



LÍLIAN WÜNSCH ROCHA

MECANISMO DE AÇÃO ANALGÉSICA DA MANGIFERINA

CAMPINAS

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

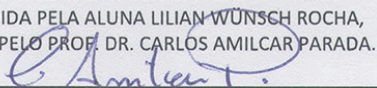
LÍLIAN WÜNSCH ROCHA

MECANISMO DE AÇÃO ANALGÉSICA DA MANGIFERINA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Carlos Amílcar Parada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LÍLIAN WÜNSCH ROCHA,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. CARLOS AMILCAR PARADA.



Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R582m Rocha, Lillian Wünsch, 1985-
Mecanismo de ação analgésica da Mangiferina / Lillian Wünsch Rocha. –
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mangiferina. 2. *Mangifera indica*. 3. Citocinas. 4. Neutrófilos. I. Parada,
Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mecanismo de ação analgésica da Mangiferina

Palavras-chave em inglês:

Mangiferin

Mangifera indica

Cytokines

Neutrophils

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Maria Martha Campos

Clélia Akiko Hiruma

Cesar Renato Sartori

Jozi Godoy Figueiredo

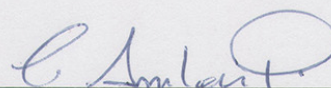
Data de defesa: 29-04-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de abril de 2015

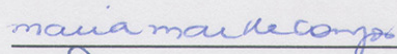
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada (Orientador)



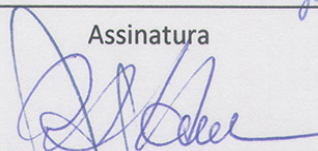
Assinatura

Profa. Dra. Maria Martha Campos



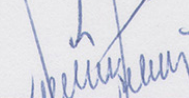
Assinatura

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma



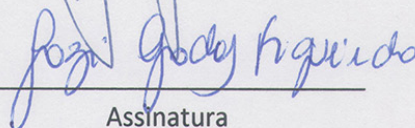
Assinatura

Prof. Dr. Cesar Renato Sartori



Assinatura

Profa. Dra. Jozi Godoy Figueiredo



Assinatura

Profa. Dra. Kathryn Ana Bortolini Simão da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes



Assinatura

Dr. André Schwambach Vieira



Assinatura

RESUMO

Vimang® é um medicamento fitoterápico constituído pelo extrato aquoso da planta *Mangifera indica* L. Este medicamento é utilizado em Cuba para o tratamento de estresse e de doenças imunopatológicas, pois possui propriedade antioxidante reconhecida. O componente majoritário deste extrato é a mangiferina (cerca de 7%) e dados da literatura apontam que ambos, extrato e mangiferina, possuem atividade antinociceptiva. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial anti-hiperalgésico da mangiferina no tecido periférico e investigar seu possível mecanismo de ação em ratos. Para isso foram utilizados modelos de hiperalgesia inflamatória, tais como: hiperalgesia induzida pela carragenina (100 µg/pata), epinefrina (1 µg/pata) e pelos mediadores inflamatórios PGE₂ (100 ng/pata), IL-1β (0,5 pg/pata) e CINC-1 (1 pg/pata). A hiperalgesia também foi induzida por α,β-meATP (agonista de receptor P2X3)(50 µg/pata) e 8-Br-cAMP (ativador de PKA) (0,01 µg/pata). A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada através de Von Frey eletrônico. O modelo de nocicepção aguda induzido pela capsaicina (0,5 µg/pata) também foi realizado. Para complementar os experimentos comportamentais, foi realizada a dosagem de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e CINC-1, a avaliação da migração de neutrófilos através da dosagem de mieloperoxidase, Western Blotting para COX-1 e COX-2 e ainda o teste de *calcium imaging* para verificar a possível interferência da mangiferina em receptores purinérgicos. Em todos os testes moleculares, a inflamação foi induzida pela carragenina e o tecido plantar da pata traseira dos ratos foi coletado 3 horas após a injeção intraplantar. Em todos os experimentos em que houve pré-tratamento com mangiferina, o mesmo foi realizado através de administração local, intraplantar. Para verificar a participação dos receptores purinérgicos no mecanismo de ação da mangiferina, no teste de *calcium imaging*, o influxo de cálcio *in vitro* foi induzido por α,β-meATP. Os resultados demonstram que a mangiferina nas doses de 300, 600 e 1200 µg/pata reduziu a hiperalgesia induzida pela carragenina de forma dose-dependente e sem apresentar efeito sistêmico, o qual foi avaliado através do limiar na pata contralateral. Para os demais experimentos foi utilizada a dose submáxima de 600 µg/pata. A hiperalgesia mecânica induzida por epinefrina, IL-1β e CINC-1, mas não por PGE₂, foi prevenida pela administração local de mangiferina. Também foi observado efeito da mangiferina reduzindo a nocicepção induzida pela capsaicina. No teste de ELISA, o pré-tratamento com mangiferina foi capaz de reduzir a concentração local da citocina TNF-α e da quimiocina CINC-1 induzida pela carragenina; porém, os níveis de IL-1β mantiveram-se inalterados. A migração de neutrófilos também foi avaliada e o tratamento local com mangiferina reduziu a migração de neutrófilos induzida pela carragenina para o tecido plantar. Os resultados obtidos através da dosagem das proteínas COX-1 e COX-2 por Western Blotting demonstraram que o tratamento local com mangiferina não altera a expressão destas proteínas. Na avaliação *in vitro* da atividade da mangiferina em inibir o influxo de cálcio induzido pelo α,β-meATP não houveram resultados positivos, ou seja, a mangiferina não causou dessensibilização nos neurônios. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a mangiferina possui atividade anti-hiperalgésica e possivelmente esta ação esteja relacionada com a sua habilidade em reduzir citocinas que são essenciais para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória.

Palavras-chave: Mangiferina, hiperalgesia inflamatória, Vimang®, citocinas pró-inflamatórias, neutrófilos.

ABSTRACT

Vimang® is an herbal medicine constituted by the aqueous extract of *Mangifera indica* L plant. It is used in Cuba for the treatment of stress and immunopathological diseases because it has recognized antioxidant properties. The major component of this extract is mangiferin (about 7%) and literature data indicates that both, extract and mangiferin, have antinociceptive activity. The aim of this study was to evaluate the antihyperalgesic potential of mangiferin in peripheral tissue and investigate its possible mechanism of action in rats. Were used inflammatory hyperalgesia models such as carrageenan-induced hyperalgesia (100 µg/paw), epinephrine (1 µg/paw) and the inflammatory mediators PGE₂ (100 ng/paw), IL-1β (0.5 pg/ paw) and CINC-1 (1 pg/paw). Hyperalgesia was also induced by α,β-meATP (P₂X₃ receptor agonist) (50 µg/paw) and 8-Br-cAMP (PKA activator) (0.01 µg/paw). The evaluation of mechanical hyperalgesia was performed using Electronic Von Frey. The acute model of nociception induced by capsaicin (0.5 µg/paw) was also performed. In addition to the behavioral experiments, the dosage of pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α and CINC-1 was performed, evaluation of the migration of neutrophils through the myeloperoxidase dosage, Western Blotting for COX-1 and COX-2, and the calcium imaging test to check possible interference of mangiferin in purinergic receptors. In all molecular tests, inflammation was induced by carrageenan and the plantar tissue of the hind paw of the rats was collected 3 hours after intraplantar injection. In all experiments in which there was pretreatment with mangiferin, it was conducted by local administration, intraplantar. To verify the involvement of the purinergic receptors in the mangiferin mechanism of action, using calcium imaging test, in vitro calcium influx was induced by α, β-meATP. The results demonstrate that mangiferin at doses of 300, 600 and 1200 µg/paw reduced carrageenan-induced hyperalgesia in a dose-dependent manner and without providing systemic effect, which was evaluated through the threshold of the contralateral paw. For other experiments the submaximal dose of 600 µg/paw was used. Mechanical hyperalgesia induced by epinephrine, IL-1β and CINC-1, but not by PGE₂, was prevented by local administration of mangiferin. It was also observed mangiferin effect of reducing the capsaicin-induced nociception. In the ELISA test, the mangiferin pretreatment reduced the local concentration of the cytokine TNF-α and chemokine CINC-1, however, IL-1β levels were unchanged. The neutrophil migration was also assessed and local treatment with mangiferin reduced neutrophil migration induced by carrageenan into the plantar tissue. The results obtained with the COX-1 and COX-2 proteins dosage by Western Blotting demonstrated that local treatment with mangiferin did not alter the expression of these proteins. In vitro evaluation of the activity of mangiferin in inhibiting calcium influx induced by α, β-meATP there were no positive results, mangiferin did not cause desensitization in neurons. Taken together, the results show that mangiferin has anti-hyperalgesic activity and possibly this action is related to its ability to reduce cytokines that are essential to the development of inflammatory hyperalgesia.

Keywords: Mangiferin, inflammatory hyperalgesia, Vimang®, cytokines, neutrophils.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
1 Introdução	1
2. Objetivo Geral	10
3 Materiais e Métodos	12
4 Resultados	19
5 Discussão	28
6 Conclusão	35
7 Referências Bibliográficas	36
ANEXO 1	44

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

A Profa. Dra. Nara Lins Meira Quintão pela indicação para o curso e pelas contribuições ao artigo científico e à tese.

A Profa. Dra. Kathryn Ana Bortolini Simão da Silva por estar sempre disposta a ajudar, sem dúvidas seu apoio foi imprescindível.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro.

A minha mãe pelo apoio e incentivo e ao meu namorado Juliano Gutheil pela paciência, amor e carinho.

A minha querida amiga Juliana Maia Teixeira, que esteve sempre pronta a ajudar, desde a seleção do doutorado até a elaboração do artigo.

Ao colega de laboratório Ivan Bonet, pela colaboração nos experimentos de Western Blotting e pela atenção desprendida.

A colega Elayne pela paciência em ouvir e pela contribuição no artigo científico.

Aos amigos do laboratório Juliana, Cesar, Kiko, Elayne, Lilian, Maria, Gilson, Ivan, Luis, Jalile, Amanda e Catarine pelos bons momentos compartilhados.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho.

A esta Universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a construção de novos conhecimentos.

A todas as pessoas que participaram e contribuíram para realização de nosso trabalho, direta ou indiretamente.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de transmissão e percepção do processo doloroso..	3
Figura 2: Estrutura Molecular da Mangiferina.	8
Figura 3: Hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em ratos..	19
Figura 4: Hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂ em ratos..	20
Figura 5: Hiperalgesia mecânica induzida por IL-1β e CINC-1.....	21
Figura 6: Hiperalgesia mecânica induzida pela epinefrina.	22
Figura 7: Hiperalgesia mecânica induzida por α,β-meATP.	22
Figura 8: Hiperalgesia mecânica induzida por 8-Br-cAMP.....	23
Figura 9: Dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias..	24
Figura 10: Quantificação de mieloperoxidase (MPO).	25
Figura 11: Nocicepção induzida pela capsaicina.	26
Figura 12: Expressão das proteínas COX-1 e COX-2 no tecido plantar de ratos.	26
Figura 13: Efeito da mangiferina sobre o influxo de cálcio mediado por α,β-meATP em neurônios do DRG.....	27

Lista de Abreviaturas

AINES- Antiinflamatório não esteroideal

ANOVA- Análise de variância

ATP- Trifosfato de adenosina

cAMP- Monofosfato de Adenosina Cíclico

CINC-1- Citocina quimioatraente para neutrófilos 1

COX-1- Ciclooxygenase 1

COX-2- Ciclooxygenase 2

DI₅₀- Dose que inibiu 50% da resposta

DMEM- Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO- Dimetilssulfóxido

DRG- Gânglio da raiz dorsal

EPM- Erro padrão da média

ERK- Proteína quinase regulada por sinal extracelular

FDA- *Food and Drug Administration*

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular 1

IASP- Associação Internacional para o Estudo da Dor

IFN- γ – Interferon gamma

IL- Interleucina

i.pl.- Intraplantar

LPS- Lipopolissacarídeo

MPO- Mieloperoxidase

NF- κ B- Fator Nuclear κ B

NO- Óxido nítrico

P₂X₃- Receptor purinérgico tipo P₂X₃

PBS- Tampão Fosfato Salino

PCL – Pata contralateral

PGE₂- Prostaglandina E₂

PKA- Proteína quinase A

PKC- Proteína quinase C

PMA- Acetato miristato de forbol

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRPV1- Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1

8-BR-cAMP- do inglês “8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate”

α,β -meATP- do inglês “alpha,beta-methylene ATP”

1 Introdução

A dor é uma experiência vivenciada por quase todos os seres humanos, pois constitui um instrumento de proteção essencial à sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. A dor pode ser considerada uma experiência sensorial e emocional que é substancialmente modulada por fatores psicológicos, sociais e contextuais. Diferentes abordagens e modelos experimentais, tanto no laboratório quanto na clínica, têm sido utilizados para melhor compreender os mecanismos envolvidos no processo doloroso (Carlino et al., 2014) a fim de encontrar novos alvos farmacológicos para o controle da dor.

O processo doloroso pode ser caracterizado como uma experiência complexa de percepção, que envolve tanto eventos centrais quanto periféricos e que pode ser modulado a diversos níveis. Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma sensação ou experiência emocional desagradável, associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal dano” (Loeser & Treede, 2008; Moffat & Rae, 2011).

Fisiologicamente, a dor tem a sua origem na ativação de neurônios sensoriais nociceptivos específicos por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos nocivos, e na tradução destes estímulos em impulsos nervosos que se propagam e geram a sensação de dor no sistema nervoso central (D’Mello & Dickenson, 2008; Fischer & McNaughton, 2014). A dor nociceptiva, também conhecida como fisiológica, não é considerada um problema clínico, mas desempenha um importante papel em manter a integridade do organismo. Contudo, a incapacidade de perceber a dor nociceptiva, pode resultar em auto-mutilações, fraturas ósseas, amputações, cicatrizes múltiplas e até em morte prematura (Woolf, 2010). As células responsáveis por codificar estímulos potencialmente nocivos são os neurônios nociceptivos localizados no SNP. Diferentes estímulos podem ativar os nociceptores, que são terminações nervosas periféricas dos neurônios nociceptivos e agem como um receptor sensorial, os quais estão localizados por todo o corpo, innervando a pele,

músculos, articulações e órgãos internos (Julius & Basbaum, 2001; Loeser & Treede, 2008; Dubin & Patapoutian, 2010).

Conforme demonstrado na figura 1, as vias de condução da informação nociceptiva são compostas por conjuntos de neurônios periféricos (neurônios de primeira ordem) e de neurônios medulares (neurônios de segunda ordem). As terminações periféricas sensoriais livres são responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários localizados na coluna posterior da substância cinzenta da medula espinhal (Huang et al., 2006). Em seguida, ocorre a transmissão direta dos estímulos, os quais ascendem pelo trato espinotalâmico lateral ou através do trato espinoparabraquial até o tálamo medial e sistema límbico (Kuner, 2010; Moffat & Rae, 2011). O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias nociceptivas, sendo que o tálamo é um dos responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva. Já o córtex é o responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por indicar de onde provém o estímulo (Woolf, 2000).

A transmissão do impulso nervoso ocorre através da ativação de três tipos distintos de fibras sensoriais, classificadas de acordo com a velocidade de condução do estímulo e do papel na transdução de informações: fibras de pequeno diâmetro, amielinizadas e com velocidade de condução de 2 m/s (fibras C); fibras de médio diâmetro, discretamente mielinizadas e com velocidade de condução de 25 a 50 m/s (fibras A- δ); ou fibras de grande diâmetro, intensamente mielinizadas e com elevada velocidade de condução (fibras A- α e A- β), responsáveis principalmente pela informação proprioceptiva (toque e pressão) (Julius & Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009; Teixeira, 2009).

A excitabilidade dos neurônios é controlada por condutâncias iônicas através da membrana plasmática e os canais iônicos são presumivelmente os alvos finais de vias de sinalização intracelulares, as quais são mediadas pela ativação das proteínas quinase A (PKA) e proteínas quinase C (PKC) que levam à sensibilização dos neurônios aferentes primários (Sachs et al., 2009).

Os canais de potássio (K^+) e de sódio (Na^+) presentes nas membranas celulares são os principais responsáveis pela atividade elétrica que conduz a informação neuronal (Waxman, 2010) e portanto, os principais candidatos a estarem envolvidos na sensibilização dos nociceptores.

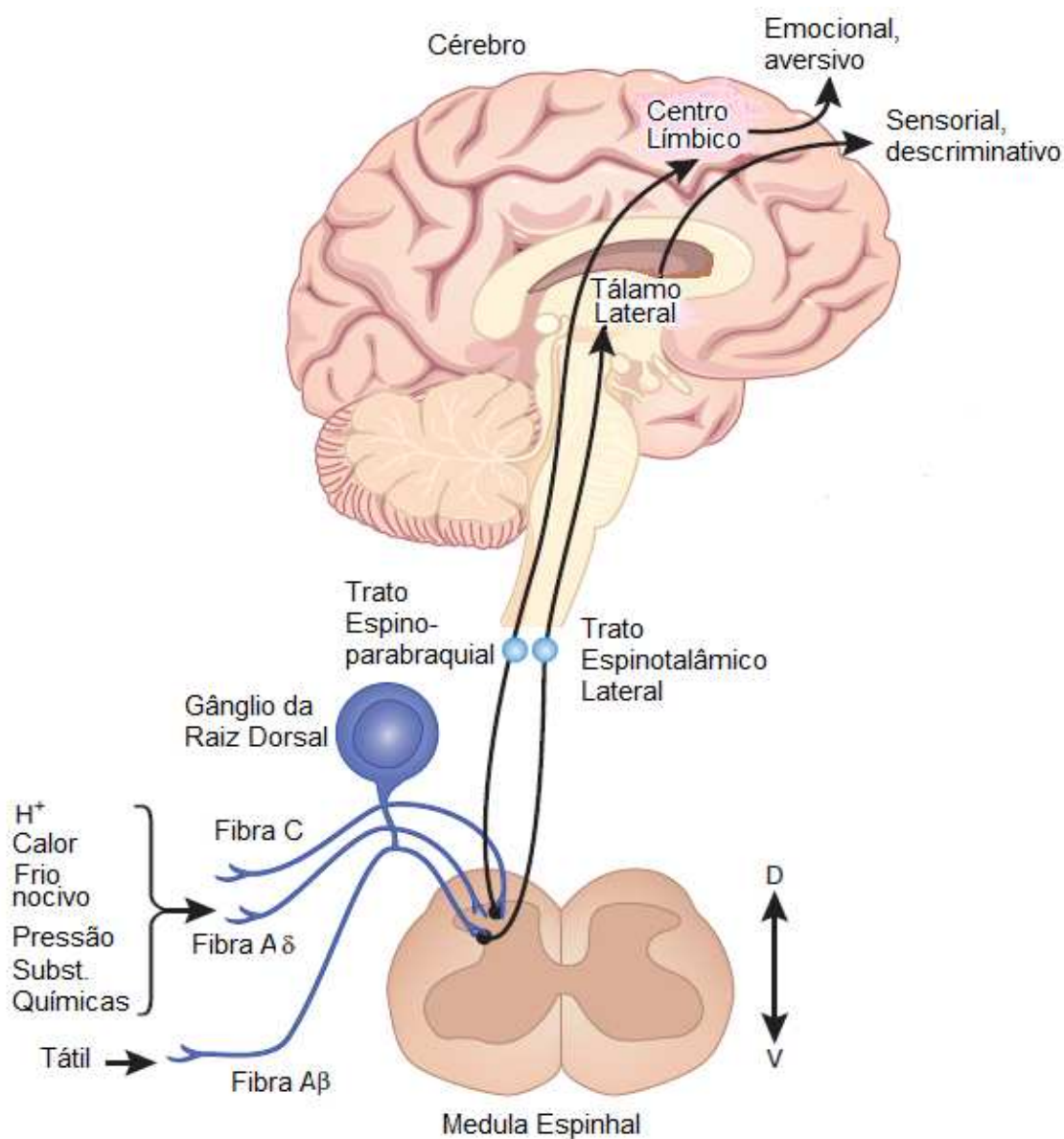


Figura 1 Representação esquemática do mecanismo de transmissão e percepção do processo doloroso. Estímulos nocivos são percebidos pelas fibras sensoriais e enviados para coluna dorsal da medula espinhal, de onde ascendem para o tálamo e córtex, onde serão reconhecidos como estímulo doloroso. Fonte: Adaptado de Kuner, 2010.

A hiperalgesia, foco de interesse no presente trabalho, é resultado da excitação de nociceptores previamente sensibilizados. A sensibilização dos nociceptores é caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal de modo a haver facilitação da estimulação dessas vias nociceptivas (Ali et al, 1996; Riedel & Neeck, 2001). A hiperalgesia é um fenômeno neuronal que tem origem na ativação de receptores metabotrópicos dos nociceptores por mediadores inflamatórios, resultando na ativação de vias de sinalização intracelulares, cuja consequência efetora final é a fosforilação ou mesmo o aumento da expressão de canais iônicos nos nociceptores (Lewin et al., 2004).

A função de um nociceptor pode ser substancialmente modificada em resposta a um dano tecidual, inflamação ou lesão nervosa. A excitabilidade, a transmissão e o limiar de um nociceptor podem ser alterados promovendo hipersensibilidade e dor espontânea. Estas mudanças tanto podem ocorrer nos terminais periféricos e no local da lesão axonal, quanto nas propriedades da membrana. Algumas destas modificações são rápidas, entretanto outras necessitam de transporte retrógrado ao corpo celular, ativação de cascatas de transdução de sinal, mudanças na transcrição, além do transporte de proteínas. Entretanto, os nociceptores não são os únicos gatilhos da dor; fibras sensoriais de baixo limiar, que somente produzem sensações inócuas como leve toque, começam então a produzir impulsos que serão convertidos em dor, uma mudança substancial na especificidade funcional do sistema nervoso (Scholz & Woolf, 2002).

Mediadores inflamatórios tais como bradicinina, prostaglandinas, interleucinas, ATP e fatores de crescimento são capazes de sensibilizar nociceptores periféricos, desenvolvendo a hiperalgesia inflamatória. Esses mediadores agem direta ou indiretamente em receptores de membrana das fibras C, ativando proteínas intracelulares como adenosina 3',5'-monofosfato AMP cíclico (AMPC), proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), dentre outras (Karczewski et al., 2010).

Um mecanismo comum à hiperalgesia inflamatória é a sensibilização dos nociceptores, devido à liberação de eicosanóides e aminas simpatomiméticas, as quais sensibilizam diretamente os nociceptores, sendo, por isso, chamados mediadores hiperalgésicos finais. A administração subcutânea de agentes inflamatórios como a carragenina induz a liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (Ferreira et al., 1993). Tem sido demonstrado que além dos mediadores hiperalgésicos finais, citocinas tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8) participam direta ou indiretamente do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória (Oliveira et al., 2009). O ATP também é considerado um mediador importante, liberado após a administração de carragenina. Ele ativa receptores purinérgicos P2X, que são canais iônicos cuja ativação induz despolarização da membrana celular (Dubyak and el-Moatassim, 1993, Valera et al., 1994). Os receptores purinérgicos do tipo P₂X₃ estão predominantemente localizados nos terminais sensoriais aferentes periféricos e centrais de fibras C amielínicas e de fibras A δ mielínicas, onde medeiam a neurotransmissão sensorial (Gever et al., 2006).

Experimentalmente, a administração de carragenina no tecido periférico de ratos e camundongos induz uma hiperalgesia de intensidade média que perdura por até 24 horas após a sua administração (Cunha et al., 2005). A carragenina é uma ferramenta experimental muito utilizada, pois induz a síntese e liberação endógena de prostaglandinas aproximando assim de um modelo de hiperalgesia inflamatória sensível à ação dos antiinflamatórios não esteroidais, tal como o processo inflamatório que ocorre normalmente em humanos (Ferreira et al., 1974). Neste processo, a carragenina promove hiperalgesia por dois componentes distintos, um envolvendo a liberação de prostaglandinas e outro de aminas simpatomiméticas. A sensibilização destes dois componentes no tecido periférico se soma igualmente, resultando na hiperalgesia inflamatória (Lorenzetti et al., 2002). A hiperalgesia induzida por carragenina envolve a liberação prévia de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-1 β e de quimiocinas como a IL-8 (Oliveira et al., 2009; Cunha et al., 2005).

Considerando-se a multiplicidade de mecanismos, conhecidos e desconhecidos, envolvidos no processo doloroso, a ocorrência na literatura de muitos compostos que possam direta ou indiretamente modular sua transmissão não é surpreendente. Entretanto, poucos tornam-se de interesse clínico. De 1960 até o ano de 2009, 59 novos fármacos para o tratamento da dor foram desenvolvidos, sendo que 39 deles foram especificamente desenvolvidos como analgésicos e os 20 restantes para outras patologias, porém a eficácia para o tratamento da dor foi mais tarde comprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Embora tenha havido uma melhora no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo doloroso, o sucesso no desenvolvimento de novos fármacos infelizmente ainda é limitado e se torna uma necessidade (Kissin, 2010).

Mangiferina como uma nova molécula de ação anti-hiperalgésica

A utilização de plantas para o tratamento das mais diversas patologias é bastante antiga e aproximadamente 80% da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos, utilizam as plantas como primeira opção medicamentosa (Núñez-Sélles, 2007).

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma espécie frutífera, dicotiledônea, da família Anacardiaceae e originária da Índia. A partir deste local, essa espécie difundiu-se para muitas regiões tropicais (Cardoso et al., 2007). A *Mangifera indica* L. apresenta uma mistura de componentes químicos bioativos que inclui polifenóis (principalmente mangiferina), triterpenos, fitoesteróis, ácidos graxos e microelementos (Núñez-Sellés et al., 2007). A partir do extrato das cascas de *Mangifera indica* L. foi produzido o fitoterápico Vimang®, que é utilizado em Cuba como suplemento nutricional antioxidante (Pardo-Andreu et al., 2006b) para melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofrem de estresse elevado (Garrido et al. 2001). Tem sido também utilizado no tratamento de algumas doenças imunopatológicas como asma brônquica, dermatite atópica e outras doenças alérgicas (Rivera et al., 2006). A eficácia do extrato de *Mangifera indica* L. já foi demonstrada *in vitro* e em triagens pré-clínicas, apresentando atividade anti-inflamatória

(Márquez et al. 2010, Rivera et al., 2011), antioxidante (Martínez et al., 2000; Pardo-Andreu et al., 2006a) and hepatoprotetora (Pardo-Andreu et al., 2008). Também o extrato aquoso *Mangifera indica* demonstrou atividade antinociceptiva quando administrado sistemicamente em ratos e camundongos diminuindo a nocicepção aguda em diferentes modelos de dor induzida por: ácido acético (Garrido et al, 2001; Ojewole, 2005; Khan & Islam, 2012), formalina (Garrido et al, 2001) e placa quente (Ojewole et al., 2005; Olorunfemi et al., 2012).

Estudos clínicos para avaliar a atividade analgésica do Vimang® também já foram realizados. Pacientes com síndrome da dor do complexo regional fizeram uso do medicamento e além de reduzir a dor, outras anormalidades sensoriais foram significativamente reduzidas de 2-3 semanas após o início do tratamento (Garrido-Suárez et al., 2009). Pacientes com osteoartrite de joelho também utilizaram Vimang® e a analgesia foi alcançada por todos os pacientes (10) de 15-21 dias até 3 meses após o início do tratamento (Valverde et al., 2009).

O principal componente do fitoterápico Vimang® é a mangiferina (aproximadamente 7% do total e 41% do peso seco dos componentes fenólicos), a qual é considerada o principal componente bioativo (Sellés et al. 2002). A mangiferina é uma xantona glicosilada, com fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_{11}$ (Fig. 2), encontrada em uma grande variedade de famílias de plantas (Vyas et al., 2012). Na mangueira (*Mangifera indica* L.), a mangiferina pode ser encontrada nas folhas, caule, frutos e raízes (Richardson, 1983). O crescente interesse da comunidade científica nesta molécula está relacionado ao extensivo potencial farmacológico que vêm sendo demonstrado através de estudos *in vitro* e *in vivo*, como: atividade neuroprotetora (Sánchez et al., 2000; Gottlieb et al., 2006; Amazzal et al., 2007), hepatoprotetora (Yoshikawa et al., 2002), antioxidante (Rodríguez et al., 2006; Leiro et al., 2003; Stoilova, Jirovetz, Stoyanova, 2008), anti-inflamatória (Bhatia et al., 2008; Márquez et al., 2012), imunomodulatória (Muruganandan et al., 2005), entre outras.

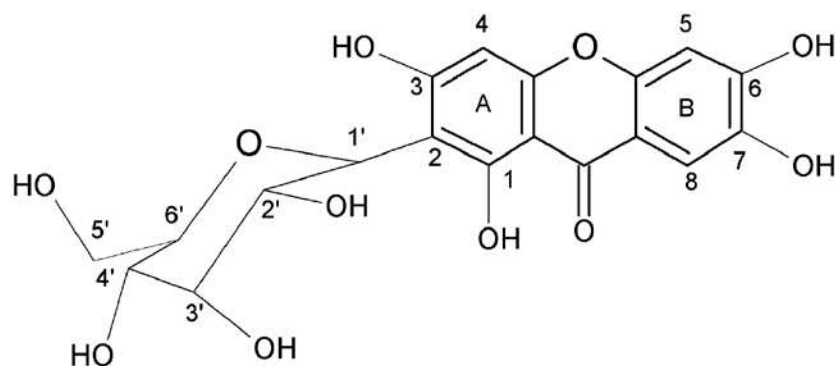


Figura 2: Estrutura Molecular da Mangiferina. Fonte: Freitas et al., 2012.

Bertolini e colaboradores (2007) avaliaram o potencial antioxidante da mangiferina em proteger proteínas da perda de atividade causada por espécies reativas de oxigênio. Para isso utilizaram um modelo de fosfatase alcalina e obtiveram resultados positivos para mangiferina. Recentemente foi demonstrado também o efeito citoprotetor da mangiferina contra a neurotoxicidade de células mesencefálicas de ratos e este efeito foi relacionado à sua capacidade de eliminar radicais livres que contribuem para o estresse oxidativo (Rao et al., 2012).

Em relação à atividade antiinflamatória, a mangiferina mostrou ser capaz de limitar a ativação microglial por atenuar a produção de PGE_2 , a formação de radicais livres e por reduzir a síntese de COX-2 induzida por LPS em ratos (Bhatia et al., 2008). A mangiferina também reduziu TNF- α sistêmico e em cultura de macrófagos murinos (células RAW 264.7) após estímulo com LPS e IFN- γ , além de reduzir óxido nítrico (Garrido et al., 2004b).

Vários estudos têm demonstrado a atividade analgésica da mangiferina quando administrada sistemicamente em diferentes testes de nocicepção aguda (Dar et al., 2005; Izquierdo et al, 2013; Lopes et al, 2013, Garrido-Suárez et al, 2014b) e também em modelos de dor persistente (Garrido-Suárez et al., 2014a). Estes estudos sugerem que a ação da mangiferina pode estar relacionada com opioides endógenos.

Em uma perspectiva farmacológica, a demonstração do efeito anti-hiperalgésico da mangiferina por uma metodologia sistematizada e a elucidação do seu mecanismo de ação, podem despertar o interesse do uso desta molécula para fins terapêuticos no controle da dor, sobretudo de origem inflamatória. Por se tratar de uma molécula majoritária de resíduos (casca e folhas) de uma planta tipicamente encontrada no Brasil, o interesse torna-se ainda maior.

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação analgésica da mangiferina administrada no tecido periférico em modelos de hiperalgesia inflamatória em ratos.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia inflamatória, utilizando o modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i. pl. de carragenina e verificar o possível efeito sistêmico do pré-tratamento local com mangiferina.
- Avaliar o efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia inflamatória utilizando o modelo de hiperalgesia induzida pelos seguintes agentes: IL-1 β , CINC-1 e PGE₂.
- Avaliar a participação da mangiferina sobre receptores purinérgicos, através da hiperalgesia induzida pelo agonista não seletivo de receptores P2X3, α , β -meATP.
- Avaliar o efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia induzida pela epinefrina.
- Avaliar a participação da mangiferina sobre a nocicepção mediada por receptores de potencial vanilóide através da injeção i.pl. de capsaicina;
- Avaliar o efeito da mangiferina sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL- β e CINC-1 no tecido plantar de ratos após indução com carragenina;
- Avaliar o efeito da mangiferina sobre a migração de neutrófilos para o tecido plantar de ratos após a indução com carragenina;
- Avaliar o efeito da mangiferina sobre a expressão das proteínas COX-1 e COX-2 no tecido plantar de ratos após a indução com carragenina;

- Avaliar o efeito da mangiferina sobre o influxo de cálcio em células do gânglio da raiz dorsal após o estímulo com agonista não seletivo do receptor purinérgico P_2X_3 (α,β -meATP).
- Avaliar a participação da mangiferina sobre a proteína intracelular PKA, através do modelo de hiperalgesia mecânica induzida pelo ativador de PKA, 8-Br-cAMP.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos (180-200 g) provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas. Os animais permaneceram cerca de dois dias no biotério do Laboratório de Estudos da Dor do Instituto de Biologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à comida e água, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos. Todos os experimentos realizados seguiram as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número 2813-1). O número de animais por grupo foi o mínimo para demonstrar efeitos consistentes para os tratamentos (aproximadamente 6-8 animais por grupo).

3.2 Drogas

Carragenina (100 µg/pata) (FMC Corporation); Prostaglandina E₂ (PGE₂) (100 ng/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); Citocina IL-1β (0,5 pg/pata) (R&D Systems), Quimiocina CINC-1 (1 pg/pata) (R&D Systems), Epinefrina (100 ng/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); α,β-meATP (agonista não-seletivo de receptores P2X₃) (50 µg/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); 8-Br-cAMP (ativador de proteína kinase A) (0,01 µg/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); Capsaicina (0,5 µg/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA); Mangiferina (300-1200 µg/pata) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). A mangiferina utilizada neste trabalho é uma molécula extraída da casca do caule de *Mangifera indica*, a qual é comercializada apenas para fins de pesquisa.

3.3 Protocolo de tratamento

As drogas foram injetadas na pata traseira dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica de insulina, entre as cinco calosidades distais, no mesmo local de aplicação do estímulo mecânico. Volumes de 50 µl para cada substância foram administrados, pois o mesmo animal recebeu o tratamento local e posteriormente o agente álgico (Parada et al., 2003).

Nos experimentos comportamentais, os animais foram tratados com mangiferina (50 µl/pata) e após trinta minutos receberam a administração dos agentes álgicos (50 µl/pata). Os tempos de avaliação da hiperalgesia foram: 3 horas para carragenina, PGE₂, IL-1β e CINC-1; 30 minutos para epinefrina; 1 hora para α,β-meATP e duas avaliações para 8-Br-cAMP: 30 minutos e 3 horas após a administração i.pl. do agente flogístico. Para avaliar o possível efeito sistêmico da mangiferina (600 µg/pata), o pré-tratamento foi administrado na pata direita e a carragenina (100 µg/pata) foi administrada na pata esquerda. A hiperalgesia foi avaliada na pata esquerda traseira, três horas após a carragenina.

3.4 Teste Nociceptivo

O teste nociceptivo foi realizado entre 08:00 e 16:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain).

A medida do limiar nociceptivo mecânico da pata de rato foi obtido com um analgesímetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments, Califórnia, EUA), que consiste em um transdutor de força em gramas (gf) conectado a um contador digital. A precisão do aparelho é de 0,1 g e este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a

força de 80 g. O contato do transdutor de força com a pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para habituação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal retirasse reflexamente a pata seguida de uma resposta caracterizada como tremor (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até que o animal apresentasse 3 medidas similares. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na força (Δ de reação em gramas) obtida através da subtração entre a média de três valores expressos em gramas (grama-força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) e a média de três valores após a administração dos estímulos de acordo com os protocolos experimentais (Vivancos et al., 2004).

3.5 Nociceção induzida pela capsaicina

Inicialmente os animais foram colocados em habituação por três dias na caixa experimental espelhada, durante 30 minutos. Seguido o período de habituação, os animais foram tratados com mangiferina (600 µg/pata) e após 30 minutos, 20 µl de capsaicina (0,5 µg/pata) foram injetados na superfície plantar da pata direita traseira. Os animais foram observados individualmente por 5 minutos após a injeção de capsaicina e o número de *flinches* da pata direita foi considerado como indicativo de nociceção. Os animais receberam pré-tratamento local com mangiferina (600 µg/pata) ou veículo, trinta minutos antes da injeção de capsaicina (Fioravanti et al, 2008).

3.6 Dosagem de citocinas pelo método de Elisa

Uma adaptação de Safieh-Garabedian et, al (1995) foi usada para determinar os níveis de TNF- α , IL1 β e CINC-1 do tecido subcutâneo da pata de ratos. Para isso, os animais foram tratados ou não (naive) com mangiferina (600 μ g/pata) ou veículo e o tecido plantar foi coletado 180 minutos após a injeção subcutânea de carragenina. Esses tecidos foram pesados e homogeneizados na mesma proporção peso/volume em solução tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,4M de NaCl, 0,05% de tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1 mM de fenil-metil-sulfonil fluorido, 0,1 mM de benzetônio clorido, 10mM de EDTA e 20 KI/ml de aprotinina (Sigma, USA). Os exemplares foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi estocado a 70° C para o posterior avaliação dos níveis das citocinas pelo método de ELISA. As citocinas foram quantificadas usando kits TNF α (Rat TNF-alpha/TNFSF1A Quantikine ELISA kit- R&D Systems), IL-1 β (Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit -R&D Systems) e CINC-1 (Rat CINC-1 Quantikine ELISA Kit- R&D Systems). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems. Os resultados foram expressos como picogramas, baseando-se na curva padrão para cada citocina.

3.7 Quantificação de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação da migração leucocitária para tecido subcutâneo da pata será realizada pelo método indireto de dosagem da mieloperoxidase, segundo protocolo descrito por Bradley et al., (1982), o qual permite inferir diretamente o número de leucócitos totais por tecido. O protocolo de tratamento dos animais foi o mesmo da dosagem de citocinas. O tecido foi coletado na 3ª hora, após administração de carragenina, em tampão fosfato de potássio 50 mM, com HTAB (Hexadecil trimetil-amônio-bromide) 13.72 mM, pH 6.0, na concentração de 50 mg de tecido/mL de tampão. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Polytron® (13000 rpm), seguidas de

centrifugação (2 min, 13200 rpm) a 10°C. Então, foi realizada dosagem por reação colorimétrica cinética, na qual em uma placa de 96 poços foram adicionadas alíquotas do sobrenadante de cada amostra em seu respectivo “poço”. Posteriormente, foi adicionado 200 µL da solução de reação contendo 52.64 mM de dihidrocloreto do O-dianisidina, 0.05% de H₂O₂ 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.0 e 10 mL de H₂O destilada. Foram realizadas 3 leituras em intervalos de 30 segundos em 450 nm (Aparelho Spectra MAX 250®, Molecular Devices), determinando-se assim o número de neutrófilos utilizando-se curva padrão de neutrófilos.

3.8 Análise da expressão de COX-1 e COX-2 por Western Blotting

Os animais foram tratados com mangiferina (600 µg/pata) e após 30 minutos receberam 100 µg de carragenina por pata. Após três horas o tecido plantar foi coletado. Amostras do homogeneizado do tecido subcutâneo da pata foram separadas por eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas "overnight" a 4°C com tampão de bloqueio [PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20]. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1% Tween 20. Em seguida foram incubadas em solução PBS 5% (p/v) BSA e 0,1% Tween 20 contendo anticorpo para COX-1 (Santa Cruz) e COX-2 (Cayman Chemical). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimiluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário. As membranas foram fotografadas, avaliadas e quantificadas através de um foto-documentador G-box Syngene.

3.9 Cultura de gânglios da raiz dorsal

Para a cultura de gânglios, ratos machos de 21 dias de idade foram anestesiados com xilasina (27 mg/kg, i.p) e ketamina (100 mg/kg, i.p), e perfundidos transcariamente com uma solução salina modificada e balanceada de Hank – HBSS (Na_2HPO_4 0.338 mM; NaCl 137.93 mM; NaHCO_3 4.17 mM; KH_2PO_4 0.441 mM; KCl 5.33 mM; sem cálcio e sem magnésio, tamponada com 10 mM Hepes com pH 7,4). Subsequentemente uma laminectomia foi realizada e 20 gânglios da raiz dorsal foram cuidadosamente dissecados e colocados na solução HBSS usada na perfusão cardíaca. Os gânglios foram incubados 1h em 0,5% de Colagenase tipo 2 (Sigma, USA – C6885) diluída em HBSS a 37° C (Na_2HPO_4 0.338 mM; NaCl 137.93 mM; NaHCO_3 4.17 mM; KH_2PO_4 0.441 mM; KCl 5.33 mM; MgSO_4 0,8 mM; CaCl_2 1.26 mM), seguida por 10 minutos de incubação em 0,1% de Tripsina (Sigma, USA – T0303) diluída em HBSS a 37° C. Os gânglios foram ressuspensos em 1 ml de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e mecanicamente dispersos usando pipetas de vidro polidas (0,5 mm de diâmetro interno). Os *debris* celulares foram removidos por centrifugação em um gradiente de Percoll (Malin et al., 2007). As células foram colocadas em placas de cultura de 35 mm e deixadas em incubadora de CO_2 a 37° C com 5% de CO_2 por 12 horas até a realização dos experimentos.

3.10 Calcium imaging

As células do gânglio da raiz dorsal foram lavadas com HBSS para remover o meio de cultura e então foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente em HBSS contendo 5 μM Fluo4-AM (Invitrogen, USA), 1% powerload (Invitrogen, USA). Uma câmara de perfusão (Waner Instrument, USA) foi inserida em uma placa de 35 mm contendo células do gânglio e foram movidas para um microscópio invertido (Leica DMI6000) equipado com iluminação epifluorescente (480nm excitação, 527/30nm filtros de supressão) e uma câmera digital (Leica,

Germany). Um computador controlou um sistema de válvulas (Warner Instrument, USA) que foi utilizado para perfundir as células com diferentes drogas e a taxa de fluxo foi de 5 ml/minuto (completa troca de volume a cada 2 segundos). As imagens foram capturadas numa taxa de 1 imagem por segundo e os dados foram compostos pela fluorescência relativa das células ao longo do tempo. Os resultados foram expressos como a relação entre o primeiro e o segundo picos de fluorescência induzidos por α,β -metileno ATP (α,β -meATP).

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM, 95%), exceto os valores das DI_{50} (doses do fármaco que produziram a resposta de 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como a média geométrica acompanhada de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. As porcentagens de inibição foram citadas como a média $\pm$ erro padrão da média da diferença (em porcentagem) entre as médias obtidas para cada experimento individual em relação ao grupo controle correspondente. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett, ou através do teste t de Student, quando apropriado para comparação entre dois grupos. Valores de p menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises citadas acima foram realizadas utilizando o programa GraphPad PRISM®.

4 Resultados

4.1 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina

A injeção i.pl. de carragenina promove hiperalgesia mecânica acentuada nos animais, tendo seu pico de atividade três horas após sua administração. Por ser um modelo muito utilizado em testes preliminares de avaliação de hiperalgesia, foi escolhido como primeiro modelo para definir uma curva-dose resposta para a mangiferina. A figura 3A demonstra que o tratamento local com mangiferina (300, 600 e 1200 $\mu\text{g/pata}$) preveniu a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina de forma dose-dependente. As porcentagens de inibição foram de $26.83 \pm 7.87\%$ para a dose de 300 $\mu\text{g/pata}$, $77.58 \pm 7.81\%$ para a dose 600 $\mu\text{g/pata}$ e $91.66 \pm 10.21\%$ para a dose de 1200 $\mu\text{g/pata}$. A dose que inibiu 50% (DI_{50}) foi de 578,92 (593,2-564,6) $\mu\text{g/pata}$.

Para excluir o seu possível efeito sistêmico, o pré-tratamento foi realizado na pata direita e a hiperalgesia foi avaliada na pata contralateral (PCL). A Fig. 2B demonstra que o pré-tratamento com mangiferina não alterou a hiperalgesia induzida pela carragenina. Baseado nestes resultados, a dose de 600 $\mu\text{g/pata}$ foi utilizada nos experimentos subsequentes.

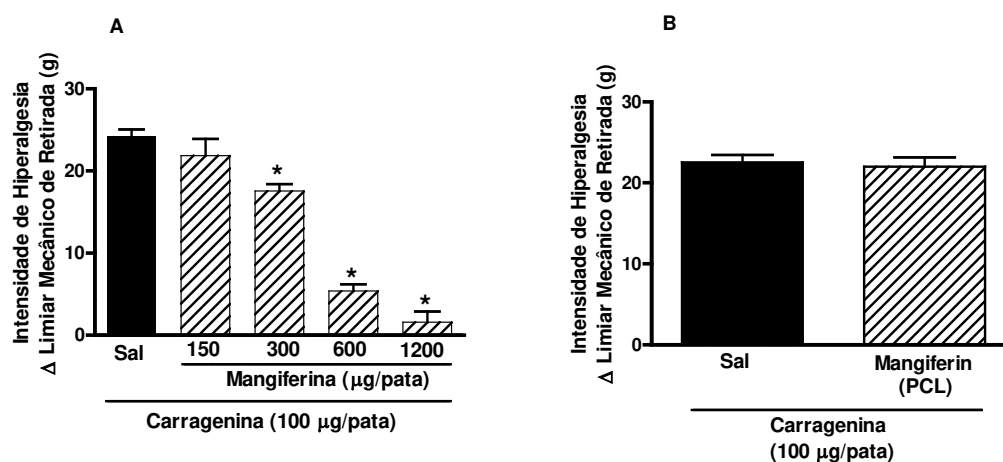


Figura 3: Hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em ratos. (A) Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com mangiferina (150-1200 $\mu\text{g/pata}$) três horas após a injeção i.pl. de carragenina (100 $\mu\text{g/pata}$). (B) Hiperalgesia avaliada na pata contralateral (PCL) para avaliar o possível efeito sistêmico. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (Sal) (* $p < 0,05$) (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Dunnett. Também foi realizado teste t student).

4.2 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela prostaglandina E₂

Para avaliar uma possível ação direta da mangiferina sobre o nociceptor, foi utilizado o modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂. A injeção i.pl. de PGE₂ reduz o limiar de sensibilidade mecânica dos animais três horas após sua administração. A dose de 600 µg/pata de mangiferina, a qual foi efetiva no modelo de carragenina, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela PGE₂ conforme demonstra a fig. 4.

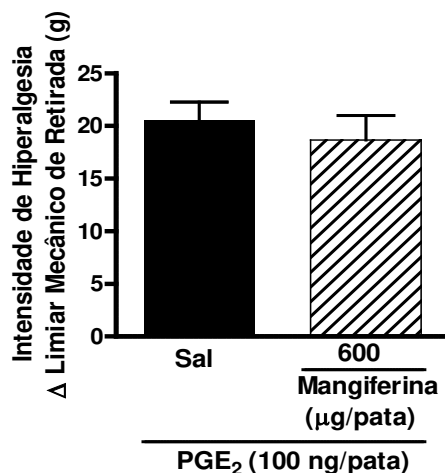


Figura 4: Hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂ em ratos. Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com mangiferina (600 µg/pata) três horas após a injeção i.pl. de PGE₂ (100 ng/pata). Os dados são expressos como a média ± E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. A análise estatística realizada foi teste t student.

4.3 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela citocina IL-1β e pela quimiocina CINC-1.

Para tentar mapear o mecanismo de ação da mangiferina, a hiperalgesia foi induzida por citocinas pró-inflamatórias. O pré-tratamento local com mangiferina na dose de 600 µg/pata reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por IL-1β em 44,22 ± 2,9 % (Fig. 5A). Assim

como na hiperalgesia induzida por IL-1 β , o pré-tratamento local com mangiferina na dose de 600 μ g/pata também reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por CINC-1, com inibição de $37,72 \pm 2,10$ % (Fig. 5B).

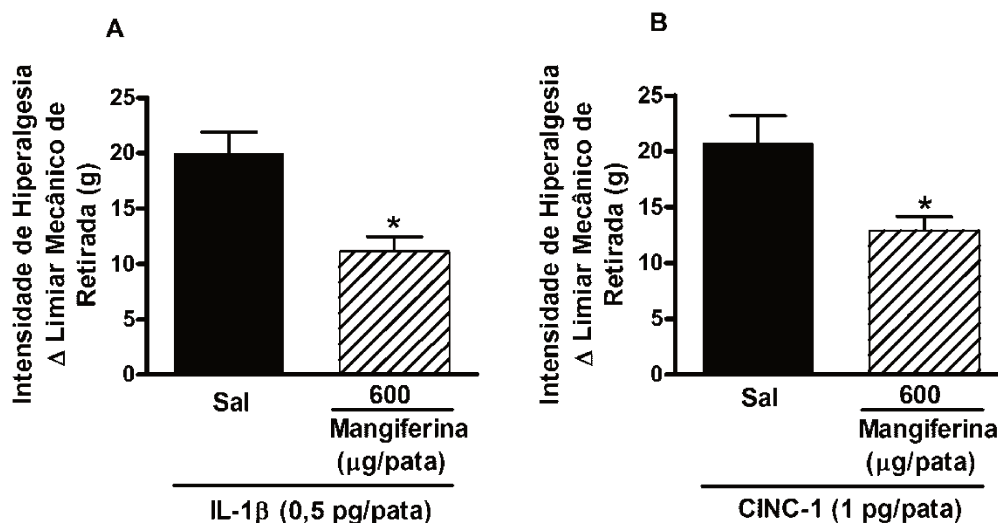


Figura 5: Hiperalgesia mecânica induzida por IL-1 β e CINC-1. Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com Mangiferina (600 μ g/pata) três horas após a injeção i.pl. de IL-1 β (0,5 pg/pata) ou CINC-1 (1 pg/pata). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (Sal) (* $p < 0,05$). A análise estatística realizada foi teste t student.

4.4 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela epinefrina

Para verificar se a mangiferina estaria relacionada com a via das aminas simpatomiméticas, foi utilizado o modelo de hiperalgesia induzida pela epinefrina. Neste modelo, foi possível observar que o pré-tratamento local com mangiferina (600 μ g/pata), apresentou uma diminuição significativa na hiperalgesia mecânica avaliada 30 minutos após a injeção i.pl de epinefrina, conforme ilustrado na figura 6. A porcentagem de inibição para este modelo foi de $47,46 \pm 9,6\%$, bastante semelhante ao controle positivo atenolol que apresentou inibição de $44,21 \pm 9,9\%$.

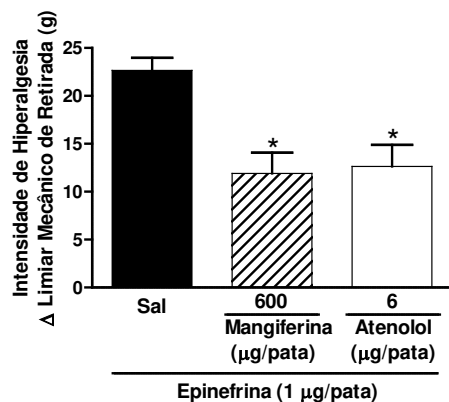


Figura 6: Hiperalgesia mecânica induzida pela epinefrina. Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira do grupo controle e de animais tratados com mangiferina (600 µg/pata) trinta minutos após a injeção i.pl. de epinefrina (1 µg/pata). Os dados são expressos como a média ± E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (Sal) (*p<0,05) (ANOVA, seguido de Dunnet).

4.5 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia induzida por α,β -meATP

Para verificar se a ação anti-hiperalgésica da mangiferina estaria relacionada com receptores P2X3, foi realizado o modelo de hiperalgesia induzida por α,β -meATP. Conforme demonstrado na figura 7, a hiperalgesia induzida pelo agonista não-seletivo de receptores P2X3 (α,β -meATP), não foi reduzida com o pré-tratamento local com mangiferina da dose de 600 µg/pata.

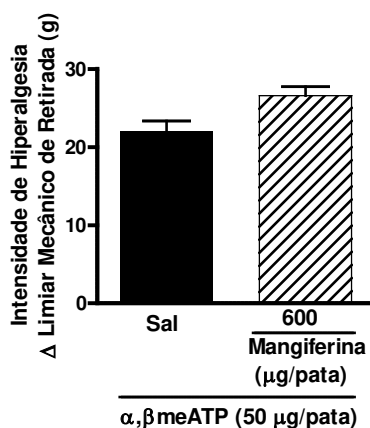


Figura 7: Hiperalgesia mecânica induzida por α,β -meATP. Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira do grupo controle e de animais tratados com mangiferina (600 µg/pata) uma hora após a injeção i.pl. de α,β -meATP (50 µg/pata). Os dados são expressos como a média ± E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. A análise estatística realizada foi teste t student.

4.6 Efeito da mangiferina sobre a hiperalgesia induzida por 8-Br-cAMP

Para verificar se o efeito anti-hiperalgesico da mangiferina estaria relacionado com vias de sinalização intracelulares, foi utilizado o modelo de hiperalgesia mecânica induzida pelo 8-Br-cAMP (ativador de PKA). A hiperalgesia induzida por 8-Br-cAMP foi avaliada 30 minutos e três horas após sua injeção i.pl. Os resultados demonstram que o pré-tratamento com mangiferina reduziu a hiperalgesia em ambos os tempo, com inibição de $54,11 \pm 8,33\%$ pós 30 minutos (Fig. 8A) e de $27,62 \pm 4,55\%$ após 3 horas (Fig. 8B).

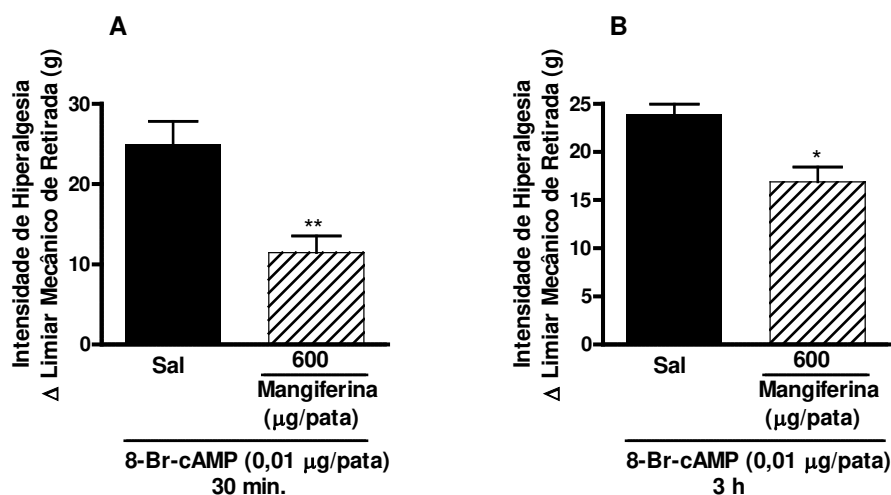


Figura 8: Hiperalgesia mecânica induzida por 8-Br-cAMP. Intensidade de hiperalgesia avaliada na pata direita traseira do grupo controle e de animais tratados com mangiferina (600 μg/pata) 30 minutos (A) e três horas (B) após a injeção i.pl. de 8-Br-cAMP (0,01 μg/pata). Os dados são expressos como a média ± E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (Sal) (*p<0,05 e **p<0,01). A análise estatística realizada foi teste t student.

4.7 Dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias

Para avaliar se o pré-tratamento com mangiferina seria capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, foi reavaliada a dosagem das mesmas. O pré-tratamento com mangiferina reduziu de forma significativa os níveis de TNF-α (Fig. 9A) e CINC-1 (Fig. 9C)

induzidos pela injeção i.pl. de carragenina no tecido plantar dos animais, porém os níveis de IL-1 β (Fig. 9B) permaneceram inalterados. As porcentagens de inibição foram de $45,59 \pm 10,97\%$ para TNF- α e de $63,82 \pm 10,32\%$ para CINC-1. O controle positivo dexametasona apresentou inibição de $63,2 \pm 3,85\%$ para TNF- α e $81,98 \pm 1,50 \%$ para CINC-1.

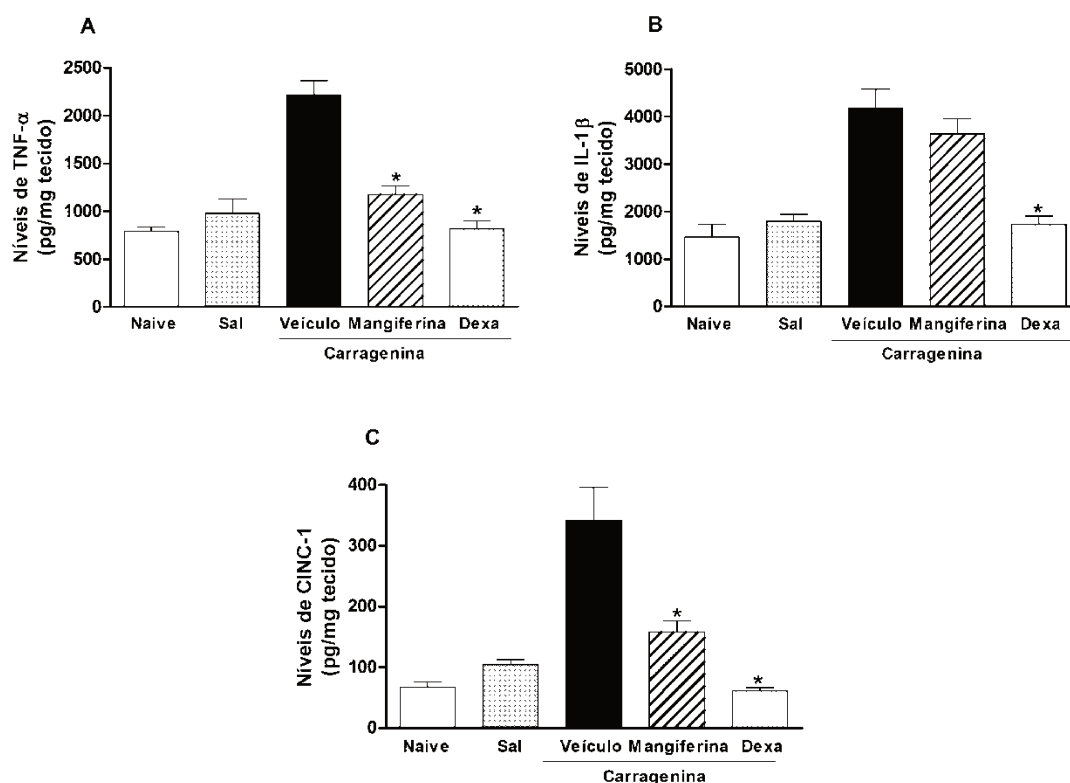


Figura 9: Dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Efeito do pré-tratamento com mangiferina (600 μ g/pata) sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e CINC-1 (C), três horas após a injeção i.pl. de carragenina. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. de 5 – 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (veículo) (* $p < 0,05$). A análise estatística realizada foi ANOVA e pós-teste Dunnett.

4.8 Quantificação da mieloperoxidase (MPO)

Para verificar se o pré-tratamento com mangiferina seria capaz de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, foi realizada a quantificação indireta do número de neutrófilos

através da enzima mieloperoxidase. Os resultados referentes ao ensaio bioquímico que avalia a atividade da enzima mieloperoxidase podem ser observados na figura 10. O pré-tratamento dos animais com mangiferina foi capaz de reduzir significativamente a migração de neutrófilos induzida pela carragenina 3h após sua administração, com porcentagem de inibição de $25,05 \pm 8,75\%$.

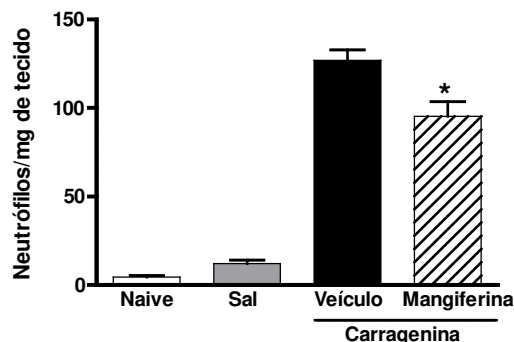


Figura 10: Quantificação de mieloperoxidase (MPO). Efeito da mangiferina (600 $\mu\text{g/pata}$) sobre a migração de neutrófilos, 3 horas após injeção i.pl. de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (veículo) (* $p < 0,05$) (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

4.9 Efeito da mangiferina sobre a nocicepção induzida pela capsaicina

Para verificar se a mangiferina seria capaz de alterar o comportamento nociceptivo dos animais, foi realizado o teste de nocicepção induzida pela capsaicina. A figura 11 demonstra que o pré-tratamento local com mangiferina (600 $\mu\text{g/pata}$) inibiu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de capsaicina quando comparado com o grupo controle. A mangiferina reduziu o número de *flinches* em $29,92 \pm 10,72\%$.

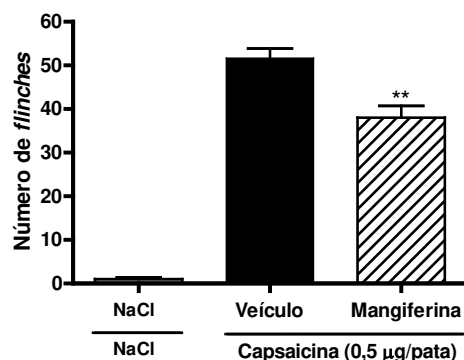


Figura 11: Nociceção induzida pela capsaicina. Efeito do pré-tratamento com mangiferina (600 µg/pata) avaliado durante 5 minutos após injeção i.pl. de capsaicina (0,5 µg/pata). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas comparadas com o grupo controle (veículo) (** $p < 0,01$) (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

4.10 Western Blotting

Para verificar se o pré-tratamento dos animais com mangiferina seria capaz de reduzir a expressão das proteínas COX-1 e COX-2, o tecido plantar foi coletado 3 horas após a administração de carragenina (100 µg/pata). Pode-se observar na figura 12, que a expressão de COX-1 (A) e de COX-2 (B) não foi diminuída no grupo tratado com mangiferina na dose de 600 µg/pata em relação ao grupo controle.

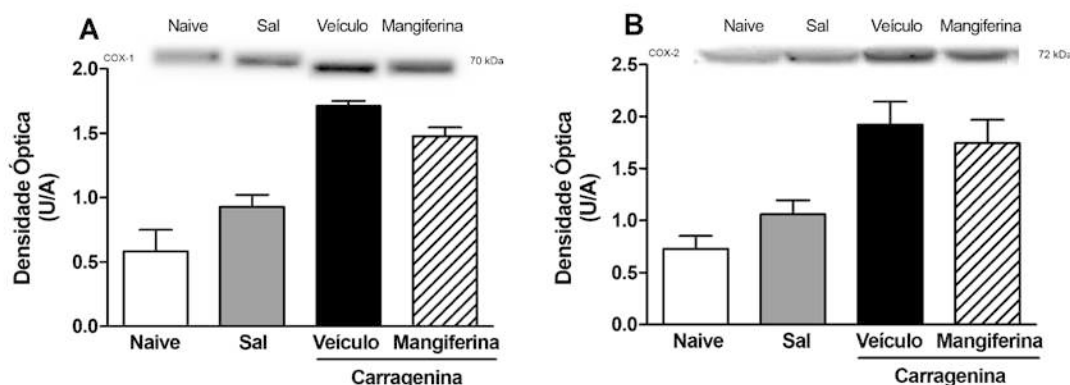


Figura 12: Expressão das proteínas COX-1 e COX-2 no tecido plantar de ratos. Expressão da proteína COX-1(A) e da proteína COX-2 (B), três horas após a injeção i.pl. de carragenina, avaliadas através do ensaio de Western Blotting. Resultados obtidos através de 3 experimentos individuais.

4.11 Avaliação do influxo de cálcio através do *Calcium imaging*

Para avaliar uma possível interação da mangiferina com receptores P2X3, foi realizado o teste de *calcium imaging* que avalia o influxo celular de cálcio após o estímulo com agonista, neste caso o α,β -meATP. Os dados da figura 13 demonstram que a aplicação de mangiferina (500 μ M) *in vitro* durante 5 minutos não alterou significativamente o segundo influxo de cálcio induzido por α,β -meATP. A pequena dessensibilização observada no segundo pico do ensaio de cálcio não é significativa e não deve ser levada em consideração, pois este é um fenômeno que normalmente ocorre quando há administração repetida de drogas agonistas em células excitáveis (Vale, 1994).

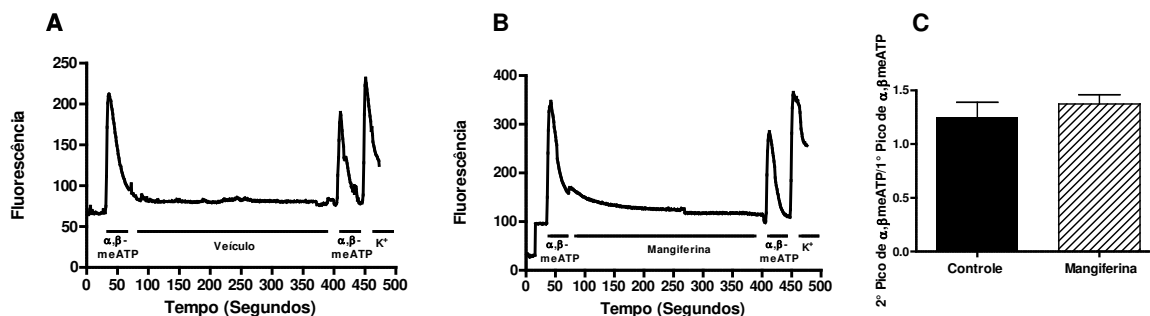


Figura 13: Efeito da mangiferina sobre o influxo de cálcio mediado por α,β -meATP em neurônios do DRG. (A) Duas administrações de α,β -meATP (100 μ M) com intervalo de 5 minutos e a administração de veículo. (B) Duas administrações α,β -meATP (100 μ M) com intervalo de 5 minutos e a administração de mangiferina (500 μ M). (C) Dados da população (n = 8 células) demonstram que o tratamento com mangiferina não causa dessensibilização dos neurônios do DRG. Dados são média $\pm$ EPM (Teste t student).

5 Discussão

A dor é o principal problema de saúde que efetivamente reduz a qualidade de vida das pessoas, pois influencia em múltiplos aspectos de suas vidas. Investimentos substanciais foram feitos pela indústria farmacêutica nas últimas décadas a fim de desenvolver analgésicos novos, eficientes e seguros; entretanto, os avanços nesta área foram muito pequenos. A ineficiência dos tratamentos está relacionada com o fato de que um mesmo mecanismo pode ser responsável por diferentes sintomas em um mesmo paciente. Além disso, o mesmo sintoma pode advir de mecanismos distintos em dois pacientes diferentes. Dentro deste contexto, a busca por medicamentos que sejam capazes de reduzir a dor e que possuam efeitos adversos toleráveis deve ser incessante (Arnstein, 2004; Gold & Gebhart, 2010; Woolf, 2010). Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório têm sido propostos, a fim de avaliar a ação antinociceptiva de vários fármacos. De maneira geral, esses modelos possuem características próprias como sua simplicidade, reprodutibilidade e possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (Le Bars et al., 2001).

Com o intuito de contribuir com a busca de novas moléculas com atividade terapêutica para o alívio da dor, o efeito da mangiferina foi avaliado em modelos de dor inflamatória e também através da quantificação de mediadores envolvidos na hiperalgesia inflamatória, a fim de tentar elucidar seu possível mecanismo de ação.

Os dados obtidos neste trabalho confirmam experimentalmente que a mangiferina possui um efeito anti-hiperalgésico, neste caso no modelo de hiperalgesia inflamatória mediada pela carragenina. A carragenina é extraída da parede celular de algas rodófitas (Rhodophyta) presentes em costas de áreas oceânicas temperadas (Thomson & Whiting, 1981) e é um agente flogístico amplamente utilizado para induzir inflamação não específica através da ativação da resposta imune inata. A injeção i.pl. de carragenina em roedores está associada a uma diminuição do limiar de retirada da pata em resposta a um estímulo mecânico (Nacife et al., 2004). A resposta imune

desencadeada pela carragenina envolve a ativação de macrófagos residentes, mastócitos e células endoteliais (Omote et al., 2001). A quimioatração e a acumulação de macrófagos são passos iniciais da resposta inflamatória e embora os macrófagos exerçam um importante papel na fagocitose e defesa contra patógenos, torna-se importante reduzir a ativação destas células, a fim de atenuar os efeitos fisiopatológicos da inflamação (García et al., 2002). Os macrófagos, em conjunto com mastócitos e células endoteliais, contribuem com a liberação de bradicinina e com a subsequente liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e CINC-1, culminando na liberação de PGs e aminas simpatomiméticas (Cunha et al., 1992; Ferreira et al., 1993; Cunha et al., 2008) e consequente ativação dos nociceptores. Em nosso estudo, a mangiferina, quando testada no modelo da carragenina, foi hábil em reduzir a hiperalgesia de forma dose-dependente, chegando a levar o limiar quase a níveis basais em doses mais elevadas, o que sugere um mecanismo de ação amplo, uma vez que a carragenina possui tanto o componente inflamatório quanto o simpático. Estudos anteriores já demonstraram que a mangiferina, quando administrada sistemicamente, inibiu a quimioatração de macrófagos no peritônio de ratos em resposta a um estímulo inflamatório com tioglicolato (García et al., 2002), possivelmente devido a sua ação já conhecida de inibir a expressão e a atividade de moléculas de adesão ICAM-1 (Delgado et al., 2001, Beltrán et al., 2003). Estes estudos demonstram o grande potencial antiinflamatório da mangiferina.

Com base nestes dados, surgiu o seguinte questionamento: teria a mangiferina uma ação analgésica relacionada com o componente inflamatório (através da IL-1 β) ou um mecanismo também relacionado com a participação de aminas simpatomiméticas (através de CINC-1)? Surpreendentemente, em ambos os experimentos, o tratamento local com mangiferina na dose de 600 μ g/pata reduziu em aproximadamente 50% a hiperalgesia nos dois modelos. A citocina IL-1 β está implicada na modulação da sensibilidade da dor e na estimulação da síntese de diferentes mediadores inflamatórios, tais como NO, TNF- α , entre outros (Woolf et al., 2003). De fato, parece não restar dúvidas que o aumento de IL-1 β no sítio inflamatório induz a síntese e liberação de PGE₂ que consequentemente sensibiliza os neurônios nociceptivos periféricos (Sommer & Kress, 2004a;

Sommer & Schafers, 2004b). O fato do pré-tratamento com mangiferina ter inibido a hiperalgesia induzida por IL-1 β , nos leva a acreditar que o mecanismo pelo qual a mangiferina poderia estar agindo seria via inibição de COX-2 e consequentemente a diminuição da produção de PGE₂. Estudos anteriores *in vitro* demonstraram que a mangiferina reduziu RNAm de COX-2 em macrófagos e em células de microglia após estímulo com LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*), como consequência também reduziu de forma dose-dependente a produção de PGE₂ (Bhatia et al., 2008; Wang et al., 2011). Nossos resultados demonstram, entretanto, que o pré-tratamento com mangiferina não reduziu a expressão das proteínas COX-1 e nem COX-2 no tecido plantar após o estímulo com carragenina. Este resultado embora negativo, não pode ser desprezado, pois ele nos dá o indício de que a mangiferina apresenta um mecanismo de ação potente, porém diferente dos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) encontrados na clínica. Os efeitos colaterais dos AINES são amplamente conhecidos e desagradáveis, englobando problemas gastrintestinais, como úlceras, insuficiência renal e hepática (Süleyman et al., 2007). Seria muito interessante ter um novo medicamento sem os efeitos colaterais dos AINES, porém com a mesma eficácia.

Dois aspectos dos resultados obtidos podem ser considerados importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação anti-hiperalgésica da mangiferina. O primeiro aspecto é que, embora a administração local de mangiferina tenha prevenido a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina de forma bastante expressiva, a dose efetiva utilizada não alterou a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de PGE₂. Por este ponto de vista, o efeito da mangiferina parece ser semelhante ao efeito da administração de anti-inflamatórios esteroidais, tal como a dexametasona. De acordo com o paradigma estabelecido da ação da PGE₂ na sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos, a dexametasona previne a hiperalgesia induzida pela carragenina, mas não altera a hiperalgesia induzida pela PGE₂, por ser o produto final dos mediadores inflamatórios e agir diretamente nos nociceptores. Dados da literatura sugerem a participação dos opioides endógenos para explicar o efeito antinociceptivo da mangiferina (Izquierdo et al., 2013, Lopes et al., 2013). Com base nos nossos dados, acreditamos que este possa

não ser o seu principal mecanismo de ação, pois desta forma a hiperalgesia induzida pela PGE_2 deveria ter sido reduzida ou inibida. Contudo, um segundo aspecto dos resultados obtidos neste estudo deve ser considerado: A administração local de mangiferina diminuiu os níveis de $TNF-\alpha$. Este resultado foi semelhante aos dados já demonstrados com o fitoterápico Vimang®, onde o extrato reduziu os níveis de $TNF-\alpha$ no soro de camundongos após estímulo com ácido araquidônico ou acetato miristato de forbol (PMA) (Garrido et al., 2004a). Além de reduzir os níveis de $TNF-\alpha$, o pré-tratamento local com mangiferina reduziu os níveis de CINC-1, sem alterar os níveis de $IL-1\beta$ aumentados pela administração de carragenina. Estes dados, por outro lado, não corroboram com um possível efeito da mangiferina semelhante à dexametasona. Em estudos com células de carcinoma de próstata LNCaP, a mangiferina suprimiu a atividade do fator de transcrição $NF-\kappa B$ (Dilshara et al., 2015). O $NF-\kappa B$ participa de diversos processos biológicos por regular vários genes alvos, um deles é o da citocina $IL-1\beta$ (Cogswell et al., 1994), a qual não foi reduzida com o pré-tratamento local com mangiferina.

Estudos prévios demonstraram que antagonistas de receptores purinérgicos ($P2X_3$) apresentam a mesma resposta que a mangiferina com relação à redução nos níveis das citocinas ($TNF-\alpha$, CINC-1 e $IL-1\beta$) e diminuição da migração de neutrófilos induzidos pela carragenina no tecido plantar de ratos (Oliveira et al., 2009). Estes dados nos levaram a acreditar que possivelmente a mangiferina estaria agindo em receptores $P2X_3$ ou estaria relacionada com a liberação de ATP no sítio inflamatório. O resultado do teste comportamental de hiperalgesia induzida por α,β -meATP sugere que possivelmente a mangiferina não interfere na atividade de canais $P2X_3$. Da mesma forma, o resultado no teste de *calcium imaging* demonstrou que a mangiferina não reduziu o influxo de cálcio *in vitro*. Embora a ação da mangiferina seja semelhante à atividade de antagonistas de receptores $P2X_3$ em relação à redução dos níveis de citocinas, foi demonstrado que antagonistas de receptores $P2X_3$ não reduzem a hiperalgesia induzida por $IL-1\beta$ and CINC-1 (Fusaro et al., 2010), diferentemente da atividade da mangiferina.

A quimiocina CINC-1 possui um papel fisiológico bastante importante, participando do processo inflamatório, reparo de feridas, angiogênese e metástase, porém seu papel primário é a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos (Henkels et al., 2011). Os neutrófilos são os mais abundantes leucócitos polimorfonucleares e representam a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra patógenos. Durante a primeira hora do início da inflamação os neutrófilos migram através do endotélio vascular e se acumulam no local da lesão (Cunha et al., 2008). Assim, podem produzir ou facilitar a produção de mediadores inflamatórios, incluindo enzimas de degradação, radicais livres e metaloproteases. Ademais, liberam citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6 (Austin & Moalem-Taylor, 2010). A dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase no local da injeção do agente inflamatório nos dá uma medida indireta da migração de neutrófilos para este local. Estudos anteriores demonstraram que o fitoterápico Vimang® quando administrado topicamente (Garrido et al., 2004a) ou oralmente (Garrido et al., 2006), reduziu a mieloperoxidase induzida por acetato miristato de forbol (PMA) após edema de orelha em camundongos. Nossos resultados demonstraram que a mangiferina reduziu a migração de neutrófilos. Esta atividade pode estar relacionada com fato de ter também reduzido de forma bastante significativa os níveis da citocina CINC-1, que é um potente agente quimiotático de neutrófilos conforme citado anteriormente.

A ação da mangiferina na hiperalgesia induzida por CINC-1 é bastante interessante e demonstra que possivelmente ela esteja influenciando a via das aminas simpatomiméticas. Para avaliar esta hipótese foi realizado o modelo de hiperalgesia induzida pela epinefrina. Neste modelo também houve redução da hiperalgesia através do pré-tratamento com mangiferina. A epinefrina, assim como a capsaicina possui uma ação direta no nociceptor. A epinefrina por se ligar com alta afinidade a receptores β -adrenérgicos (Wang et al., 2011) e a capsaicina por ativar os receptores TRPV1 causando dor neurogênica (Peppin & Pappagallo, 2014). Corroborando com nossos dados, estudos prévios com a mangiferina demonstraram sua capacidade de reduzir o comportamento

nociceptivo induzido pela capsaicina, porém quando administrada por via oral (Lopes et al., 2013, Izquierdo et al., 2013).

Tomados em conjunto, os dados obtidos neste trabalho não apontam para uma ação direta da mangiferina em receptores presentes nos nociceptores. Desta forma, um dos objetivos do trabalho foi avaliar também uma possível ação da mangiferina em segundos mensageiros intracelulares. Para testar esta hipótese a hiperalgesia foi avaliada 30 minutos e três horas após a administração do ativador de PKA, 8-Br-cAMP. A resposta obtida em 30 minutos foi bastante significativa e nos dá o indício de que talvez a mangiferina possa estar bloqueando a atividade da PKA. Isso explicaria parcialmente nossos resultados, pois a sinalização intracelular nos modelos da epinefrina, IL-1 β e capsaicina, onde a mangiferina apresentou atividade, necessitam da ativação da PKA (Wang et al. 2011, Kim et al., 2014, Yang et al., 2014).

Não podemos deixar de mencionar que o uso do fitoterápico Vimang® é como antioxidante para o tratamento de estresse. Espécies reativas de oxigênio como O₂⁻ e OH estimulam, mantêm e propagam processos inflamatórios e dor, causando dano tecidual. A mangiferina já demonstrou propriedades ferro-quelantes, além da capacidade de eliminar radicais livres (Pardo-Andreu et al., 2008). O uso de antioxidantes reduz efeitos adversos, pois previnem a formação de radicais livres antes que eles reajam com sítios como lipídios de membrana (Dar et al., 2005; Cuzzucrua et al., 2001) e este pode ser um efeito adjuvante da mangiferina em sua atividade analgésica.

Recentemente também foram investigadas ações da mangiferina no sistema nervoso central, relacionadas à atividade de coordenação motora e relaxante muscular e verificou-se que a ação analgésica da mangiferina não é resultado de bloqueio muscular periférico, nem de indução de sedação (Lopes et al., 2013). Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado que a administração sistêmica de mangiferina pode ter um efeito tóxico superior ao Vimang® (Shengmin & Ming, 1999), recentemente a mangiferina mostrou ser segura na dose de 25 g/kg quando foi avaliada a sua toxicidade aguda em camundongos (Niu et al., 2012).

Considerando que a mangiferina pode ser extraída de uma fonte renovável como as folhas e

caule de diversas espécies vegetais e que demonstrou atividade analgésica aparentemente com um perfil seguro, talvez seja interessante explorar suas propriedades medicinais em detalhe, incluindo triagens clínicas no futuro.

6 Conclusão

O presente trabalho demonstrou que a mangiferina possui atividade anti-hiperalgésica em modelos de hiperalgesia inflamatória em ratos e que este efeito pode estar relacionado à sua capacidade de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios como TNF- α e CINC-1, além da migração neutrofílica, reduzindo, desta forma, a sensibilização periférica da dor.

Os resultados demonstraram que a mangiferina não reduziu a expressão da ciclooxigenase 2, porém não se descarta a possibilidade de estar influenciando na sua funcionalidade, o que explicaria em parte alguns dos resultados e poderia ser um dos seus mecanismos de ação.

Outro aspecto a ser considerado é que, embora a mangiferina não tenha interferido na ação dos receptores P₂X₃, um outro mecanismo que poderia estar envolvido em sua ação anti-hiperalgésica seria uma inibição na liberação de ATP no tecido periférico.

Em relação a uma possível ação em vias de sinalização intracelular, os resultados demonstraram que possivelmente a mangiferina esteja interferindo na atividade da PKA, sendo este outro possível alvo para sua ação.

Mais estudos são necessários para compreender com maior clareza os mecanismos pelos quais a mangiferina exerce sua atividade anti-hiperalgésica.

7 Referências Bibliográficas

Ali, Z., Meyer, R.A., Campbell, J.N. Secondary hyperalgesia to mechanical but not heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. *Pain*, v. 68, p. 401-411, 1996.

Amazzal, L., Lapôtre, A., Quignon, F., Bagrel, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neuroscience Letters* v. 418, p. 159-164, 2007.

Arnstein, P. Chronic neurophatic pain: Issues in patient education. *Pain Manag. Nur.*, v. 5, p. 34-41, 2004.

Austin, P. J.; Moalem-Taylor, G. The neuro-immune balance in neurophatic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J. of Neuroim.*, v. 229, p.26-50, 2010.

Basbaum, A. I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G., Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267-284, 2009.

Beltrán, A.E., Ledón, N., Romay, C., Sironi, M., Quintero, G., Garrido, G., Delgado, R. Extracto acuoso de *Mangifera indica* L. (VIMANG) y mangiferina inhiben la expresión de ICAM-1 en células endoteliales estimuladas con citocinas pro-inflamatorias. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, v. 22, p. 164-172, 2003.

Bertolini, F.; Novaroli, L.; Carrupt, P. A.; Reist, M. Novel screening assay for antioxidant protection against peroxy radical induced loss of protein function. *J Pharm. Sci.*, v. 96, p. 2931-2944, 2007.

Bhatia, H.S., Candelario-Jalil, E., Pinheiro de Oliveira, A.C., Olajide, O.A., Martínez-Sánchez, G., Fiebich, B.L. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in activated rat microglial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 477, p. 253-258, 2008.

Bradley, P.P., Priebe, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, v. 78, p. 206-9, 1982.

Cardoso, M. G. S., São José, A., R., Viana, A. E. S., Matsumoto, S. N., Rebouças, T. N. H. Flowering and production of mango fruits (*Mangifera indica* L.) Cv. Rosa promoted by different paclobutrazol doses. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 29, p. 209-212, 2007.

Carlino, E, Frisaldi, E., Benedetti, F. Pain and the context. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 10, p. 348-355, 2014.

Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP, Gray JG. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol.*, v. 153, p. 712-23, 1994.

- Cunha, FQ, Poole, S., Lorenzetti, B. B., Ferreira, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 107, p. 660-664, 1992.
- Cunha, T. M., Verri, W.A.Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci*, v. 102, p. 1755-60, 2005.
- Cunha, T. M.; Verri JR., W. A.; Schivo, I. R.; Napimoga, M. H.; Parada, C. A.; Poole, S.; Teixeira, M. M.; Ferreira, S. F.; Cunha, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J. Leukoc. Biol.*, v. 83, p. 824-832, 2008.
- Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.*, v. 53, p.135—159, 2001.
- D'Mello, R., Dickenson, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 101, p. 8–16, 2008.
- Dar, A., Faizi, S., Naovi, S., Roome, T., Zikr-Ur-Rehman, S., Ali, M., Firdous, S., Moin, S.T. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, p. 596-600, 2005.
- Delgado, R., Garrido, G., González, D., Herrera, B., Beltrán, A., et al. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) as a natural antioxidant with antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Minerva Med*, v. 92, p. 98– 102, 2001.
- Dilshara, M.G., Kang, C.H., Choi, Y.H., Kim, G.Y. Mangiferin inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression and cellular invasion by suppressing nuclear factor- κ B activity. *BMB Rep.* 2015 Mar 5. pii: 3085, 2015.
- Dubin, A. E.; Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.*, v. 120, p. 3760-3772, 2010.
- Dubyak, GR, el-Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, v. 265, p. 577-606, 1993.
- Ferreira, S.H., Moncada, S., Parsons, M., Vane, J.R. Proceedings: the concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol* v. 52, p. 108-109, 1974.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Poole, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, p. 1227-1231, 1993.
- Fioravanti, B; De Felice, M; Stucky, CL; Medler, KA; Luo, MC; Gardell, LR; Ibrahim, M; Malan, TP Jr.; Yamamura, HI; Ossipov, MH; King, T; Lai, J; Porreca, F; Vanderah, TW. Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. *J Neurosci*, v. 28, p. 11593-602, 2008.

Fischer, M. J. M., Mc Naughton, P. A. How anchoring proteins shape pain. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 143, p. 316-322, 2014.

Freitas, P G., Barbosa, A. F., Saraiva, L. A., Camps, I., da Silveira, N. J. F., Veloso, M. P., Santos, M. H., Schneedorf, J. M. Mangiferin binding to serum albumin is non-saturable and induces conformational changes at high concentrations. *Journal of Luminescence*, v. 132, p. 3027-3034, 2012.

Fusaro, M. C G. O., Pelegrini-da-Silva, A., Araldi, D., Parada, C. A., Tambeli, C., H. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE2 or dopamine. *European Journal of Pharmacology* 649, 177-182, 2010.

García, D., Delgado, R., Ubeira, F.M., Leiro, J. Modulation of rat macrophage function by *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin. *Int. Immunopharmacol.*, v. 2, p. 797-806, 2002.

Garrido, G., González, D., Delporte, C., Backhouse, N., Quintero, G., Núñez, A.J., Morales, M.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother. Res.*, v. 15, p. 18-21, 2001.

Garrido, G., González, D., Lemus, Y., García, D., Lodeiro, L., Quintero, G., Delporte, C., Núñez-Sellés, A.J., Delgado, R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacol. Res.*, v. 50, p. 143-149, 2004a.

Garrido, G.; Delgado, R.; Lemus, Y.; Rodriguez, J.; Garcia, D.; Nunez-Selles, A. J. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacol. Res.*, v. 50, p. 165-172, 2004b.

Garrido, G., González, D., Lemus, Y., Delporte, C., Delgado, R.. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine*, v. 13, p. 412–418, 2006.

Garrido-Suárez, B., Rabí, M.C., Bosch, F., Garrido-Garrido, G., Delgado-Hernández, R. Introducción de la suplementación con formulaciones Vimang® en el síndrome doloroso regional complejo: experiencia en 15 pacientes. *Rev Soc Esp Dolor*, v. 16, p. 87-96, 2009.

Garrido-Suárez, BB, Garrido, G, Castro-Labrada, M, Merino, N, Valdés, O, Rodeiro, I, Hernández, I, Godoy-Figueiredo, J, Ferreira, SH, Delgado-Hernández, R. Anti-hypernociceptive effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 124 (2014) 311–319a.

Garrido-Suárez, B, Garrido, G, García, ME, Delgado-Hernández, R. Anti-hyperalgesic Effects of an Aqueous Stem Bark Extract of *Mangifera indica* L.: Role of Mangiferin Isolated from the Extract. *Phytother. Res.*, v. 28, p. 1646–1653, 2014b.

Gever, JR, Cockayne, DA, Dillon, MP, Burnstock, G, Ford, AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*, v. 452, p. 513-537, 2006.

Gold, M. S.; Gebhart, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.*, v. 16, p. 1248-1257, 2010.

Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M. R., Sánchez-Gómez, M. V., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado-García, J. M., Gruart, A., Matute, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of Disease*, v. 23, p. 374-386, 2006.

Henkels, K. M., Frondorf, K., Gonzalez-mejia, M. E, Doseff, A. L., Gomez-Cambronero, J. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by janus kinase 3 (jak3). *FEBS Letters*, v. 585, p. 159–166, 2011.

Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P.A. Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. *Current Neuropharmacology*, v. 4, p. 197-206, 2006.

Izquierdo, T., Monteros-Zuñiga, A.E., Cervantes-Durán, C., Lozada, M.C., Gordínez-Chaparro, B. Mechanisms underlying the antinociceptive effect of mangiferin in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*, v. 718, p. 393-400, 2013.

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

Kim, M. J., Lee, S. Y., Yang, K. Y., Nam, S. H., Kim, H. J., Kim, Y. J., Bae, Y. C., Ahn, D. K. Differential regulation of peripheral IL-1b-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats. *Pain*, v. 155, p. 723–732, 2014.

Karczewski, J., Spencer, R.H., Garsky, V.M., Liang, A., Leidl, M.D., Cato, M.J., Cook, S.P., Kane, S., Urban, M.O. Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br J Pharmacol.*, v. 161, p. 950-60, 2010.

Khan, M.A.A., Islam, M.T. Analgesic and cytotoxic activity of *Acorus calamus* L., *Kigelia pinnata* L., *Mangifera indica* L. and *Tabernaemontana divaricata* L. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 4, p. 149-154, 2012.

Kissin, I. The development of new analgesics over the past 50 years: A lack of real breakthrough drugs. *Anesth. Analg.*, v. 110, p. 780-789, 2010.

Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Med.*, v.16, p.1258-1266, 2010.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 597-652, 2001.

Leiro, J., Álvarez, E., Arranz, J. A., Siso, I.G., Orallo, F. *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p. 1361-1371, 2003.

Lewin, R.G., Lu, Y., Park, T.J. A plethora of painful molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 14, p. 443-449, 2004.

Loeser, J. D. & Treede, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, v. 137, p. 473-477, 2008.

Lopes, S.C., Da Silva, A.V., Arruda, B.R., Morais, T.C., Rios, J.B., Trevisan, M.T.S, Rao, V.S., Santos, F.A. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: Role of endogenous opioids, K_{ATP} -channels and adenosine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 110, p. 19-26, 2013.

Lorenzetti, B.B., Veiga, F.H., Canetti, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. CINC-1 mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *European Cytokine Network.*, v. 13, p. 456-61, 2002.

Malin, S.A., Davis, B.M., Molliver, D.C. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc.*, v. 2, p. 152-60, 2007.

Martínez, G., Delgado, R., Pérez, G., Garrido, G., Núñez-Sellés, A.J., León, O.S. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. Extract (Vimang). *Phytother Res*, v. 14, p. 424–7, 2000.

Moffat, R.; Rae, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaest. & Int. Care Med.*, v. 12, p. 12-15, 2011.

Muruganandan, S., Lal, J., Gupta, P.K. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Toxicology, Limerick*, v. 215, p. 57-68, 2005.

Márquez, L., Pérez-Nievas, B.G., Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J.L., Menchén, L., Garrido, G., Leza, J.C. Anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract in a model of colitis. *World Gastroenterol.*, v. 16, p. 4922-31, 2010.

Márquez, L., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Leza, J.C. Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. *European Journal of Nutrition*, v. 51, p. 729–739, 2012.

Nacife, V. P.; Soeiro, M. N. C.; Gomes, R. N.; D'Ávila, H.; Castro-Faria Neto, H. C.; Meireles, M. N. L. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide *in vivo*. *Cell Str. F.*, v. 29, p. 27-34, 2004.

Niu, Y., Lu, W., Gao, L., Lin, H., Liu, X., Li, L., 2012. Reducing effect of mangiferin on serum uric acid levels in mice. *Pharm. Biol.*, v. 50, p. 1177–82, 2012.

Núñez-Sellés, A.J., Delgado-Hernández, R., Garrido-Garrido, G., González-Rivera, D., Guevara-García, M.; Pardo-Andreu, G.L. The paradox of natural products as pharmaceutical. *Experimental evidences of a mango stem bark extract*. *Pharmacol. Res.*, v. 55, p. 351-358, 2007.

Ojewole, J.A. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn.

(Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, v. 27, p. 547–554, 2005.

Oliveira, M.C., Pelegrini-da-Silva, A., Tambeli, C.H., Parada, C.A. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*, v. 141, p. 127-34, 2009.

Olorunfemi, O.J., Nworah, D.C., Egwurugwu, J.N., Hart, V.O. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of *Mangifera indica* Leaf extract on fever-induced albino rats (Wistar). *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, v. 3, p. 54-57, 2012.

Omote, K.; Hazama, K.; Kawamata, T.; Kawamata, M.; Nakayaka, Y.; Toriyabe, M.; Namiki, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res.*, v. 912, p. 171-175, 2001.

Parada, C. A.; J. J. Yeh; D. B. Reichling; J. D. Levine. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, v.120, p.219-26. 2003.

Pardo-Andreu, G.L., Sánchez-Baldoquín, C., Avila-González, R., Yamamoto, E.T., Revilla, A., Uyemura, S.A., Naal, Z., Delgado, R., Curti, C. Interaction of Vimang (*Mangifera indica* L. extract) with Fe(III) improves its antioxidant and cytoprotecting activity. *Pharmacol Res*, v. 55, p. 389-95, 2006a.

Pardo-Andreu, GL, Delgado, R, Núñez-Sellés, AJ, Vercesi, AE. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits 2-deoxyribose damage induced by Fe (III) plus ascorbate. *Phytother Res.*, v. 20, p. 120-124, 2006b.

Pardo-Andreu, G. L., Barrios, M.F., Curti, C., Hernández, I., Merino, N., Lemus, Y., Martinez, I., Riaño, A., Delgado, R. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacological Research*, v. 57, p. 79-86, 2008.

Peppin, J.F., Pappagallo, M. Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: A review. *Ther Adv Neurol Disord.*, v. 7, p. 22-32, 2014.

Rao, V. S., Carvalho, A. C., Trevisan, M. T. S., Andrade, G. M., Nobre Júnior, H. V., Moraes, M. O., Iury, H. I. M. H., Morais, T. C., Santos, F. A. Mangiferin ameliorates 6-hydroxydopamineinduced cytotoxicity and oxidative stress in ketamine model of schizophrenia. *Pharmacological Reports*, v. 64, p. 848-856, 2012.

Richardson, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthones in flowering plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 11, p. 371-375, 1983.

Riedel, W., Neeck, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z. Rheumatol.*, v. 60, p. 404-415, 2001.

Rivera DG, Balmaseda IH, León AA, Hernández BC, Montiel LM, Garrido GG, Cuzzocrea S, Hernández RD. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. J Pharm Pharmacol., v. 58, p. 385-92, 2006.

Rivera, D.G., Hernández, I., Merino, N., Lague, Y., Álvarez, A., Martín, Y., Amador, A., Nuevas, L., Delgado, R. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mngiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma. J Pharm Pharmacol., v. 63, p. 1336-45, 2011.

Rodríguez, J., Di Piero, D., Gioia, M., Monaco, S., Delgado, R., Coletta, M., Marini, S. Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L., and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. Biochimica and Biophysica Acta, v. 1760, p. 1333-1342, 2006.

Sachs, D., Villareal, C.F., Cunha, F.Q., Parada, C.A., Ferreira, S.F. The role of PKA and PKC ϵ pathways in prostaglandin E₂-mediated hypernociception. British Journal of Pharmacology, v. 156, p. 826–834, 2009.

Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. Br. J. Pharmacol., v. 115, p. 1265–1275, 1995.

Sanchez, G. M., Giuliani, A., Núñez-Sallés, A. J., Davison, G. P., León-Fernandez, O. S. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. Pharmacological Research, v. 42, p. 565-573, 2000.

Scholz, J.; Woolf, C. J. Can we conquer pain? Nat. Neurosc. Suppl., v.5, p.1062-1066, 2002.

Sellés, A.J.N., Castro, H.T.V., Aguero-Aguero, J., González-González, J., Naddeo, F., De Simone, F., Rastrelli, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 762-766, 2002.

Shengmin, Y.; Ming, Z. The research advance of pharmacology effects of the mangiferin. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, v. 6, p. 199-200, 1999.

Sommer, C.; Kress, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci. Lett., v. 361, p. 184-187, 2004a.

Sommer, C.; Schäfers, M. Mechanisms of neuropathic pain: the role of cytokines. Drug Disc. T., v. 1, p. 441-448, 2004b.

Stoilova, I., Jirovetz, L., Stoyanova, A. Antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, v. 7, p. 2706-2716, 2008.

Süleyman, H., Demircan, B., Karagöz, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep.*, v. 59, p. 247-58, 2007.

Teixeira, M. J. Fisiopatologia da dor. In: Alves-neto, O.; Costa, C. M. C; Siqueira, J. T. T.; Teixeira, M. J. Dor: Princípios e prática. Artmed, 2009, p. 145-175.

Thomson, A. W., Whiting, P. H. A comparative study of renal and hepatic function in sprague-dawley rats following systemic injection of purified carrageenans (kappa, lambda and iota). *Br. J. exp. Path.*, v. 62, 207-213, 1981.

Vale, N.B. Pharmacodynamics Principles of Anesthetic Drugs. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 44, p. 13 – 23, 1994.

Valera, S, Hussy, N, Evans, RJ, Adami, N, North, RA, Surprenant, A, Buell, G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, v. 371, p. 516-519, 1994.

Valverde, S., Duarte, E. M., Ducangé, D., Garrido, G., García-Rivera, D., Jáuregui, U., Garrido, B. Utilidad de las formulaciones Vimang® en pacientes con osteoartrosis de rodilla. *Rev Soc Esp Dolor.*, v. 16, p. 32-41, 2009.

Vivancos, G.G., Verri Jr, W. A., Cunha, T. M., Schivo, I. R. S., Parada, C. A., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. Na electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J. Med. Biol. Research*, v. 37, p. 391-399, 2004.

Vyas, A., Syeda, K., Ahmad, A., Padhye, S., Sarkar, F.H. Perspectives on Medicinal Properties of Mangiferin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 412-425, 2012.

Wang, H., Heijnen, C. J., Eijkelkamp, N., Carbajal, A., G., Schedlowski, M., Kelley, K. W., Dantzer, R., Kavelaars, A. GRK2 in sensory neurons regulates epinephrine-induced signalling and duration of mechanical hyperalgesia. *Pain*, v.152, p.1649–1658, 2011.

Waxman, S.G. Polymorphisms in ion channel genes: emerging roles in pain. *Brain*, v. 133, p. 2514–2518, 2010.

Woolf, C. Neurobiology of disease. *Pain*, v. 7, p. 505-510, 2000.

Woolf, G., Yirmiya, R., Goshen, I., Iverfeldt, K., Hollund, L., Takeda, K, Shavit, Y. Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. *Pain*, v. 104, p. 471-480, 2003.

Woolf, C. J. What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.*, v. 120, p. 3742-3744, 2010.

Yang, R., Xiong, Z., Liu, C., Liu, L. Inhibitory effects of Capsaicin on Voltage-Gated Potassium Channels by TRPV1-Independent Pathway. *Cell Mol Neurobiol* 34, 565–576, 2014.

Yoshikawa, M., Ninomiya, K., Shimoda, H., Nishida, N., Matsuda, H. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, p. 72-76, 2002.

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

ANEXO 1



CEUA/Unicamp

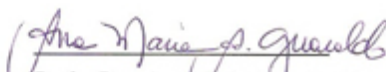
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

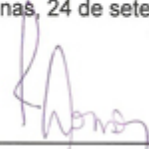
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Mecanismo de ação analgésica da Mangiferina em ratos" (protocolo nº 2813-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Lílian Wünsch Rocha, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de setembro de 2012.

Campinas, 24 de setembro de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva