado o teste do edema de pata induzido por carragenina.

Os mediadores inflamatórios envolvidos com a geração do edema de pata induzido por carragenina são capazes de promover inflamação aguda no tecido injetado, provovendo alterações vasculares, acúmulo de líquido e leucócitos nos tecidos extravasculares (SPILLER et al., 2004). Este teste é um importante instrumento para estudar o fenômeno da hiperalgesia e o desencadeamento do processo inflamatório. A inflamação causada pela injeção intraplantar de carragenina envolve a liberação de vários mediadores inflamatórios, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, que estimulam a produção de prostaglandinas desencadeando o aumento da oferta de sangue e acúmulo de leucócitos, resultando em edema (MORRIS, 2003; CUNHA et al., 2005).

O tratamento com o poly322 reduziu significativamente o edema da pata induzido por carragenina na terceira hora após a aplicação da carragenina de maneira dose-dependente.

A investigação da participação de citocinas no desenvolvimento do processo inflamatório é uma ferramenta essencial para o delineamento do mecanismo de ação de drogas com potencial antinociceptivos. As citocinas pró-nociceptivas, participam na cascata inflamatória que ocorre durante a gênese da hipernocicepção mecânica em camundongos. Elas estão envolvidas na modulação de processos nociceptivos, e na capacidade de induzir nocicepção (TADANO et al.,1999; CHOI et al., 2003). Sendo assim, estes mediadores inflamatórios uma vez liberados promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar, com conseqüente redução no limiar de percepção do estímulo doloroso (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Dessa forma, investigou-se a possibilidade da ação antinociceptiva do poly322 estar relacionada com a inibição de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β). O pré-tratamento com o poly322 (90 mg/kg) inibiu significativamente os níveis de IL-6 no tecido plantar. Entretanto, o pré-tratamento com o poly322 (90 mg/kg) não inibiu os níveis de IL-1 β em comparação com o controle negativo. A dexametasona (2mg/kg) inibiu significativamente as duas citocinas estudadas ($p < 0,05$). Esses dados indicam que, possivelmente, a ação antinociceptiva do poly322 estaria relacionada com a inibição da citocina pró-inflamatória IL-6 na hipernocicepção induzida pela carragenina.

Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Macaferri e colaboradores (2012) e Stefanova et al. (2010) onde o extrato da levedura *K. marxianus* inibiu a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em diferentes modelos experimentais.

Estudos demonstram que a citocina IL-6 participa da hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos, realizada através da injeção

intraplantar de IL-6 (CUNHA et al., 1992). Estudos posteriores identificaram que animais com deleção do gene para a produção de IL-6 apresentam redução na hipernocicepção térmica e mecânica em resposta à administração intraplantar de carragenina (XU et al., 1997). Pesquisadores verificaram ainda que a injeção intramuscular de IL-6 induziu hipernocicepção mecânica na dor crônica (DINA et al., 2008).

Em vista do que foi descrito anteriormente, o polissacarídeo extraído da levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta uma promissora atividade antinoceptiva e anti-inflamatória para o desenvolvimento de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. A utilização de polissacarídeos extraídos de fungos e leveduras para fins medicinais é mundialmente reconhecida como um grande avanço para a medicina, tendo grande impacto sobre a saúde humana e a expectativa de vida da população.

6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados no presente estudo nos permitem sugerir que o tratamento com o poly322:

- ▶ Possui atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor inflamatória;
- ▶ Não demonstrou atividade nos modelos de nocicepção térmica;
- ▶ Nas doses terapêuticas não induziram alteração da função motora;
- ▶ Possui ação anti-inflamatória, evidenciada no teste do edema de pata;
- ▶ Diminuiu significativamente os níveis locais da citocina IL-6.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4^a ed. New York, p. 869,1996.
- ALMEIDA, T. P. et al. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. *Veterinária em Foco*, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.
- AMERICAN PAIN FOUNDATION (2014). *Pain*. Disponível em:< <http://www.painfoundation.org/>> Acesso em: 14. set. 2014.
- ANGELOTTI, G. *Tratamento da dor crônica*. In: RANGÉ, B. (Org.) Psicoterapias cognitivo-comportamentais. Porto Alegre: Artmed, p. 535-545, 2008.
- AUDIBERT, F. M.; LISE, L. D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunology Today*, v. 14, p. 281-284, 1993.
- 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.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASBAUM A. I.; JESSELL T. The Perception of Pain. In: Principles of Neuroscience, New York, Appleton and Lange, p. 472–491, 2000.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 67-84. 2009.
- BATISTA, P. A. et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *The Journal of Pain*, v. 11, p.1222-1229, 2010.
- BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of food bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition Journal*, v. 38, p. 565-598, 1998.
- BERGTER, E. B.; FIGUEIREDO, R. T. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 24, n. 2, p. 23-56, 2014.
- BETA GLUCAN RESEARCH. *Review year 2003*: Beta glucan Research Papers, Patents and Patent Applicators. Disponível em: <<http://www.betaglucan.org>>.

Acesso em: 02. mar. 2015.

BONICA, J. J. Evolution and current status of pain programs. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 5, n. 6, p. 368-374, 1990.

BOSE, N. et al. Binding of Soluble Yeast β -Glucan to Human Neutrophils and Monocytes is Complement-Dependent. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. 4, p. 230, 2013.

BRUGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *The Journal of Physiology*, v. 190, n. 3, p. 541-562, 1967.

BUTLER, R. et al. Spontaneous dissection of native coronary arteries. *Heart*, v. 91, n. 22, p. 1-4, 2005.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciências e Cultura*, v. 55, n. 3, 2003.

CAPAZ, F. R. et al. The open-field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, v. 251, n. 1, p. 228-236, 1981.

CARDONE et al. Interleukin-1^o and interferon- γ orchestrate β -glucan-activated human dendritic cell programming via I κ B- ζ modulation. *Plos One*, v. 4, n. 9, 2014.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 48, n. 3, p. 22-239, 1998.

CHOI, S. S. et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. *Life Sciences*, v. 73, n. 4, p. 71-85, 2003.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COSTIGAN, M. et al. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, v. 32, n.1, p. 1-32, 2009.

COWAN, A.; PORRECA, F.; WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluating analgesics, NIDA. *Research Monograph*, v. 95, n. 7, p. 116-122, 1989.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p. 55-60, 2005.

D'AMOUR, F. E. S. A method for determining loss of pain sensation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 72, p. 74-79, 1941.

DEMAIN; A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, v. 62, p. 5-16, 2009.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2th ed., John Wiley, Chichester, 520p, 2002.

DIAS JUNIOR, Q. M; PRADO, W. A.; FERREIRA, S. H. *Conceituando a dor*. Dor OnLine (2004). Disponível em: <www.dol.inf.br/html/EditoriaisAnteriores/Editorial45.pdf>. Acesso em. 01.fev.2015.

DICKENSON, A. H.; SULLIVIAN, A .F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*, v. 30, n. 369, p. 349, 1987.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. *The Pharmacology of Pain*. Handbook of Experimental Pharmacology, Berlin: Springer Verlag, 1997.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience*, v. 152, n. 2, p. 521-525, 2008.

DINARELLO C. A. Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 8, n. 4, p. 253-65, 1997.

DING, J et al. β -Glucan enhances cytotoxic T lymphocyte responses by activation of human monocyte-derived dendritic cells via the PI3K/AKT pathway. *Human Immunology*, v.76, n. 2, p. 146-54, 2015.

DOUGLASS; D. K.; CARSTENS, E. Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. *Journal Neurophysiol*, v. 77, p. 611-620, 1997.

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. 161-74, 1977.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

- FEIN A. *Nociceptores: As células que sentem dor*. PETROV P, FRANCISCHI JN, FERREIRA SH, et al. tradutores. Ribeirão Preto – SP, Dor On Line, 2011. 106 p.
- FERNANDES, B. H. P.; GOMES, C. R. G. Mecanismos e aspectos anatômicos da dor. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 4, n. 2, p. 237-246, 2011.
- FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*, v. 240, n. 102, p. 200-3, 1972.
- FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*, v. 16, n. 1, p. 31-7, 1978.
- FERREIRA, J. SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Journal Pharmacology*, v. 141, n. 5, p. 787-94, 2004.
- FERREIRA, S. H. et al. *Dor Inflamatória*. In: *Dor: princípios e prática*. 1. ed. São Paulo: Artmed, p. 265-279, 2009.
- FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, v. 334, n. 87, p. 698-700, 1998.
- FISCHER, L. G. et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Pliniaglomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 2, p. 235-39, 2008.
- FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, p. 339–354, 2008.
- GASBARRI, A. et al. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neuroscience*, v. 116, n. 4, p. 31-40, 2003.
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. Global Industry Analysts Research Reports. Disponível em: www.marketresearch.com/Global-Industry-Analysts-v1039. Acesso em: 06. 01. 2015.
- GOODRIDGE, H. S. et al. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *Journal Immunology*, v. 182, n. 59, p.1146–1154, 2009.
- GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, v. 281, n. 57, p. 143-154, 1996.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, n. 10, p. 385-403, 1934.

HAMM, R. J. et al. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal Neurotrauma*, v. 11, n. 8, p. 187-196, 1994.

HORI T et al. Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Research Bulletin*, v. 20, n. 5, p. 75–82, 1998.

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

HUME, D. A.; FAIRLIE, D. P. Therapeutic targets in inflammatory disease. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 25, p. 2925-2929, 2005.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin tes in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 5, p. 69-73, 1985.

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

IASP. Classification of chronic pain: descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2. ed. Seattle: IASP Press, 1994.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and b-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochemistry*, v. 29, n. 3, p. 47-54, 1994.

INGLIS, J. J., et al. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, v. 7, n. 4, p. 07-16, 2005.

JENSEN, K. et al. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain*, v. 25, p. 313-323, 1986.

JINSMAA, Y. et al. Oral bioavailability of a new class of micro-opioid receptor agonists containing 3,6-bis[Dmt-NH(CH₂)(n)]-2(1H)-pyrazinone with central-mediated analgesia. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 2, p. 2599-2610, 2004.

JONES, S. L. *Anatomy of pain*. In: SINATRA, R.S.; HORD, A.H; GINSBERG, B; PREBLE, L. *Acute pain: Mecanismos and Management*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992.

JONG, C. S. Fungal cell wall glycans In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes. *Weinheim*, v. 6, n. 10, p. 159-178, 2002.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 9, p. 203-210, 2001.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology*, v. 24, n. 5, p.17–26, 2010.

LANGERMAN, L. et al. Hot plate versus tail flick: evaluation of acute tolerance to continuous morphine infusion in the rat model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 34, n. 1, p. 23–27, 1995.

LAPA, F. R. et al. Antinociceptive properties of the hidroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. *Journal compilation Nordic Pharmacology*, v. 104, n. 5, p. 306-315, 2009.

LAVETI, et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v.12, n. 5, p. 349-61, 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CODDEN, S. W. Animals models of nociception. *Pharmacological. Reviews*, v. 53, n. 652, p. 597, 2001.

LEE K. H. et al. Bacterial β -(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells. *Immunobiology*, v. 219, n. 10, p. 802-12, 2014.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood*, v. 112, n. 7, p. 4971–4980, 2008.

LIU, C. et al. Characterization and antitumor activity of polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydrate polymers*, v. 67, n. 9, p. 313–318, 2007.

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

MACAFERRI, S. et al. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 4, p. 956-964, 2012.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 263, n. 3, p.136-146, 1992.

MELZACK, R.; CASEY, K. L. Sensory, motivational and central control determinants of pain. In: Kenshalo D R (ed). *The skin senses*. Charles C Thomas, Springfield, p. 423–439, 1968.

MERSKEY, H. Psychological aspects of pain. *Postgraduate Medical Journal*, v. 44, n. 5, p. 297-306, 1964.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, v. 57, n. 9, p.1-164, 1999.

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of waterinsoluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural Biologycal Chemistry*, v. 54, n. 11, p. 2897-2905, 1990

MOGIL, J. S.; ADHIKARI, S. M. Hot and cold nociception are genetically correlated. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 13, p. 21-25, 1999.

MOLLER, K. A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal Neuroscience Methods*, v. 84, n. 12, p. 41-47, 1998.

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficit in the 6-OHDA model. *Journal Neuroscience Methods*, v. 158, n. 25, p. 219-223, 2006.

MORRIS, C. J. Carrageenam-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, n. 7, p. 115-121, 2003.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*, v. 135, n. 2, p.145-53. 1987.

NASCIMENTO, D. S. Aplicação de inulinases de leveduras isoladas do semi-árido para a produção de concentrados de fructose. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, p.89, 2010.

NASROLLAHI, W et al. Functionalized nanoscale β -1,3-glucan to improve Her2+ breast cancer therapy: In vitro and in vivo study. *Journal Control Release*, v. 28, n. 202, p. 49-56, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug Discovery. *Natural Product Reports*, v.17, n. 3, p. 215-34, 2000.

NONKLANG, S. et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appliedand Environmental Microbiology*, v. 74, n. 3, p.

7514–7521, 2008.

OKA A. et al. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms and prevention. *Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 1441–1453, 1993.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

PARVEEN, Z. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of Thesiumchinese Turcz Extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 127, n. 8, p. 1275-1279, 2007.

PARZONKO et al. Pro-apoptotic properties of (1,3)(1,4)-d-glucan from *Avena sativa* on human melanoma HTB-140 cells in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, n. 3, p. 757–763, 2015.

PECOTA, D. C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N. A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *Journal Biotechnology*, v. 127, p. 408–416, 2007.

PELOSI, L. et al. Structural and morphological diversity of (1→3)-β-D-glucans synthesized in vitro by enzymes from *Saprolegniamonoïca*: comparison with a corresponding in vitro product from blackberry (*Rubusfruticosus*). *Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 6274-6274, 2003.

PERAZA, G. G. et al. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos de origem natural. *Vittalle*, v. 1, n. 19, p. 35–44, 2007.

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 57, p. 94-105, 2007.

ROCHA, M. V. P. et al. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

ROSLAND, J. H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, v. 42, n. 12, p. 235-242, 1990.

RUTHES, A. C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, n. 9, p.761– 769, 2013.

SANT'ANA, P. J. P. Bioprospecção no Brasil: Contribuição para uma gestão ética. Brasília: Paralelo, 15ª ed., 2002.

SBDE, Sociedade Brasileira para estudos da dor. Disponível em: <<http://www.dor.org.br>> Acesso em: 01.fev. 2015.

SCHMID, F. et al. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3; 1→6) -β-glucan from the micro fungus *Epicoccumnigrum* Ehrenb. ex Schlecht. *Carbohydrate Research*, v. 22, n. 331, p. 163-71, 2001.

SHAH V. B; WILLIAMS D. L; KESHVARA L. Beta-Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia. *Neurosci Lett.* v. 24; 4 n. 3. p 1-5, 2009.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, v. 268, n. 1, p. 82-89, 1993.

SCHWARTZ, H. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer. *Annals of Translational Medicine*, v. 2, n. 2, p.1-9, 2014.

SHIBATA, M. T. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SHIOTSUKI et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 189, p. 180-185, 2010.

SILVA; C. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química nova*, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SKARDA, R. T. et al. Anestesia local en bovinos, ovejas, cabras y cerdos In: *Manual de Anestesia Veterinaria*. 2ª ed. Madrid, España. p. 53-77.1997.

SMEEKENS P. et al. An anti-inflammatory property of *Candida albicans* β-glucan: Induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a Dectin-1/CR3 independent mechanism. *Cytokine*, v. 71, n. 2, p. 215–222, 2014.

SOJA. P. C. et al. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral anti nociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *European Journal of Pharmacology*, v. 400, p. 67-71, 2000.

SPENCER, P. S. J; SEWELL, R. D. E. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail immersion test in mice and rats. *Neuropharmacology*, v. 15, p. 683-688,1976.

SPILLER, R. C. et al. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Practice and Research Gastroenterology*, v. 18, n. 4, p. 641-661, 2004.

STEFANOVA, T. H. et al. Effect of yeast superoxide dismutase treatment on some mediators of inflammation during adjuvant-induced arthritis in mice.

Zeitschrift für Naturforschung, v. 65, n. 2, p. 1-7, 2010.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M. et al. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesthesia & Analgesia*, v. 106, p. 1897-1903, 2008.

SPILLER, R. C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Practice and Research Gastroenterology*, vol. 18, n. 4, p. 641-661, 2004.

SUEHIRO, R. M. et al. Terapia com agentes biológicos na criança e no adolescente. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 28, n. 2, p. 227-36, 2010.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of bacterial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 41-46, 1998.

TADANO, T. et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sciences*, v. 65, n. 3, p. 55-61, 1999.

VALASQUE JUNIOR G. L. et al. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3) β -d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, p. 293-299, 2014.

VERRI et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 116-38, 2006.

VETVICKA et al. Clinical trials of yeast-derived β -(1,3) glucan in children: effects on innate immunity. *Annals of Translational Medicine*, v. 2, n. 2, p. 15, 2014.

VETVICKA et al. Placebo-driven clinical trials of yeast-derived β -(1-3) glucan in children with chronic respiratory problems. *Annals of Translational Medicine*, v. 1, n. 3, p. 26, 2013.

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

WALDMANN, R.; LAZDUNSK, M. H⁺ gated cation channels : Neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 8, p. 481-424, 1998.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: Kavanagh K (ed.) *Fungi: Biology and Applications*, v. 2, p. 1-34, 2005.

WANG et al., β -Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular*, v. 24, n. 3, p. 248-55, 2013.

WECK, M. M. et al. Dectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. *Blood*, v. 111, p. 4264–4272, 2008.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. L. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 80, p. 300-7, 1944.

XU, X. J. et al. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. *Cytokine*. v. 9, p. 1028–1033, 1997.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on direct spinal action of narcotic in the production of analgesia in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 202, p. 411-428, 1977.

YANASE S. et al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 88, n. 1, p. 381–388, 2010.

YOSHITOMI et al. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 6, p. 949-960, 2005.

ZAKARIA, Z. A. et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. *Yakugaku Zasshi*, v. 126, p. 1197-1203, 2006.

ZHANG, L. et al. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1541-1545, 2005.

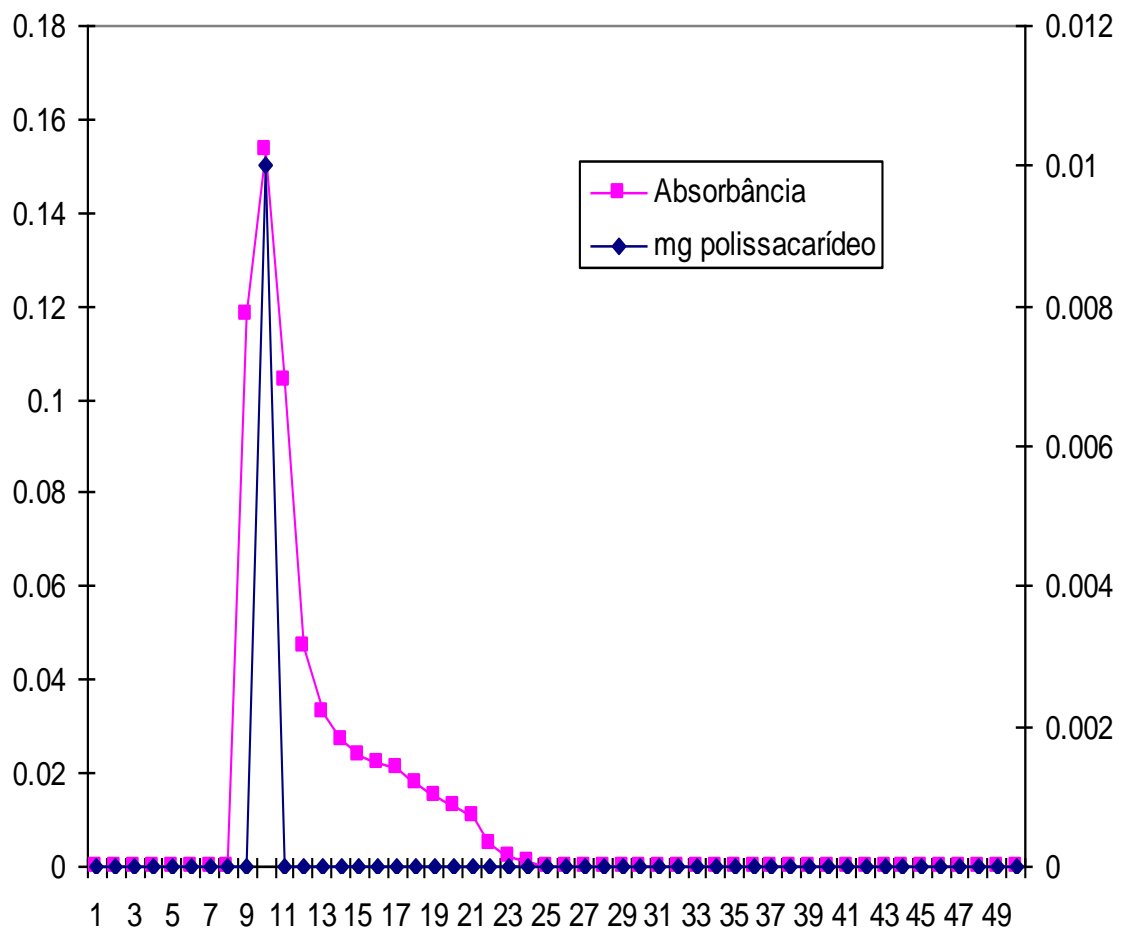
ZHU K. et al. β -Glucan modulates the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat mammary epithelial cells. *International Immunopharmacology*, v. 15, n. 2, p. 457-65, 2013.

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

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, v. 23, n. 5, p. 575-579, 2004.

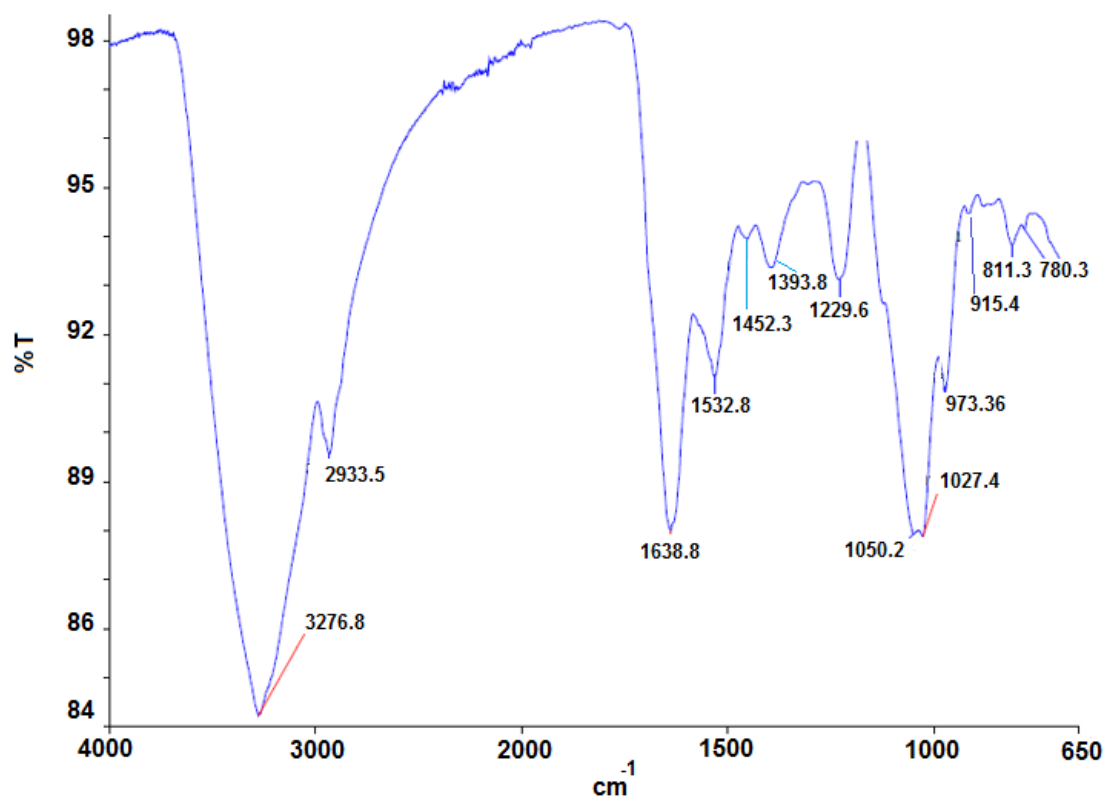
ANEXO A- PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO



Eluição da amostra em coluna de Sephacryl S-200, equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 7,0. O fluxo da coluna foi 0,5mL/min e foram coletadas frações de 2,5ml.

Fonte: Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN).

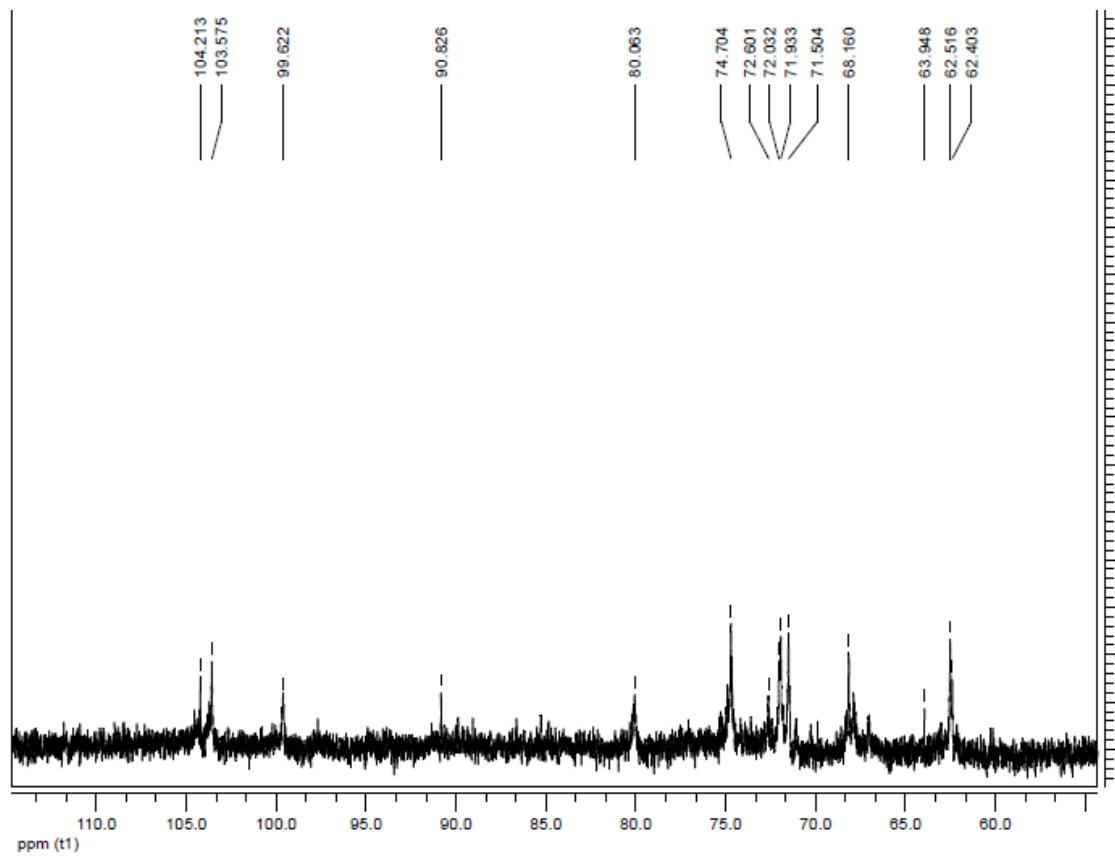
ANEXO B- ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IV)



FT-IR espectro do polissacarídeo produzido a partir da *K. marxianus* CCMB 322.

Fonte: Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN).

ANEXO C- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)



¹³CNMR espectro do polissacarídeo extraída da *K. marxianus* (CCMB 322).
Fonte: Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN).