UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

KATHERINE PLAUTZ

EFEITO DO POLISSACARÍDEO SCHIZOPHYLLAN DE *Schizophyllum commune* EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOR CRÔNICA E AGUDA

JOINVILLE 2022

KATHERINE PLAUTZ

EFEITO DO POLISSACARÍDEO SCHIZOPHYLLAN DE *Schizophyllum commune* EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOR CRÔNICA E AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Delwing de Lima

Coorientadora: Profª Drª Samira Dal-Toé De Prá

JOINVILLE 2022

Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Plautz, Katherine
P721e Efeito do polissacarídeo schizophyllan de *Schizophyllum commune* em modelos pré-clínicos de dor crônica e aguda/ Katherine Plautz; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima; coorientadora Dra. Samira Dal-Toé de Prá. – Joinville: UNIVILLE, 2022.

116 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Dor crônica. 2. Dor aguda. 3. Schizophyllum. 4.. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Prá, Samira Dal-Toé de . III. Título.

CDD 616.0472

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

Termo de Aprovação

"Efeito dos Polissacarídeos de *Schizophyllum Commune* em Modelos Pré-Clínicos de Dor Crônica e Aguda"

por

Katherine Plautz

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Samira Dal-Toé De Prá
Coorientadora (UNISOCIESC)

Profa. Dra. Flavia Karine Rigo
(UNESC)

Profa. Dra. Marcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 16 de dezembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu gostaria de agradecer aos meus pais Deise e Willian por todo o apoio e incentivo ao longo da minha vida, por acreditarem em mim. Agradeço à minha irmã Nicolle por todos os conselhos e momentos em que precisei desabafar e resmungar, à minha avó Lisete por sempre estar ao meu lado em todos os passos dessa caminhada, ao meu avô Eldor (*in memorian*) por sempre torcer por mim e se orgulhar.

Agradeço imensamente ao meu namorado Renan por me acompanhar em cada etapa, por estar comigo em todos os momentos e sempre esperar por mim em todas as vezes em que voltei de madrugada após uma noite de pesquisa, por me apoiar e me entender, por me fazer companhia e me auxiliar nos melhores e piores dias. Um agradecimento muito especial ao meu filho Samuel por me apoiar mesmo sem entender o motivo de eu estudar tanto, e gostar de estudar, por me fazer sorrir e gargalhar mesmo quando o dia era difícil, pelos melhores abraços.

Ao meu maior companheiro, que esteve comigo em todos os momentos em que passei escrevendo, que me confortou nas horas difíceis e que transbordou seu amor canino em mim, Bob.

A minha dupla Gabriela, que está comigo desde a graduação e que compartilha do amor que eu tenho pela ciência e pesquisa, que está comigo em todas as etapas, perrengues, alegrias, congressos e as situações mais inusitadas e inimagináveis (ansiosa pela estréia da nossa série!), que basta um olhar ou meia palavra para que a gente se entenda. Obrigada por sempre estar comigo e me ouvir tanto!

Aos meus amigos, Mari (*in memorian*), Lory, Sani, Alice, Fei e Juri que mesmo longe foram parte essencial de toda essa jornada durante esse ano, que estiveram comigo em todos os momentos e comemoraram juntos cada novo passo que eu dei, que me ouviram incessantemente e mesmo sem entender a minha pesquisa estiveram lá por mim todos os dias e noites. A todos os meus amigos que estiveram comigo, mesmo longe e que me ouviram e apoiaram.

A minha orientadora, Professora Dra. Daniela Delwing de Lima, por estar comigo e ter confiado em mim durante todo o processo, por ter aceito me orientar, por ser além de uma orientadora e professora maravilhosa, uma grande amiga. Você se tornou uma de minhas maiores inspirações e ter o privilégio de ser sua

orientanda me deixa extremamente grata. Obrigada por todos os momentos e ensinamentos que pudemos compartilhar durante esse período.

A minha coorientadora, Professora Dra. Samira Dal-toé de Prá por todo o conhecimento compartilhado para que este trabalho se realizasse. Agradeço á Professora Dra. Nicole Dalonso pelo fornecimento do polissacarídeo e também à Ana Paula Vanin e Marli Camassola em parceria com o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Ao Professor MSc. Eduardo Manoel, por todo o conhecimento e empenho dedicado para a realização desse trabalho, pelos conselhos, pelo carinho e todos os momentos em que pudemos conversar e estar juntos, trabalhar com você foi uma honra.

Agradeço as colegas Alessandra e Larissa por toda a ajuda e apoio durante esses anos de mestrado, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao grupo de pesquisa MSD - UNIVILLE, por todo o apoio e parceria ao longo desse processo, por toda a ajuda e companheirismo em todos os dias do desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus colegas ta turma XX do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, por todas as noites de troca de conhecimento e pizzas. Em especial agradeço a Bruna e Victória que foram as melhores colegas de equipe e com certeza se tornaram amigas para toda a vida.

Aos professores que foram parte importantíssima de todo esse processo ao longo do programa, que contribuiram com conhecimento e também companheirismo e apoio.

Agradeço também a todas as pessoas que fizeram parte dessa pesquisa, que participaram de alguma forma e contribuiram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos membros da banca de qualificação, por toda a dedicação e valiosas contribuições.

A UNIVILLE.

Olhe para o céu agora. Comece
a ler aquele livro agora (...) E
principalmente, seja para você.
AGORA! Não deixe a vida para depois.
Mariana Andrade Argolo

RESUMO

A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) no ano de 2015 confirmou a incidência da dor crônica em 37% da população brasileira estudada, apontando que este é um importante problema de saúde pública. Os pacientes que sofrem com a dor crônica ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho (SIQUEIRA, 2020). Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do schizophyllan (SPG) nas concentrações de 1,0mg/Kg, 3,0mg/Kg, 5,0mg/kg, 10,0mg/Kg e 30,0mg/Kg, em um modelo de dor neuropática - Síndrome da Dor Complexa Regional Tipo I - (SDCR-I) através de medidas do limiar mecânico (empregando filamentos de von Frey pelo método up-and-down), realizar o teste do Rotarod para avaliar os efeitos comportamentais dos animais no 12° e 17° dias e em modelos de dor aguda, nas concentrações de 0,1mg/Kg, 1,0mg/Kg, 3,0mg/Kg, 5,0mg/Kg, 10mg/Kg, 30 mg/kg e 100mg/Kg (Contorções abdominais), e 1,0mg/Kg, 10mg/Kg e 30mg/Kg (Formalina), além de avaliar a presença de estresse oxidativo através da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, proteínas carboniladas e da atividade das enzimas antioxidantes (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD e glutationa peroxidase – GSH-Px) em sangue e nervo ciático, na fase crônica em camundongos de 60 dias. O projeto (CEUA 001/2021) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade da Região de Joinville. Foram realizadas medidas do limiar mecânico em 17 dias consecutivos após a isquemia. Os dados foram coletados e analisados estatisticamente pela ANOVA de uma e duas vias seguida do teste post hoc de Duncan e Bonferroni, respectivamente, quando indicado ($p<0,05$). No ensaio crônico, o SPG mostrou-se promissor nos dias 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14 e 15 para resultados anti-alodiníco mecânico nas concentrações de 1, 3, e 10 mg/kg, sem diferença significativamente estatística entre as concentrações. As concentrações de 5 e 30 mg/kg foram eficazes nos dias 8, 9, 10, 14 e 15. No teste de contorções abdominais as concentrações de 1, 5, 10, 30 e 100 mg/kg do SPG promoveram redução das contorções de, respectivamente, 90,6%, 86,6%, 83,0%, 86,6% e 76,2%. No teste de formalina

nenhuma das concentrações reduziu o tempo de nocicepção de fase I, porém a concentração de 30mg/Kg reduziu 78,06% o tempo de nocicepção de fase II. Os animais não demonstraram sedação em nenhuma das concentrações utilizadas no teste de Rotarod, exceto os animais que receberam 100mg/Kg de SPG. Em relação ao estresse oxidatido, o SPG foi eficaz na atenuação da peroxidação lipídica no sangue, conforme demonstrado pela redução do TBA-RS em 5,0, 10,0 e 30,0 mg/kg. Além disso, SPG nas concentrações de 1,0 e 3,0 mg/kg reverteu parcialmente, 5,0 mg/kg, 10,0 e 30,0mg/kg reverteu e reduziu os aumentos nos níveis de TBA-RS quando comparados ao grupo controle. No nervo ciático, as concentrações de 1,0 e 3,0 mg/kg reverteram parcialmente, 5,0, 10,0 e 30,0 mg/kg reverteram os aumentos nos níveis de TBA-RS, a ponto da maior concentração se assemelhar ao nível dos animais controle, prevenindo de forma intensa e relevante o dano neural pelo estresse oxidativo. SPG nas concentrações de 10,0 e 30,0 mg/kg reverteu a redução do teor de sulfidrila no plasma e na concentração de 10,0 e 30,0 mg/kg SPG reverteu o aumento da atividade de CAT nos eritrócitos. Nas concentrações de 5,0, 10,0 e 30,0 mg/kg o SPG reverteu a diminuição da atividade da SOD observada no nervo ciático, indicando o efeito antioxidante protetor. Para confirmar os resultados promissores obtidos até o momento, no entanto, mais pesquisas são necessárias, abrindo as portas para o desenvolvimento de melhores alternativas terapêuticas para doenças como a SDCR.

Palavras-chave: Dor crônica, Síndrome de dor complexa regional, dor aguda, SPG, polissacarídeo de origem fúngica, *Schizophyllum commune*.

EFFECT OF SCHIZOPHYLLAN POLYSACCHARIDE FROM Schizophyllum commune IN PRE-CLINICAL MODELS OF CHRONIC AND ACUTE PAIN

ABSTRACT

The Brazilian Society for the Study of Pain (SBED) in 2015 confirmed the incidence of chronic pain in 37% of the studied Brazilian population, pointing out that this is an important public health problem. Alerting to the need for research on disability resulting from chronic painful conditions as well as medications for their management. Patients suffering from chronic pain are partially or totally disabled, temporarily or permanently, significantly compromising their quality of life and hindering their ability to work (SIQUEIRA, 2020). Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effect of schizophyllan (SPG) at concentrations of 1.0mg/Kg, 3.0mg/Kg, 5.0mg/Kg, 10.0mg/Kg and 30.0mg/Kg, in a neuropathic pain model - Complex Regional Pain Syndrome Type I - (CRPS-I), perform the Rotarod test to evaluate the behavioral effects of animals on the 12th and 17th days and in models of acute pain, at concentrations of 0, 1mg/Kg, 1.0mg/Kg, 3.0mg/Kg, 5.0mg/Kg, 10mg/Kg, 30 mg/Kg and 100mg/Kg (Abdominal contortions), and 1.0mg/Kg, 10mg/Kg and 30mg/Kg (Formalin), in addition to evaluating the presence of oxidative stress by evaluating the levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS), total content of sulfhydryls, carbonyl proteins and the activity of antioxidant enzymes (catalase - CAT, superoxide dismutase – SOD and glutathione peroxidase – GSH-Px) in blood and sciatic nerve, in the chronic phase in mice aged 60 days. The project (CEUA 001/2021) was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Joinville Region. The animals were anesthetized intraperitoneally with a combination of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg). For CRPS-I induction, an elastic tourniquet was used and maintained around the mouse's left hind paw for 120 minutes. Mechanical threshold measurements were performed (using von Frey filaments by the up-and-down method). The animals received intraperitoneal administration of SPG (concentrations of 1.0 mg/Kg, 3.0mg/Kg, 5.0mg/Kg, 10.0mg/Kg and 30.0mg/Kg). Measurements were performed on 17 consecutive days after ischemia. Data were collected and statistically analyzed by one-way and two-way ANOVA followed by the Duncan and Bonferroni post hoc test, respectively, when indicated ($p<0.05$). In

the chronic trial, SPG showed promise on days 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, and 15 for mechanical anti-allodynic results at concentrations of 1, 3, and 10 mg/kg, without statistically significant difference between concentrations. Concentrations of 5 and 30 mg/kg were effective on days 8, 9, 10, 14 and 15. In the abdominal writhing test, SPG concentrations of 1, 5, 10, 30 and 100 mg/kg promoted a reduction in writhing. , respectively, 90.6%, 86.6%, 83.0%, 86.6% and 76.2%. In the formalin test, none of the concentrations reduced phase I nociception time, but the concentration of 30mg/Kg reduced phase II nociception time by 78.06%. The animals did not demonstrate sedation in any of the concentrations used in the Rotarod test, except for the animals that received 100mg/Kg of SPG. With regard to oxidative stress, SPG was effective in attenuating blood lipid peroxidation, as demonstrated by the reduction of TBA-RS by 5.0, 10.0, and 30.0 mg/kg. Furthermore, SPG at concentrations of 1.0 and 3.0 mg/kg partially reversed, 5.0 mg/kg, 10.0 and 30.0 mg/kg reversed and reduced increases in TBA-RS levels when compared to group control. In the sciatic nerve, concentrations of 1.0 and 3.0 mg/kg partially reversed, 5.0, 10.0 and 30.0 mg/kg reversed increases in TBA-RS levels, to the point where the highest concentration was similar to the level of control animals, preventing neural damage by oxidative stress in an intense and relevant way. SPG at concentrations of 10.0 and 30.0 mg/kg reversed the reduction in plasma sulfhydryl content and at concentrations of 10.0 and 30.0 mg/kg SPG reversed the increase in CAT activity in erythrocytes. At concentrations of 5.0, 10.0 and 30.0 mg/kg, SPG reversed the decrease in SOD activity observed in the sciatic nerve, indicating a protective antioxidant effect. To confirm the promising results obtained so far, however, more research is needed, opening the door to the development of better therapeutic alternatives for diseases such as CRPS.

Keywords: Chronic pain, Complex regional pain syndrome, acute pain, SPG, fungal polysaccharide, *Schizophyllum commune*.

EFECTO DEL POLISACÁRIDO SCHIZOPHYLLAN DE *Schizophyllum Commune* EN MODELOS PRECLÍNICOS DE DOLOR CRÓNICO Y AGUDO

RESUMEN

En 2015, la Sociedad Brasileña para el Estudio del Dolor (SBED) confirmó la incidencia del dolor crónico en el 37% de la población brasileña estudiada, lo que indica que se trata de un importante problema de salud pública. Los pacientes que sufren dolor crónico quedan parcial o totalmente discapacitados, de forma temporal o permanente, comprometiendo significativamente su calidad de vida y dificultando su capacidad de trabajo (SIQUEIRA, 2020). Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto del schizophyllan (SPG) en concentraciones de 1,0mg/Kg, 3,0mg/Kg, 5,0mg/kg, 10,0mg/Kg y 30,0mg/Kg, en un modelo de dolor neuropático - Síndrome de Dolor Regional Complejo Tipo I - (CRPS-I) a través de mediciones del umbral mecánico (utilizando filamentos de von Frey por el método de arriba-abajo), realizar el test Rotarod para evaluar los efectos sobre el comportamiento de los animales en los días 12 y 17 y en modelos de dolor agudo, a concentraciones de 0,1mg/Kg, 1,0mg/Kg, 3, 0mg/Kg, 5,0mg/Kg, 10mg/Kg, 30 mg/kg y 100mg/Kg (Contorsiones abdominales), y 1,0mg/Kg, 10mg/Kg y 30mg/Kg (Formalina), además de evaluar la presencia de estrés oxidativo mediante la evaluación de los niveles de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), contenido total de sulfhidrilos, proteínas carboniladas y actividad de enzimas antioxidantes (catalasa - CAT, superóxido dismutasa - SOD y glutatión peroxidasa - GSH-Px) en sangre y nervio ciático, durante la fase crónica en ratones de 60 días.El proyecto (CEUA 001/2021) fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de la Región de Joinville. Se realizaron mediciones del umbral mecánico durante 17 días consecutivos tras la isquemia. Los datos se recogieron y analizaron estadísticamente mediante ANOVA unidireccional y bidireccional, seguidos de la prueba post hoc de Duncan y Bonferroni, respectivamente, cuando se indicó ($p<0,05$). En el ensayo crónico, el SPG se mostró prometedor en los días 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14 y 15 para los resultados de antialodinia mecánica en concentraciones de 1, 3 y 10 mg/kg, sin diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones. Las concentraciones de 5 y 30 mg/kg fueron eficaces

los días 8, 9, 10, 14 y 15. En la prueba de contorsiones abdominales, las concentraciones de 1, 5, 10, 30 y 100 mg/kg de SPG promovieron una reducción de las contorsiones de, respectivamente, 90,6%, 86,6%, 83,0%, 86,6% y 76,2%. En la prueba de formalina, ninguna de las concentraciones redujo el tiempo de nocicepción de la fase I, pero la concentración de 30mg/Kg redujo un 78,06% el tiempo de nocicepción de la fase II. Los animales no mostraron sedación en ninguna de las concentraciones utilizadas en la prueba Rotarod, excepto los animales que recibieron 100mg/Kg de SPG. En cuanto al estrés oxidativo, el SPG fue eficaz para atenuar la peroxidación lipídica en sangre, como demostró la reducción de TBA-RS a 5,0, 10,0 y 30,0 mg/kg. Además, el SPG en concentraciones de 1,0 y 3,0 mg/kg revirtió parcialmente, 5,0 mg/kg, 10,0 y 30,0mg/kg revirtió y redujo los aumentos de los niveles de TBA-RS en comparación con el grupo de control. En el nervio ciático, las concentraciones de 1,0 y 3,0 mg/kg revirtieron parcialmente, 5,0, 10,0 y 30,0 mg/kg revirtieron los aumentos de los niveles de TBA-RS, hasta el punto de que la concentración más alta se asemejó al nivel de los animales de control, previniendo de forma fuerte y relevante el daño neural por estrés oxidativo. El SPG en concentraciones de 10,0 y 30,0 mg/kg invirtió la reducción del contenido de sulfhidrilo en el plasma y en concentraciones de 10,0 y 30,0 mg/kg el SPG invirtió el aumento de la actividad CAT en los eritrocitos. En concentraciones de 5,0, 10,0 y 30,0 mg/kg el SPG invirtió la disminución de la actividad de la SOD observada en el nervio ciático, lo que indica el efecto antioxidante protector. Sin embargo, para confirmar los prometedores resultados obtenidos hasta ahora, es necesario seguir investigando, lo que abriría la puerta al desarrollo de mejores alternativas terapéuticas para enfermedades como el SDRC.

Palabras clave: Dolor crónico, síndrome de dolor regional complejo, dolor agudo, SPG, polisacárido de origen fúngico, Schizophyllum commune.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Torniquete elástico na pata esquerda do camundongo……..47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos nociceptores, conforme tipo de fibra, tamanho, velocidade da condução e função…….27

ABREVIATURAS

CAT: Catalase

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPIC: Dor pós isquemia crônica

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GSH: Glutationa

GSH-Px: Glutationa Peroxidase

RNA: Ácido Ribonucleico

SDCR: Síndrome da Dor Complexa Regional

SDCR – I: Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I

SH: Sulfidrilas

SPG: Schizophyllan

SOD: Superóxido Dismutase

TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGO: Transaminase oxalacética

TGP: Transaminase pirúvica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

2 OBJETIVOS **22**
2.1 Objetivo geral 22
2.2 Objetivos específicos 22

3 REVISÃO DE LITERATURA **23**
3.1 Dor 23
3.1.2 Transmissão do estímulo doloroso 24
3.1.3 Nociceptores 26
3.1.4 Fisiopatologia da dor 28
3.1.5 Dor aguda 29
3.1.6 Dor crônica 29
3.1.7 Síndrome da Dor Complexa Regional – SDCR 30
3.1.8 Isquemia - reperfusão 34
3.1.9 Alodinia e Hiperalgesia 36
3.2 Radicais Livres 37
3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) 38
3.4 Estresse oxidativo 40
3.4.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação 40
3.4.2 Danos às proteínas 41
3.4.3 Danos ao DNA 42
3.5 Schizophyllum commune 43
3.6 Polissacarídeos de origem fúngica e suas propriedades medicinais 43
3.7 Toxicidade hepática e renal 45

4 METODOLOGIA **46**
4.1 Produção, extração, purificação e caracterização do polissacarídeo 46
4.2 Modelo Animal 47
4.3 Modelo de indução de dor associado à isquemia - reperfusão 47
4.4 Modelo crônico 48
4.5 Testes para avaliar o desenvolvimento da dor 49
4.5.1 Teste de von Frey (estímulo mecânico) 49
4.9 Modelo agudo 49
4.9.1 Teste de contorções abdominais 50
4.9.2 Teste de formalina 50
4.9.3 Teste Rotarod 51
4.10 Estudos bioquímicos e preparo das amostras 51
4.10.1 Sacrifício dos animais 51
4.10.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma 51

4.10.3 Preparação do nervo ciático 52
4.10.4 Preparação de tecido para análise histopatológica 52
4.11 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo 52
4.11.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) 52
4.11.2 Conteúdo Total de Sulfidrilas 53
4.11.3 Catalase 53
4.11.4 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) 54
4.11.5 Superóxido Dismutase (SOD) 54
4.12 Investigação de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade de SPG 54
4.13 Análise histológica 55
4.14 Análise estatística 55

5 INTERDISCIPLINARIDADE 56

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES 58
6.1 Artigo 58

1 INTRODUCTION 62

2 MATERIALS AND METHODS 63
2.1 Production, extraction, purification, and characterization of the polysaccharide 63
2.5 Animals 64
2.6 CRPS-I ischemia-reperfusion model 65
2.7 Chronic model 65
2.8 von Frey test (mechanical stimulus) 66
2.10 Acute model 66
2.10.1 Writhing test 66
2.10.2 Formalin test 67
2.10.3 Rotarod Test 67
2.11 Samples Preparation 68
2.8 Biochemical studies 69
2.9 Histopathological analysis 71
2.10 Statistical analysis 71

3 RESULTS 71
3.1 Effect of the administration SPG on the writhing test 72
3.2 Effect of acute and chronic administration of SPG on rotarod test 73
3.3 Effect of the administration of SPG on the formalin test 74
3.4 Effect of the administrations of SPG on chronic post-ischemia-induced mechanical allodynia 75
3.5 Chronic effect of the administration of SPG on the alterations in the blood oxidative stress parameters caused by a model of regional complex pain syndrome (CRPS) 78

3.6 Chronic effect of the administration of SPG on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters caused by a model of regional complex pain syndrome (CRPS) 79
3.7 Investigation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of SPG 80

4 DISCUSSION 82

5 REFERENCES 92

6 REFERÊNCIAS 102

1 INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 40% do total da população mundial sofre de alguma forma de dor crônica. Em um estudo realizado no Brasil pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) no ano de 2015 confirmou a incidência da dor crônica em 37% da população estudada, apontando que este é um importante problema de saúde pública. Os pacientes que sofrem com a dor crônica ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho (KRELING, CRUZ e PIMENTA, 2006; GARCIA, VIEIRA e GARCIA, 2013; SIQUEIRA, 2020).

A dor aguda atua como um sinal de alerta, que leva à procura por um tratamento. A SBED, em seu relatório de 2010, enumerou diversas condições e doenças que causam dor aguda. Entre os problemas decorrentes da dor aguda, pode ser destacado o subtratamento, fazendo com que pacientes sofram sem necessidade (SBED, 2010; BENHAMOU, 2008).

Dentre os tipos de dor, estão as Síndromes de dor regional complexa (SDCR), que são doenças multifatoriais com etiologia e patogênese complexa (ÁLVARES et al., 2009). A SDCR se caracteriza como um quadro de dor intensa, associada a alterações sensitivas e motoras, podendo surgir de forma espontânea ou após algum tipo de trauma ou lesão (SILVA et al., 2018). A gestão da SDCR é um desafio, em parte devido à falta de dados clínicos sobre a eficácia das várias terapias, e também porque o sucesso do tratamento da SDCR requer uma abordagem multidisciplinar, adaptada ao paciente (AHMAD e KUMAR, 2015).

Alterações sensitivas comuns da SDCR incluem hiperalgesia, alodinia, disestesia, hiperestesia, além da sensibilização central e os sinais clínicos mais presentes são a diferença de temperatura e coloração da pele (SILVA et al., 2018). Azambuja et al. (2004) evidenciam que o diagnóstico da SDCR é principalmente clínico, sendo que sua principal manifestação é a dor regional do indivíduo, pois atualmente ainda não se fazem presentes exames diagnósticos objetivos com especificidade e sensibilidade suficientes para serem utilizados na prática clínica.

Por se tratar de doença complexa, tendo diversas propostas terapêuticas, não há um protocolo padrão definido para o tratamento da SDCR, sendo necessário realizar associações de técnicas e medicamentos (BORTAGARAY et al, 2019). Apesar dos analgésicos da classe dos anti-inflamatórios não esteróides estarem entre os fármacos mais vendidos em todo mundo, com um mercado de cerca de 25 milhões de dólares anualmente, o monitoramento farmacológico eficaz de alguns tipos de dor segue se mostrando instigante para a comunidade médico-científica (ELY et al., 2015). Dessa maneira, limitações relacionadas principalmente à falta de eficácia e ao desenvolvimento de efeitos adversos ainda são apresentadas pelos fármacos utilizados no tratamento de dores crônicas associadas a inflamação ou neuropatia (FINNERUP et al., 2015).

Devido ao exposto, tem se dado ênfase à procura de novos alvos moleculares para o tratamento da dor. No processo de busca por novos fármacos analgésicos, a pesquisa pré-clínica é importante para a definição de caminhos e minimização de riscos, sendo fundamental na busca dos mecanismos envolvidos na doença, a fim de propor terapias mais eficazes e seguras (AHMAD e KUMAR, 2015).

Polissacarídeos de origem fúngica já foram descritos na literatura para tratamentos diversos, sendo que um deles, as β-(1→3)-glucanas está associado à ativação do sistema imune, e por este motivo estas moléculas podem ser novos alvos para o tratamento de síndromes e dores complexas (KHOURY et al., 2012).

O *Schizophyllum commune*, encontrado comumente em madeira apodrecida, principalmente em estações chuvosas nas florestas tropicais e subtropicais, é uma das espécies de *Schizophyllum* conhecidas principalmente por serem comestíveis, além disso a literatura indica que este macrofungo possui características anticarcinogênicas, antitumorais e propriedades imunomoduladoras (AINSWORTH, 2008; BRADY et.al 2005; PATEL; GOYAL, 2011).

O esquizofilian (SPG), exopolissacarídeo produzido pelo *Schizophyllum commune,* vem sendo utilizado em vacinas, terapias anticancerígenas, bioativo em cosméticos, filmes impermeáveis, hidrogel para conservação e alimentos além de ser aprovado como um medicamento para o tratamento do câncer cervical, pulmonar e gástrico no Japão (DING et al., 2020; SHOAIB et. al, 2020; HAMEDI et. al., 2020).

Yao e colaboradores (2016) relataram em seu trabalho desenvolvido a partir de ácidos fenólicos isolados de *S. commune* que em testes de contorções

abdominais algumas frações reduziram em até 71% o número de contorções em camundongos e, após a realização do teste da formalina, que leva a uma dor neurogênica seguido por dor inflamatória, a intra-aplicação peritoneal dos três compostos isolados foram responsáveis pela diminuição tanto das respostas de dor neurogênica quanto de dor inflamatória. Smirdele et al (2008) e Baggio et al (2010) indicaram a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do β-glucano (1→3),(1→6) isolado de *Pleurotus pulmonarius*, um macrofungo da mesma classe do *S .commune* em modelos de dor aguda (contorções induzidas por ácido acético e teste da formalina), que promoveu redução significativa do tempo de nocicepção com a dose de 30mg/Kg.

Considerando o potencial anti-inflamatório e analgésico do *S. commune* (BAGGIO et al., 2010; YAO et al., 2016; DALONSO et al., 2021) e a relativa dificuldade de controlar a dor da Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I (SDCR – I), é possível que substâncias derivadas desse macrofungo constituam uma alternativa eficaz e segura em amenizá-la, além de investigar o possível efeito antinociceptivo sobre diferentes tipos de dor, pesquisa esta iniciada no presente estudo de modo pré-clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do SPG extraídos de Schizophyllum *commune* na dor aguda e dor crônica neuropática observada em um modelo de síndrome da dor complexa regional (SDCR) em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a presença de estresse oxidativo, na fase crônica, no modelo de SDCR causando nocicepção em sangue e nervo ciático de camundongos.
b) Verificar se o SPG, em diferentes concentrações, tem a capacidade de minimizar o estresse oxidativo, na fase crônica do modelo utilizado para reprodução da SDCR em sangue e nervo ciático de camundongos.
c) Avaliar a existência de efeito analgésico para o SPG extraído de *S. commune* nos modelos de contorções abdominais e de formalina em diferentes concentrações.
d) Avaliar a existência de efeito analgésico para o SPG extraído de *S. commune* no modelo de alodinia mecânica com os filamentos de von Frey em diferentes concentrações.
e) Analisar o efeito do SPG extraído de *S. commune* na coordenação neuromuscular de camundongos utilizando o teste rotarod.
f) Avaliar a existência de toxicidade renal e hepática através de análise histológica e bioquímica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dor

Segundo a teoria dualista de Descartes, em seu manuscrito *Treatise of Man* publicado em 1664, a dor é explicada como sendo um fenômeno que conecta o corpo (material) e a alma (imaterial), descrevendo a dor como uma percepção que ocorre no cérebro e se distingue entre a transdução sensorial, hoje conhecida como nocicepção, e a experiência sensitiva da dor, sendo um distúrbio que inicia em alguma extremidade e é levado até o cérebro. Descartes também concebeu a ideia da existência de fibrilas associadas a movimentação, como se a sensação de um puxão fosse sentida no cérebro através dessas fibrilas. Acreditava que a intensidade dessa movimentação fornecia a informação correta ao cérebro, que fazia o indivíduo ter alguma sensação. Apesar de sua parcialidade, a teoria de Descartes abriu caminho para que o mecanismo da dor pudesse ser explicado no futuro.

O conceito moderno de um caminho que leva a dor ou Teoria da Especificidade foi desenvolvido por Charles Bell em sua publicação, *Idea of a New Anatomy of the Brain,* no ano de 1811. Nesta publicação foi sugerido uma nova organização do sistema nervoso, fornecendo evidências anatômicas de que o cérebro é uma estrutura heterogênea e que existem diferentes tipos de receptores sensoriais, sendo cada um responsável por um tipo de estímulo (REY, 1995). Essa teoria afirma que a dor é "uma sensação específica, com seu próprio sistema sensorial, independente do tato e de outros sentidos" (PERL, 2007; CHEN, 2011). Entretanto, o primeiro a formular a teoria da especificidade de forma definitiva em 1849 foi Moritz Schiff, fisiologista alemão, que demonstrou que as sensações recebidas pelo cérebro vinham de caminhos distintos (REY, 1995; PERL, 2007). A teoria de Schiff posteriormente foi corroborada pelos estudos de Max von Frey, que descreveu as terminações nervosas na pele, responsáveis por reconhecer intensidades e estímulos distintos (CHEN, 2011; MOYAEDI e DAVIS, 2013).

A teoria da especificidade avançou entre os anos de 1894 e 1896 quando Max von Frey realizou experimentos que indicavam quatro sentidos somatossensoriais, frio, calor, toque e dor, e que a partir desses, outros eram

derivados (REY, 1995). Para testar esses estímulos o pesquisador desenvolveu os filamentos de Von Frey, também chamado de estesiômetro, que consistia em um fio de cabelo humano ou animal preso a uma vareta de madeira. Com a utilização destes pêlos pôde determinar a força necessária para causar alguma sensação na pele (PEARL, 1996). Um estudo realizado por Burgess e Pearl, publicado em 1967, aplicando micro eletrodos na pele de gatos, demonstrou a existência de fibras mielinizadas que respondiam a estímulos mecânicos na pele.

A definição contemporânea de dor utilizada pela Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) tem como base a definição multidimensional de dor proposta por Melzack e Casey em 1968, que aborda essa sensação de interação entre dimensões afetiva, discriminativa e cognitiva da dor.

De acordo com a IASP, no ano de 1979, a dor foi definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos teciduais reais ou potenciais, ou descrita em termos de tais danos”. Porém, no ano de 2020 foi aceita uma nova definição baseada na proposta por diversos especialistas da área e a dor passou a ser caracterizada como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020).

O alívio e tratamento da dor tem sido amplamente debatidos no âmbito da saúde e aceito como um direito humano por muito tempo. Em 2004 a afirmação "o alívio da dor deve ser um direito humano" trouxe um grande impacto, atingindo diversas publicações, após o lançamento da Campanha Global Contra a Dor em 2004, endossado pela IASP, Federação Europeia dos Capítulos da IASP (EFIC) e da Organização Mundial da Saúde (OMS).

A dor é uma experiência pessoal, embora tenha um papel adaptativo, ela é influenciada por fatores biológicos, sociais e psicológicos, podendo ser sentida em diversos níveis e normalmente sendo a descrição verbal um dos principais fatores para a identificação e expressão da dor, porém o fato de não poder se comunicar verbalmente não anula a possibilidade de sentir a dor e, por isso, existem diversas formas de expressar e medir a dor de forma comportamental (RAJA et al., 2020).

3.1.2 Transmissão do estímulo doloroso

A capacidade de um indivíduo perceber algum estímulo potencialmente nocivo ao organismo (nocicepção) que pode levar a dor ocorre por três eventos, sendo eles a transmissão, transdução e a modulação, que ocorre quando há algum estímulo nocivo (YAM et al., 2018).

A dor pode ser percebida em dois diferentes estágios: o primeiro, denominado nocicepção, refere-se à transformação do estímulo doloroso ao sistema nervoso central (SNC) por receptores especializados, denominados nociceptores. O próximo estágio se refere ao processamento dessa informação nociceptiva recebida, levando a percepção consciente dessa dor (VITOR et al., 2008).

A dor comparada à nocicepção, refere-se ao produto do processamento realizado pelo cérebro e envolve a experiência emocional e sensorial desagradável que foi gerada a partir de sinais nervosos. Relatos acerca da dor, não se relacionam apenas diretamente a partir da nocicepção, envolvem interação com inúmeras entradas, como dimensões afetivas, variáveis autonômicas, variáveis imunológicas, entre outras (LOESER; MELZACK, 1999).

A transdução ocorre seguindo a via nociceptiva, onde um estímulo mecânico, químico ou térmico é levado as fendas sinápticas e convertidos em um estímulo elétrico, ocasionando a mudança na membrana, alterando a permeabilidade dos íons, fazendo com que esses eventos elétricos que chegam aos neurônios sejam traduzidos em potencial de ação ou pulso elétrico (OLIVEIRA et al., 2016; YAM et al., 2018; MACHADO, 2022).

A transmissão ocorre por meio de estímulos elétricos encaminhados ao longo dos neurônios pela medula espinhal até o tronco encefálico e tálamo, chegando ao córtex, enquanto os neurotransmissores na fenda sináptica transmitem informações de um terminal pós-sináptico de uma célula para um terminal pré-sináptico de outra, causando a sensação de dor (MOFFAT & RAE, 2010; YAM et al., 2018; MACHADO, 2022).

Na etapa de modulação ocorre a ampliação ou atenuação dos estímulos nociceptivos recebidos, executado no corno posterior, região onde se localizam os neurônios sensitivos, fazendo com que ocorra a finalização de todo o percurso por onde o estímulo é transmitido até a sensação de dor (VITOR et al., 2008; YAM et al., 2018).

3.1.3 Nociceptores

O primeiro relato de pesquisa acerca dos nociceptores foi feito por Sherrington (1903), que relatou em seu trabalho a presença de receptores que captam os estímulos nocivos, diferenciados de outros tipos de terminações nervosas presentes no mesmo local da pele, ele percebeu que reflexos nociceptivos e a percepção da dor estavam ligados.

Estímulos que causam dano tecidual, seja pela aplicação de pressão, temperaturas extremas ou produtos químicos são chamados de estímulos nocivos, estes estímulos são captados pelos nociceptores (SNEDDON, 2018). Diversos estudos identificaram diferentes tipos de nociceptores somatossensoriais, tanto na parte externa dos organismos de mamíferos quanto nos órgãos internos (MANTYH, 2014; OMERBAŁIć et al., 2015).

Nociceptores são terminações nervosas do sistema nervoso periférico (SNP), responsáveis pela detecção e transmissão de estímulos dolorosos e são divididos de acordo com o seu diâmetro, mielinização e velocidade de condução das fibras cutâneas, separadas em três grupos (Quadro 1): Aβ, Aδ e C (WILLIS; COGGESHALL, 2004). Belmonte e Cervero (1996) relataram que, em condições fisiológicas normais, estas fibras podem transmitir informações não nocivas, porém apenas as fibras Aδ e C são responsáveis por transmitir a informação nociceptiva, sendo a Aδ responsável pela transmissão da dor aguda e imediata, seguida por uma dor difusa provocada pelos nociceptores C, que são de condução mais lenta. Em condições onde há presença de dano tecidual ou lesão dos nervos, podem ocorrer alterações anatômicas e/ou neuroquímicas nos neurônios Aβ fazendo com que estes passem a transmitir a dor (BELMONTE; CERVERO, 1996).

Dubin e Patapoutian (2010) relataram a liberação de uma variedade de substâncias pelos nociceptores, a partir de seus terminais centrais, que têm o potencial de ativar neurônios de segunda ordem por meio de diversos tipos de mecanismos, sendo a transmissão sináptica rápida e lenta mediada em grande parte por glutamato e peptídeos, respectivamente.

A proximidade dos membros do corpo a uma superfície quente ou fria, exposição a pressão ou compressão intensa e também a produtos químicos, pode resultar em uma resposta somatotópica em menos de um segundo. A

ativação de nociceptores requer que estímulos adequados despolarizem terminais periféricos com amplitude e duração suficientes, garantindo que, apesar de qualquer atenuação e desaceleração do potencial receptor por propagação passiva entre os locais de transdução, as informações sejam codificadas através dos impulsos resultantes (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; COLLOCA et al., 2017).

A dor nociceptiva pode ser categorizada em dois tipos, dor somática profunda e dor superficial. As fibras Aδ e C são encontradas principalmente em órgãos superficiais, como a pele, enquanto outras estruturas profundas, como músculos e articulações, são supridas principalmente por fibras C. As fibras Aδ são ativadas sob estímulos térmicos ou mecânicos e resultam em uma sensação de dor de curta duração, já a ativação das fibras C é estimulada por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos, o que muitas vezes resulta em uma sensação de dor incômoda (YAM et al., 2018).

As fibras Aδ que terminam nas Lâminas de Rexed I e V de categoria III aferente, são os menores nervos mielinizados, correspondendo a cerca de 2 a 6 µm, e tendo sua velocidade de transmissão em aproximadamente 30 m/s, sendo considerada uma resposta rápida, relacionada a uma dor de curta duração (BASBAUM et al., 2009; DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010).

Os neurônios do tipo Aβ são mecanorreceptores considerados de baixo limiar cutâneo, respondem a toques leves, detectando texturas e vibrações, se projetam para as lâminas mais profundas (III, IV e V). São estes os neurônios responsáveis pela detecção de estímulos nos folículos capilares, células de Merkell e corpúsculos de Pacini (BASBAUM et al., 2009).

Quadro 1. Classificação dos nociceptores, conforme tipo de fibra, tamanho, velocidade da condução e função.

Tipo de fibra	Diâmetro	Mielinização	Velocidade de condução
Aδ C Aβ	2-6 µm 0,4-1,2 µm >10 µm	Fina Ausente Grossa	12-30 m/s 0,5-2 m/s 30-100 m/s

Os receptores dos neurônios aferentes primários são responsáveis por três funções: excitatória, inibitória e sensibilizadora. Assim que ocorre a estimulação e os neurônios atingem o limiar de dor, os impulsos resultantes são transmitidos através do SNP (YAM et al., 2018).

Os nociceptores podem dar origem a dor e seus caminhos e propriedades relacionados à dor humana já foram extensamente confirmados, utilizando diversas abordagens e experimentos (MEYER et al., 2006). Por outro lado, existem evidências de que os nociceptores podem ser ativados na ausência da percepção da dor, como um mecanismo de proteção do organismo (BALIKI; APKARIAN, 2015).

3.1.4 Fisiopatologia da dor

A percepção da dor é um problema complexo, não apenas físico mas também de grande influxo emocional, influenciado por fatores culturais, sociais e psicológicos (IASP, 2014). A dor é uma experiência subjetiva, normalmente relatada pelo paciente, podendo ser crônica, aguda, intermitente ou ainda uma combinação delas (GOLDBERG; MCGEE, 2011). A dor clínica pode ser classificada em três tipos: nociceptiva, neuropática e inflamatória, baseando-se em seus mecanismos e sintomas (YAM et al., 2018).

A dor nociceptiva é a resposta dos mecanismos do sistema nervoso à estímulos potencialmente perigosos ao nosso corpo. As terminações nervosas ativadas por meio desse mecanismo são conhecidas como nociceptores e são responsáveis pelo primeiro estágio da dor (MA; ZHANG, 2011).

Por sua vez, a dor neuropática ocorre a partir de uma lesão ao sistema nervoso central e/ou periférico, associada a aparição de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia mecânica e por frio, uma sensibilização da dor que resulta em uma estimulação repetitiva dos receptores. Esse tipo de dor se estende por um grande período de tempo, sendo muitas vezes irreversível (YAM et al., 2018; COLLOCA et al., 2017).

Naidu & Pham (2015) explicaram que a dor inflamatória consiste na sensibilização do sistema de percepção sensorial devido a danos ocasionados aos tecidos que levam a inflamação, com isso alterando a fisiologia e assim,

diminuindo a capacidade discriminatória de nociceptores periféricos, fazendo com que também ocorra o aumento da sensibilidade estimulatória e dor espontânea.

3.1.5 Dor aguda

Normalmente a dor aguda ocorre imediatamente após algum estímulo doloroso e por um período de tempo curto, normalmente é mediada pelas fibras Aδ. A dor aguda pode contribuir para o desenvolvimento da dor crônica, provocando intercorrências tanto físicas como psicológicas aos pacientes, desencadeando um maior tempo de recuperação e maior facilidade em desenvolver complicações posteriores (YAM et al., 2018; WILLIAMSON e STRAM, 2019).

A dor aguda é vista como um sinal de alerta, que leva à procura por um tratamento. A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), em seu relatório de 2010, enumerou diversas condições e doenças que causam dor aguda, podendo ser destacado o subtratamento, fazendo com que pacientes sofram sem necessidade (BENHAMOU, 2008; SBED, 2010).

O manejo desse tipo de dor deve ser guiado pelo relato do paciente, sendo que, quando indicado um nível maior do que uma dor leve, esse paciente é estabelecido como alguém necessitando de alguma intervenção (MOORE; STRAUBE; ALDINGTON, 2013).

3.1.6 Dor crônica

De acordo com estimativas da OMS, cerca de 40% do total da população mundial sofre de alguma forma de dor crônica, valor também reportado em um estudo realizado no Brasil, apontando que este é um importante problema de saúde pública (GARCIA, VIEIRA e GARCIA, 2013; SBED, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), estudos feitos em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram uma prevalência de 30 a 50% de pacientes que relataram dor crônica. Os pacientes ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida e dificultando a

capacidade de trabalho (KRELING, CRUZ e PIMENTE, 2006; GARCIA, VIEIRA e GARCIA, 2013; SIQUEIRA, 2020).

A dor crônica pode ser considerada como um diagnóstico contínuo, sendo atualizado a cada novo sintoma e tratamento recebido pelo paciente, afetando a sua vida social e psicológica em diferentes níveis, sendo um tratamento adequado e um diagnóstico eficiente são de extrema importância para que sejam tomadas as melhores decisões de tratamento (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021).

Uma nova classificação para a dor crônica foi desenvolvida pela IASP, distinguindo doenças crônicas primárias e síndromes de dor secundária crônica, integrando dores que contenham diagnóstico como as dores de cabeça, e fornecendo melhores definições de cada um dos diagnósticos, incluindo a gravidade da dor, seu curso temporal e evidências de fatores psicológicos e sociais (TREEDE et al., 2015).

3.1.7 Síndrome da Dor Complexa Regional – SDCR

A Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) foi descrita pela primeira vez pelo médico Ambroise Paré, no século XVII, após realizar o tratamento do rei francês Charles IX, acerca de uma síndrome de dor intensa e persistente, ocorrida após uma flebotomia de membro. Posteriormente, Silas Weir Mitchell, considerado o pai da neurologia, tornou-se o responsável por descrever detalhadamente a SDCR no ano de 1864 (LAU & CHUNG, 2004).

Barros (2017) descreve em seu trabalho que Mitchell dedicou-se em seus primeiros anos de carreira a auxiliar soldados feridos por tiros, que possuíam lesões nos nervos periféricos durante a Guerra Civil Americana. Dentre as doenças descritas por ele, destaca-se uma síndrome, caracterizada por dor crônica, descrita como queima localizada distalmente ao local da lesão do nervo periférico. Essa descrição realizada por Mitchell foi sugestiva e descreveu minuciosamente os sinais e sintomas da doença hoje conhecida como SDCR.

Wolff (1877), descreveu a causalgia pela primeira vez como uma entidade dolorosa crônica sem causa neurológica, acompanhada de alterações vasomotoras até então desconhecidas.

O termo SDCR foi descrito com a finalidade de explicitar as características da doença. A palavra síndrome indica que os sinais e sintomas da SDCR são

caracterizados por uma série de eventos distintos que se relacionam entre si; dor é um elemento que se faz presente e é essencial para o diagnóstico da síndrome, sendo ela espontânea ou evocada, como alodínia e hiperalgesia; complexa, pois expressa as diversas características clínicas que afetam um indivíduo ao longo do tempo, assim como as características acerca de alterações autonômicas, cutâneas, motoras e distróficas, além de inflamatórias; regional, refere-se ao fato de que a maioria dos casos envolvem uma região específica do corpo, não obstante a dor possa expandir-se para outras áreas além da lesão inicial (STANTON-HICKS et al., 1995; BARROS, 2017) .

SDCR-I são doenças multifatoriais com etiologia e patogênese complexa e distintas. A gestão da SDCR é um desafio, em parte, devido à falta de dados clínicos sobre a eficácia das várias terapias, já que o sucesso do tratamento da SDCR requer uma abordagem multidisciplinar, adaptada ao paciente, dado que não existe um protocolo padrão (ÁLVARES et al., 2009; AHMAD e KUMAR, 2015).

A dor em SDCR é muitas vezes descrita como 'queimação', dor neuropática típica (ÁLVARES et al., 2009). A pesquisa em terapias, especificamente em SDCR, tem sido escassa. O tratamento para essas síndromes foi amplamente baseado em estratégias terapêuticas adaptadas de estados de dor neuropática; no entanto, um maior entendimento da patogênese da SDCR tem proporcionado a oportunidade de desenvolver tratamentos baseados no mecanismo. Embora o entendimento fisiopatológico tenha melhorado, nem todos os aspectos da SDCR têm sido explorados. Os sintomas típicos de SDCR são sensoriais, motores e disfunções autonômicas. Na maioria dos casos, a SDCR ocorre após uma fratura, trauma de membros ou lesão do SNP ou central, porém, algumas vezes os sintomas se desenvolvem sem qualquer trauma (GIERTHMUHLEN et al., 2014).

A forma aguda de SDCR mostra sinais clínicos de inflamação e, apesar da patogênese ainda não ser clara, Schinkel et.al (2006) demonstraram evidências de reações associadas à inflamação em pacientes. Conceitos fisiopatológicos recentes consideram basicamente três mecanismos principais: reforço da inflamação neurogênica periférica, disfunção do sistema nervoso simpático, e reorganização estrutural no sistema nervoso central. Além disso, a predisposição genética pode explicar o aumento da vulnerabilidade. O tratamento geralmente

requer uma abordagem multidisciplinar, incluindo terapias médicas e não médicas (STANTON-HICKS et al., 1998; SCHLERETH e BIRKLEIN, 2008).

Existem dois tipos de SDCR, a do tipo I, também conhecida como Distrofia Simpático Reflexa (DSR), ocorre quando a dor é desenvolvida a partir de um trauma em uma extremidade, sem que ocorra a lesão do nervo no local. E a do tipo II que se difere do tipo I pois ocorre a lesão nervosa, mesmo que em baixa quantidade, mas o suficiente para confirmar o diagnóstico da causalgia. No tipo II, geralmente ocorre a lesão do nervo periférico localizado na parte distal ao gânglio da raiz dorsal, porém os casos acometidos por uma lesão da raiz nervosa são extremamente raros (FELIU; EDWARDS, 2010; BRATTI, 2011, PARK et al, 2018).

A fisiopatologia da SDCR foi relacionada com a geração de radicais livres pela cadeia respiratória mitocondrial. Foi observado o aumento de malondialdeído, desidrogenase lática, ácido úrico e superóxido dismutase em soro e saliva de pacientes portadores de SDCR em comparação com pacientes controle (CODERRE et al., 2004; EISENBERG et al., 2008; TAHA; BLAISE, 2012).

Coderre e Bennett (2008), utilizando o modelo de isquemia/reperfusão para indução de SDCR-I detectaram níveis elevados de malondialdeído nos músculos da pata traseira de ratos, demonstrando que a hipersensibilidade à dor do animal é reduzida por meio da terapia antioxidante.

Essa doença atualmente se classifica em três estágios, sendo eles o agudo, que ocorre nos primeiros dias até o terceiro mês, distrófica do terceiro ao sexto mês e atrófica a partir dos seis meses até, aproximadamente, um ano após o evento traumático (MENCK; REQUEJO; KULIG, 2000).

Bullen, Lang e Tran (2016) apresentaram critérios para diagnosticar de forma mais precisa os pacientes com SDCR-I, de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, validados em 2007 e chamados de Critérios de Budapeste: dor contínua e desproporcional à injúria, possuir pelo menos um dos sintomas (vasomotor, sensorial, sudomotor/edema ou motor/trófico), apresentar um dos sinais e duas ou mais categorias (vasomotor, sensorial, sudomotor/edema ou motor/trófico) e não se encaixar em outro tipo de diagnóstico de acordo com os sinais e sintomas demonstrados pelo paciente (BULLEN; LANG; TRAN, 2016).

Os pacientes que sofrem com SDCR-I muitas vezes experimentam disfunção sensorial distinta, como alodinia mecânica e térmica (quente e fria), essas disfunções são os principais sintomas desagradáveis de difícil controle (GIERTHMUHLEN et al., 2014).

Goebel e colaboradores (2021), relatam adaptações a taxonomia realizada acerca de novos estudos, assim sendo definidos novos critérios de diagnóstico pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para a síndrome, sendo considerado que até o momento não existem evidências suficientes para a criação de subtipos entre SDCR quente ou fria.

Por ser uma doença complexa e de difícil diagnóstico, não existe um protocolo padrão para o tratamento da SDRC, pois cada paciente responde de uma maneira específica a cada tipo de tratamento e, em vários casos, é necessário combinar diferentes terapias, realizando um atendimento multiprofissional para atingir um bom resultado (BORTAGARAY et al., 2019).

Neumeister e Romanelli (2020) relatam opções farmacológicas para o alívio das dores crônicas, incluindo os antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação da serotonina e antidepressivos tricíclicos), anticonvulsivantes devido sua capacidade de estabilizar os neurônios hiperexcitáveis, aplicação intravenosa de cetamina e uso tópico em gel, assim como, bloqueadores dos canais de cálcio que estabilizam a membrana celular, podendo resultar no alívio da dor.

Elsharydah e colaboradores (2017), realizaram um grande estudo populacional nos Estados Unidos utilizando um banco de dados entre os anos de 2007 e 2011, tendo um número total de 33.406.123 pacientes, sendo destes 22.533 diagnosticados com SDCR do tipo I, chegando a porcentagem de incidência estimada durante o período de 0,07%, sendo mais comum entre as mulheres (73%) e na faixa etária de 45 a 55 anos. Outros fatores que influenciaram no aumento da incidência foram dores de cabeça, abuso de drogas e depressão.

Um estudo realizado por Drummond (2010), utilizando uma base populacional dos Estados Unidos, retrata a ocorrência de 5,5 casos a cada 100.000 habitantes/ano, com identificação de 20.000 a 80.000 casos novos por ano.

Uma pesquisa desenvolvida por Mos e colaboradores (2007) na Noruega relatou a ocorrência de 26,2 casos a cada 100.000 pessoas, sendo que as

mulheres possuíam 3 vezes mais chances de desenvolver um quadro de SDCR, sendo que em 60% dos casos são afetados os membros posteriores, quanto às causas, as fraturas foram responsáveis por cerca de 45%, enquanto entorses (18%) e cirurgias eletivas (12%) fazem parte dos eventos principais desencadeantes relatados. Em uma proporção de 5:1 a 6:1, as mulheres podem desenvolver um fenótipo grave e, além disso, têm maiores chances de não terem um diagnóstico correto, dificultando o manejo da dor (MOS et al., 2009).

A fisiopatologia da SDRC permanece incerta, pois ainda não há consenso sobre seus mediadores primários e secundários responsáveis por causar as alterações observadas, e nem se todos os casos de SDRC compartilham da mesma fisiopatologia subjacente. Embora existam muitos avanços e pesquisas acerca da compreensão da SDRC, por mais que existam evidências na literatura apontando para possíveis componentes inflamatórios, doenças autoimunes e plasticidade neuronal, o mecanismo exato do início da doença e a progressão permanecem desconhecidas (BIRKLEIN; SCHLERETH, 2015).

No entanto, objetivo terapêutico comum é manter ou restaurar a função normal da extremidade afetada. De acordo com um modelo de SDCR realizado em ratos, acredita-se que possa ocorrer a ativação de diferentes canais iônicos após surgir a dor. Para investigar as alterações sensoriais em um modelo de SDCR, vários métodos têm sido aplicados para criar e estudar a lesão isquêmica nos nervos periféricos em animais (CODERRE et al., 2004).

A realização de um estudo pré-clínico da SDRC é feita quando se faz necessário avaliar o potencial terapêutico de diferentes tratamentos. O modelo de isquemia-reperfusão em camundongos é uma das formas de reproduzir a SDRC, no qual a privação de oxigênio seguida de reperfusão tem como resultado a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) suficientes para causar dano tecidual desencadeador de inflamação, morte celular e necrose tecidual (ROCHA et al., 2012).

3.1.8 Isquemia - reperfusão

A isquemia/reperfusão é um termo utilizado para descrever alterações funcionais e estruturais que se tornam aparentes durante a restauração do fluxo sanguíneo após um período de isquemia. Além da reversão do fluxo sanguíneo,

outros possíveis danos podem ser ocasionados, como necrose e edema. A lesão ocasionada pela isquemia/reperfusão envolve diversos mecanismos fisiopatológicos e sistêmicos, primeiramente ocorrendo a depleção de energia celular na fase de isquemia e a interação do estresse oxidativo juntamente com a inflamação na fase de reperfusão (PANTAZI, 2013; NASTOS et al., 2014; HENTIA, 2018).

As lesões geradas pela isquemia e reperfusão ocasionam diversos efeitos para os órgãos, sendo a reperfusão grande responsável pelas principais lesões ocorridas nas células do órgão que sofreu a isquemia e, no momento em que ocorre a reperfusão, as enzimas ativadas participam da diminuição do oxigênio molecular, gerando espécies reativas ao oxigênio (EROs) (YAMAKI et al, 2012; ROCHA et al, 2012). Essa diminuição do oxigênio implica em dano tecidual originando diversas respostas celulares deletérias que culminam em inflamação, necrose tecidual, morte celular e falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003; YAMAKI et al., 2012).

Millecamps e Coderre (2008) demonstraram em seu estudo, que as características presentes em ratos após lesão por isquemia/reperfusão (IR) são semelhantes às descritas em humanos com SDCR-I.

Coderre e colaboradores (2004) padronizaram o processo de SDCR-I, por meio de Dor Pós Isquêmica Crônica (DPIC) em ratos, tendo como objetivo simular as manifestações clínicas da doença. No modelo desenvolvido, a aplicação de um torniquete no membro de interesse proporciona a privação circulatória seguida de um período de reperfusão, aumentando o estresse oxidativo, ativando a resposta inflamatória (edema e hiperemia), ocorrendo também a instalação de hiperalgesia mecânica e térmica ao frio e de sintomas de neuropatia (incluindo o membro contralateral a longo prazo).

Este modelo foi adaptado para camundongos por Millecamps e colaboradores (2010), onde a anestesia do animal ocorre e posteriormente é feita a colocação do torniquete elástico no tornozelo por um período de três horas, sendo este torniquete cortado após o decorrer do procedimento, ocasionando intensa reperfusão da pata (TANG et al., 2017). O procedimento foi padronizado em camundongos C57BL/6 pelo tempo de duas horas (DE PRÁ, 2017).

Quando a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo danificam o equilíbrio antioxidante/pró-oxidante no organismo, as mitocôndrias neuronais

produzem grandes quantidades de EROs, e a isquemia resulta em hipóxia, além da disfunção tecidual e sensorial, enquanto a reperfusão subsequente agrava a lesão isquêmica por induzir morte celular e ativar resposta inflamatória (HEUMANN, 1987; LIN et al., 2000; SASAKI et al., 2014; WU et al., 2018; Zang et al., 2020).

A proteção ativa da função mitocondrial, a eliminação de radicais livres, a função antioxidante e a desaceleração do estresse oxidativo se mostraram estratégias eficazes para proteger neurônios em processo de reperfusão de isquemia cerebral (WU et al., 2018).

A hipóxia gerada após o processo isquêmico resulta na redução dos fosfatos de alta energia, como o ATP e a fosfocreatina, e na acidose intracelular, pela formação de lactato, fazendo com que haja a alteração da permeabilidade da membrana lisossomal e a inibição da bomba de sódio e potássio. Esse processo resulta na retenção de sódio e água dentro das células, além do acúmulo de cálcio intracelular que motiva a produção de EROs pelas mitocôndrias, esse processo ativa as proteínas calpaínas (proteases de cisteína dependentes de cálcio) (Zang et al., 2020).

Restabelecer o fluxo sanguíneo é fundamental para atenuar o dano causado aos tecidos que sofreram isquemia, entretanto a reperfusão aumenta os danos em comparação à isquemia sozinha, pois o oxigênio volta a causar a elevação do cálcio intracelular, resultando em dano celular dependente das calpaínas. O catabolismo do ATP durante o processo de isquemia induz ao acúmulo de hipoxantina intracelular, que favorece a formação de EROs na reoxigenação (Zang et al., 2020).

3.1.9 Alodinia e Hiperalgesia

A alodinia pode ser classificada como uma sensibilização da dor central que resulta na estimulação constante e não dolorosa dos receptores, desencadeiando uma resposta dolorosa devido a estimulação repetitiva desses receptores. Essa condição pode ser descrita como dor patológica e não serve a nenhum propósito em termos de sistema de defesa do organismo (YAM et al., 2018). Essa sensação se refere a algo que normalmente não causaria dor, como um simples toque na pele, porém devido a essa sensibilização a resposta é a dor

(MA; ZHANG, 2011).

A hiperalgesia é caracterizada pela percepção da intensidade da dor maior do que o esperado, apesar do processo nociceptivo permanecer constante, e pode ser caracterizada em primária e secundária. A primária que manifesta-se por uma dor espontânea e aumento da sensibilidade aos estímulos de qualquer tipo, limitando-se a uma área de lesão e se deve a uma sensibilização periférica do nociceptor e a hiperalgesia secundária, que ocorre à periferia da lesão que acontece no nível da medula espinhal (VELAYUDHAN; BELLINGHAM; MORLEY-FORSTER, 2014; IASP, 1994).

3.2 Radicais Livres

Os radicais livres são produtos do metabolismo celular normal, que podem ser definidos como um átomo ou uma molécula que contenha números impares de elétrons desemparelhados na camada de valência e que sejam capazes de existir independente. Por conter um número ímpar de elétrons se torna instável, de curta duração e altamente reativo, por conta disso, podem abstrair elétrons de outros compostos para estabilizar. Assim, a molécula atacada perde seu elétron e se torna um radical livre, iniciando uma cascata de reações que promoverão danos celulares (BALA et al., 2011; BALA et. al, 2013; MOOKO, 2022).

A produção de radicais livres pode ocorrer por via endógena ou exógena, sendo que as fontes endógenas englobam as mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático, onde a quantidade de oxigênio é elevada (PHANIENDRA et al., 2014).

A função das substâncias antioxidantes é neutralizar os radicais livres nas células, estudos mostram que os antioxidantes desempenham um papel essencial na manutenção da saúde humana, prevenindo e tratando doenças, devido à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo causado pelos radicais livres (MUNTEANU; APETREI, 2021).

Quando ocorre uma produção exacerbada de radicais livres e as funções antioxidantes não conseguem dar conta de realizar sua eliminação, os radicais livres irão levar ao estresse oxidativo, por serem altamente reativos, podendo ocasionar danos ao DNA, lipídeos e proteínas, também sendo responsáveis pelo aumento da oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos que podem ser

marcadores específicos do estresse oxidativo: TBA-RS (substâncias reativas juntamente ao ácido tiobarbitúrico), aldeídos, metabólitos secundários da oxidação de lipídios, sendo o malondialdeído (MDA) o mais abundante entre eles (DRÖGE, 2002; BARBOSA et al., 2010).

Os radicais livres estão envolvidos em muitas condições patológicas, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da doença. Com um aumento de sua quantidade, acumulam-se nas células causando danos aos tecidos, acarretando em fatores que corroboram ao desenvolvimento de doenças como a diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, câncer, catarata, asma, artrite reumatóide, inflamação, queimaduras, doenças do trato intestinal e patologias isquêmicas e pós-isquêmicas (PHANIENDRA et al., 2014).

Quando promovem um aumento das proteínas carboniladas, formadas por meio da clivagem oxidativa do suporte estrutural destas, causando desaminação de aminoácidos, como lisina e ácido glutâmico, vão promover várias condições como: envelhecimento, doenças neurodegenerativas, obesidade, diabetes, degeneração macular ligada à idade, anemia, carcinoma hepatocelular, síndrome da imunodeficiência adquirida (FRIJHOFF et al., 2015).

3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies reativas são denominadas em função do tipo de átomo o qual elas estão relacionadas, no caso do oxigênio se denominam Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e englobam um conjunto de moléculas derivadas do oxigênio formadas por meio de reação de oxiredução, podendo ser divididas entre não radical e radical livre (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; ZHANG et al., 2019; SIES, 2020).

Os responsáveis pela produção das EROs são organismos vivos em metabolismo celular normal além da influência de fatores ambientais em sua produção, como poluentes atmosféricos, medicamentos, dieta, radiação ultravioleta e gama, fumaça de cigarro, do ozônio e dióxido de nitrogênio e do estresse como um todo (BIRBEN et al., 2012; JACOB, 2013).

Uma das funções biológicas das EROs envolve a resposta imunológica, sendo responsável por auxiliar o organismo a responder a patógenos e também a

mediar a resposta imune, como por exemplo, juntamente aos receptores do tipo NOD e sua participação na ativação das respostas inflamatórias (BEDARD; KRAUSE, 2007; TSCHOPP, 2011; BONINI; MALIK, 2014).

Diferentes níveis de concentração das EROs desempenham papéis importantes na vida celular e em processos fisiológicos do organismo. Em baixas concentrações podem estimular a mitose, participam do processo de geração aeróbica de energia na cadeia respiratória, são mediadores importantes das vias de sinalização intracelular e necessárias para a fagocitose de microrganismos pelos neutrófilos. Em concentrações intermediárias, as EROs auxiliam na inibição do ciclo celular e em grande quantidade fazem com que as células sofram a apoptose a partir da reação com diferentes estruturas do organismo, como proteínas, lipídios, carboidratos e material genético (DRÖGE, 2002; VERBON et.al, 2012; CHIES et al., 2019).

A formação das EROs ocorre em processos biológicos naturais, entretanto a sua presença de forma elevada no organismo acarreta em danos como a peroxidação lipídica, levando a sua alteração de estrutura celular, interferindo no transporte transmembrana, além de mutagênese e proliferação celular exacerbada, alterações no DNA, como a quebra da dupla hélice gerando alterações estruturais, que podem desencadear processos de mutagênese e oncogênese. EROs desempenham um papel importante na promoção e inibição de processos celulares, fazendo parte do controle hormonal, equilíbrio químico e ativação enzimática (POWERS; JACKSON, 2008; BRIEGER et al 2012; JACOB, 2013; COTINGUIBA et al., 2013).

A produção contínua e exacerbada de EROs induz a ativação do fator nuclear kappa de células B ativadas (NF-FB), responsável pelo controle da transcrição do DNA e também à membrana mitocondrial, influenciando as atividades antioxidantes (BANERJEE MUSTAFI et al., 2009; WANG et al., 2011; ZANG et al., 2020).

Antioxidantes gerados pelo organismo podem prevenir o efeito nocivo das EROs, as enzimas como glutationa peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são responsáveis por esse processo de prevenção, assim como outras substâncias antioxidantes como a glutationa, ácido lipóico, melatonina, ácido úrico, vitaminas C e E, entre outros (SILVA Jr. et al., 2002; POWERS; JACKSON, 2008; MIGUEL, 2012).

3.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo se refere ao processo de dano tecidual causado pela produção excessiva ou capacidade reduzida de eliminação das EROs durante os processos metabólicos, resultando num desequilíbrio entre os sistemas oxidativo e antioxidante (WU et al., 2020).

Quando existe este desequilíbrio entre os sistemas oxidativo (radicais livres) e o antioxidante, em favor do primeiro, ocorre o distúrbio conhecido como estresse oxidativo, gerando de forma excessiva radicais livres ou também pela desaceleração de remoção destes no organismo (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

Os danos ocasionados por conta desse desequilíbrio podem ser de diversos tipos, e podem estar associados a lesão por isquemia e reperfusão, diabetes, câncer, aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis cardiovasculares, transformação e morte celular, hipertensão e processos neurodegenerativos, doenças de Parkinson e Alzheimer, além de também ser responsável pelo envelhecimento precoce (CARACENI, 2005; BARBOSA et al 2010; LEITE et al, 2012; CERCHIARO & HONÓRIO, 2011; JACOB, 2013).

A presença do estresse oxidativo de modo agravado pode ocasionar danos ao DNA, lipídeos (lipoperoxidação) e proteínas, assim como também pode gerar a oxidação e aumento de biomoléculas (DRÖGE, 2002; BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo é gerado de forma contínua em nosso organismo devido a uma série de eventos estocásticos e pode ser atenuado ou agravado em consequência aos estilos de vida de cada indivíduo. A literatura tem salientado a influência da realização de exercícios físicos, dos hábitos alimentares, da exposição à radiação, dos hábitos tabágicos e do consumo de substâncias alcoólicas e de substâncias tóxicas (SANTOS, 2014).

3.4.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

A membrana plasmática é uma barreira flexível, resistente e constituída principalmente por lipídeos e proteínas. Sua estrutura básica é constituída por

uma bicamada lipídica (duas camadas em contraposição), composta por três tipos de moléculas: colesterol, fosfolipídeos e glicolipídeos, sendo que uma das principais características dessa membrana é de possuir permeabilidade seletiva, ou seja, permitir seletivamente a movimentação de substâncias do meio intracelular e extracelular (TORTORA et al., 2016).

Os lipídios presentes na membrana plasmática, principalmente os resíduos de ácidos graxos poliinsaturados gerados a partir dos fosfolipídios são mais suscetíveis a sofrer com a oxidação. Quando essa membrana sofre algum tipo de dano, um processo chamado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é desencadeado, fazendo com que a fluidez da membrana seja alterada, dificultando a seletividade no transporte iônico e a sinalização transmembrana, prejudicando o transporte celular (SIEMS et al., 1995; SILVA e FERRARI, 2011; ENGERS, 2011).

Os produtos advindos da peroxidação lipídica podem causar danos ao DNA, proteínas e levar a alteração da atividade enzimática, além de atuarem como sinalizadores de ativação da via de morte celular (ŁUCZAJ et al., 2017; ZARCOVIC et al, 2017).

Doenças críticas, incluindo lesão renal aguda, sepse e lesão cardíaca, estão relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo, e a peroxidação lipídica desempenha um papel importante na progressão dessas patologias, sendo que diversos estudos corroboram com a influência dos mecanismos relacionados a lipoperoxidação nas doenças em fase crítica (MARTIN-SANCHEZ, 2016).

3.4.2 Danos às proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos ligados covalentemente, que formam as macromoléculas biológicas mais abundantes e estão presentes em todas as partes das células, além de serem ferramentas moleculares para representar a informação genética. A variedade com que os aminoácidos podem ser ligados em diferentes sequências pode gerar produtos tão diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas do cristalino, penas, proteínas do leite, antibióticos e uma grande variedade de outras substâncias com as mais diversas atividades biológicas (NELSON; COX, 2022).

A oxidação de proteínas tem sido associada às condições patológicas do sistema vascular e as proteínas carboniladas, que acumulam no interior da célula como agregados proteicos, podem se tornar citotóxicas (DALLE-DONNE et al, 2006).

Derivados carbonílicos (aldeídos e cetonas) são formados por oxidação direta de resíduos de aminoácidos suscetíveis como arginina, lisina, prolina e treonina, ou pela clivagem oxidativa das proteínas, por EROs ou também por reações não oxidativas com lipídios oxidados que contenham carbonila. Os níveis de carbonilas são utilizados como marcador de dano oxidativo às proteínas, devido à sua formação relativamente precoce e a sua estabilidade (DALLE-DONNE et al, 2006; WEBER et al, 2015; GRYSZCZYńSKA et al, 2017).

3.4.3 Danos ao DNA

O DNA, possui uma estrutura tridimensional, formado por nucleotídeos, é uma das descobertas mais notáveis no campo da biologia no século XX. A sobrevivência de uma espécie biológica requer que sua informação genética seja mantida de forma estável com o mínimo de enganos para definir as espécies, distingui-las umas das outras e garantir as gerações futuras (NELSON; COX, 2022).

As EROs podem danificar oxidativamente os ácidos nucleicos. O DNA mitocondrial é mais vulnerável do que o DNA nuclear, pois ele se localiza nas proximidades de onde as EROs são geradas (PHANIENDRA et al., 2014).

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com as EROs ocasionando lesões que podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos e também podendo levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006). Quando os danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser seriamente afetados e caso as lesões ocorridas não sejam reparadas, podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras ou ainda provocar efeitos genotóxicos severos gerando instabilidade genômica (COSTA, 2003).

3.5 *Schizophyllum commune*

O *Schizophyllum commune* pertence ao gênero *Schizophyllum* da família *Schizophyllaceae* do filo basidiomicetos e classe dos agaricomicetos, encontrado comumente em madeira apodrecida, principalmente em estações chuvosas nas florestas tropicais e subtropicais, é encontrado em todos os continentes exceto a Antártida, onde não é encontrada madeira para servir de substrato (BRADY et.al 2005; IMTIAJ et al., 2008; AINSWORTH, 2008).

As espécies de *Schizophyllum* são conhecidas por serem comestíveis, principalmente ao sul de países asiáticos como Tailândia, Vietnã, Malásia, Taiwan e Sul da China, além disso, a literatura indica que este macrofungo possui características anticarcinogênicas, antitumorais e propriedades imunomoduladoras (IMTIAJ et al., 2008; PATEL; GOYAL, 2011).

As condições ideais em laboratório para o desenvolvimento desse macrofungo são temperaturas entre 30 e 35°C, porém o crescimento mínimo foi encontrado em 15°C. No caso do pH, o crescimento mais favorável foi encontrado em pH 5, indicando que este cogumelo se adaptou bem a alta temperatura e baixo pH para seu crescimento (IMTIAJ et al., 2008).

Este fungo vem sendo estudado como patógeno humano ocasional associado a rinossinusite, micose broncopulmonar e alergias pulmonares (SIGLER, 2002; MICHEL et al., 2015).

O esquizofilian, exopolissacarídeo produzido pelo *Schizophyllum commune,* é solúvel em água e possui grande estabilidade térmica, já sendo utilizado em vacinas, terapias anticancerígenas, bioativo em cosméticos, filmes impermeáveis, hidrogel para conservação de alimentos além de ser aprovado como um medicamento para o tratamento do câncer cervical, pulmonar e gástrico no Japão (JONG; BIRMINGHAM, 1993; DING et al., 2020; SHOAIB et al., 2020; HAMEDI et al., 2020).

3.6 Polissacarídeos de origem fúngica e suas propriedades medicinais

Fungos possuem inúmeros compostos com potenciais aplicações para a indústria farmacêutica, destacando-se os compostos fenólicos, terpenos, vitaminas, selênio, compostos voláteis e polissacarídeos (WU et al., 2016).

Entre os polissacarídeos presentes nos fungos, as glucanas que são polímeros de glucose, estão abundantemente distribuídos em sua parede celular. Suas principais funções celulares englobam a proteção à desidratação, fornecimento de estrutura e defesa contra invasores. Quando armazenadas no interior da célula podem atuar como reserva energética pelo fungo em períodos críticos do seu desenvolvimento. Estas macromoléculas podem apresentar configurações α ou β, diferentes graus de polimerização, entretanto são mais abundantes as glucanas com cadeia principal de glucose ligada β-(1→3) com quantidades variáveis de ramificações β-(1→6) (RUIZ-HERRERA, 2012).

As glucanas estimulam a biossíntese de colágeno em cultura de células de fibroblastos, além de modular o processo de cicatrização e reparo da pele por meio de um mecanismo indireto de ativação de macrófagos com posterior liberação de fator de crescimento e citocinas (WEI et al., 2002). Aplicações das β-(1→3)-glucanas estão envolvidas na revitalização das células, melhora da imunidade, regeneração da produção de colágeno, anti-envelhecimento, hidratação, cicatrização, atividade antioxidante e anti-UV (DU et al., 2014).

O principal mecanismo de ação das β-(1→3)-glucanas está associado à ativação do sistema imune, e por se tratar de uma fibra possui ainda a capacidade de diminuir a absorção de açúcares e gorduras (KHOURY et al., 2012).

Os polissacarídeos de origem fúngica apresentam diversas respostas biológicas, incluindo ações anticancerígenas, antioxidantes e estimulantes imunológicas, bem como, mais recentemente, propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias (SMIRDELE et al. 2008; CARBONERO et al. 2008; NOVAK and VETVICKA 2008; BAGGIO et al. 2010; RUTHES et al. 2013).

O efeito imunomodulador de polissacarídeos extraídos de fungos tem sido atribuído ao reconhecimento destas substâncias por receptores específicos como receptores Toll-Like (TLR-2/6), receptores do complemento (CR3) e Dectina-1. Estes receptores iniciam a resposta imune durante uma infecção de origem fúngica, induzindo macrófagos, células Natural Killers (NK), dendríticas, neutrófilos e monócitos a produzirem citocinas (CHAN et al., 2009; DENNEHY e BROWN, 2007).

Um estímulo na produção de NFκB e na expressão gênica de IL-6 foi verificado em células de fibroblastos humanos tratados com β-(1→3)-glucanas

extraídas de *Saccharomyces cerevisiae* e posteriormente fosfatadas. Este foi o primeiro relato que verificou a interação direta de glucanas com células humanas diferentes daquelas do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e células NK) (KOUGIAS et al., 2001).

O schizophyllan, um polissacarídeo produzido pelo fungo basidiomiceto denominado *Schizophyllum commune*, é formado por uma cadeia principal linear de β-(1→3)-glucanas, lateralmente substituídas em β-(1→6) a cada terceiro resíduo de glicose (SYNYTSYA et al., 2009; CHEN & CHEUNG, 2014). Kim et al., (2012) investigaram a atividade de regeneração da pele em tratamento de feridas em camundongos por meio da aplicação de membrana de ácido polilático co-glicólico contendo β-glucanas. Os resultados mostraram uma melhora na interação, proliferação celular e angiogênese, sugerindo promissoras aplicações neste contexto.

3.7 Toxicidade hepática e renal

Considerando o potencial dos polissacarídeos de origem fúngica de se distribuírem pelos organismo, é possível que um acúmulo significativo ocorra nos principais órgãos detoxificadores do organismo, o fígado e os rins, com potencial para toxicidade limitante do uso terapêutico do SPG.

O teste mais utilizado para avaliação da função hepática é a dosagem sérica das enzimas aspartato aminotransferase (TGO) e alanina aminotransferase (TGP), pois essa mensuração fornece indicadores de dano hepatocelular e seu aumento significativo motiva investigação mais aprofundada (SUCIU et al., 2020). A TGO é encontrada principalmente nas mitocôndrias dos hepatócitos, enquanto a TGP se localiza principalmente no citoplasma e essa diferença auxilia o diagnóstico e o prognóstico de doenças hepáticas, pois caso ocorra um dano hepatocelular leve, a enzima citoplasmática se encontrará aumentada no soro, já em lesões graves, pode ser detectada a liberação da enzima mitocondrial, contribuindo com o diagnóstico mais preciso (TELLI et al., 2016).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio de exames laboratoriais como a dosagem de creatinina sanguínea, que é um produto do metabolismo da creatina e da fosfocreatina presentes na musculatura esquelética,

excretado principalmente por via renal em taxa relativamente constante ao longo do dia (MALTA et al., 2019).

Outro exame utilizado para detecção da função renal é a mensuração da ureia, principal metabólito nitrogenado da degradação de proteínas, sendo ela excretada 90% pelos rins, correspondendo a 75% do nitrogênio não proteico excretado, porém é um fraco preditor da taxa de filtração renal, pois cerca de 40% a 70% retornam para o sangue por difusão passiva, além da taxa de produção hepática poder influenciar sua concentração sem ter relação com a função renal (SODRÉ et al., 2007).

4 METODOLOGIA

O presente estudo é pré-clínico, quantitativo experimental, e foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, tendo sua aprovação por meio do parecer CEUA número 001/2021 (anexo 1). Os autores do presente estudo declaram não haver conflitos de interesses.

Os experimentos foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os procedimentos com os animais foram realizados única e exclusivamente após aprovação do projeto pelo CEUA/Univille. As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

4.1 Produção, extração, purificação e caracterização do polissacarídeo

O cultivo para produção de exopolissacarídeos, assim como os processos de extração e purificação foram realizados em parceria com os pesquisadores Ana Paula Vanin, Marli Camassola e Nicole Dalonso em parceria com o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

A cepa utilizada para a produção de exopolissacarídeos foi *Schizophyllum commune* 227E.32 (28°58'08,33"S; 50°28'58,08"W).

A purificação e a caracterização dos polissacarídeos em relação a composição monosscarídica, tipos de ligações glicosídicas e estutura foi desenvolvida em parceria com a professora Dra. Elaine Rosechrer Carbonero do departamento de Química da Universidade Federal do Catalão - GO.

Para a realização deste trabalho foi recebida uma amostra de 3g de β-(1→3)-glucana parcialmente substituída em *O*-6 por resíduos não redutores de glicose, caracterizando este polissacarídeo como β-(1→3)-(1→6)-glucana.

4.2 Modelo Animal

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, da linhagem Swiss, machos adultos (20 – 30 g, 60 dias). Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados (7 por gaiola) e aclimatados por 7 dias para adaptação em um novo ambiente. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água.

Após o período de adaptação, todos os animais foram avaliados pelo teste de von Frey antes de qualquer tipo de procedimento experimental (teste basal) para comparação fisiológica entre organismos diferentes. Os animais também foram avaliados após a indução da dor neuropática e após a administração do esquizofilian.

4.3 Modelo de indução de dor associado à isquemia - reperfusão

Este modelo de indução da SDCR- I por meio de isquemia/ reperfusão foi utilizado em outros experimentos que demonstraram ser possível avaliar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (CODERRE et al., 2004; KLAFKE et al, 2016).

Antes da indução de isquemia, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de xilazina (3 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg) em dose suficiente para estado de anestesia geral com duração de 120 minutos. Após a indução da anestesia, um torniquete elástico (Figura 1) (Oband n 16; Kyowa Limited, Osawa, Japan) foi colocado ao redor da pata traseira esquerda do camundongo, próximo à articulação do tornozelo, por um período de 120 minutos (KLAFKE et al, 2016).

A cessação da anestesia foi programada para que os camundongos se recuperassem totalmente dentro de 120 minutos após a reperfusão, que ocorreu imediatamente após a remoção do torniquete. No grupo controle, os camundongos receberam exatamente o mesmo tratamento anestésico, porém o torniquete de elástico foi cortado logo após a sua colocação, de modo que apenas vagamente foi rodeado o tornozelo, e não teve a função de obstruir o fluxo sanguíneo na pata traseira.

Os testes de von Frey, para observar o desenvolvimento de dor isquêmica foram realizados em todos os animais até o décimo sétimo dia.

Figura 1: Torniquete elástico na pata esquerda do camundongo.

Fonte: Gastaldi, 2021.

4.4 Modelo crônico

Após a confirmação de desenvolvimento de dor isquêmica pelo modelo associado à isquemia – reperfusão, foi realizado o teste de avaliação de diminuição de dor isquêmica em modelo crônico com o SPG em diferentes concentrações.

As administrações do SPG foram realizadas durante dezesseis dias consecutivos, com intervalo de 24 h entre as administrações, antes da realização do teste de von Frey. Os animais foram divididos em 12 grupos, cada um contendo 7 animais cada. Os grupos II, III, IV, V e VI do modelo de SDCR-I receberam aplicação intraperitoneal de SPG nas respectivas concentrações: 1, 3, 5, 10, 30 e 100 mg/kg. Os grupos I e VII receberam aplicação intraperitoneal de veículo (salina) e os grupos controle VIII, IX, X, XI e XII receberam a aplicação intraperitoneal do SPG nas seguintes concentrações: 1, 3, 5, 10, 30 e 100 mg/kg.

A concentração de 100 mg/kg foi utilizada para comparação com as demais concentrações acerca de possível sedação dos animais, assim como toxicidade renal e hepática.

No 18° dia, os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia, sendo coletado todo o sangue e o nervo ciático removido para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.

4.5 Testes para avaliar o desenvolvimento da dor

4.5.1 Teste de von Frey (estímulo mecânico)

Para estudar a sensibilidade a estímulos mecânicos foi realizado o teste utilizando filamentos de von Frey de intensidade crescente (0,02-10 g) (DIXON, 1980; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012).

Os animais, de acordo com a divisão dos grupos citados anteriormente, foram tratados com as diferentes concentrações de esquizofilan e posteriormente ambientados no local de experimentação, que consiste em câmaras elevadas com chão de tela metálica, por 1 hora. Após esse período, foi realizada a estimulação da pata traseira direita de cada animal com filamentos de von Frey pelo método de up-and-down.

O primeiro filamento utilizado promoveu uma pressão de 0,60g, caso ocorresse a retirada da pata seria aplicado um filamento com pressão menor. Caso não ocorresse retirada, seria utilizado um filamento com maior pressão. No total poderiam ser realizadas até seis estimulações, utilizando os filamentos de 0,16g; 0,40g; 0,60g; 1,0g: 1,4g ; e 2,0g. Com os resultados obtidos, foi calculado o valor correspondente a 50% do limiar, em g, que cada animal suportou (limiar 50%). Uma diminuição deste valor foi considerada como hiperalgesia mecânica e uma reversão nesta queda como sendo um efeito antinociceptivo (anti-hiperalgésico) (DIXON, 1980).

Após a indução da SDCR-I, pelo modelo de isquemia-reperfusão o teste foi realizado diariamente por 16 dias consecutivos.

4.9 Modelo agudo

4.9.1 Teste de contorções abdominais

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,9% (0,1 mL/10 g, i.p.) em camundongos pré-tratados trinta minutos antes com o SPG em diferentes concentrações (0,1, 1, 3, 5, 10, 30 e 100mg/kg, via i.p.) para triagem da dose mais eficaz por essa via. Animais controle receberam solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g, i.p.). Os animais foram observados durante 20 minutos e foi registrado o número de contorções abdominais, conforme descrito por Koster, Anderson e Debeer (1959).

Os animais foram divididos em 14 grupos, cada um com 7 animais, o grupo controle I, recebeu apenas a administração de salina, os grupos controle II, III, IV, V, VI e VII, receberam salina além do SPG nas concentrações descritas acima. O grupo VIII recebeu administração de salina além do ácido acético 0,9% e os grupos IX, X, XI, XII, XIII e XIV receberam a administração do ácido acético além do SPG nas mesmas concentrações do grupo controle.

4.9.2 Teste de formalina

Animais tratados meia hora antes com os SPG nas concentrações de 1, 10 e 30 mg/kg, via i.p., para triagem da dose mais eficaz por essa via, receberam uma injeção intraplantar de formalina (2,5%, 40 µL) ou solução salina por via intraplantar (40 µL) na pata esquerda. Logo após, os animais foram observados por 40 minutos para monitoramento do tempo de comportamento nociceptivo. Animais controle receberam solução salina 0,9% (40 µL, intraplantar) na pata esquerda (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR, HOLE, 1987).

Os animais foram divididos em 8 grupos, cada um com 5 animais, o grupo controle I, recebeu apenas a administração de salina intraplantar, os grupos controle II, III e IV, receberam salina intraplantar além do SPG intraperitoneal nas concentrações descritas acima. O grupo V recebeu administração de salina intraperitoneal além da formalina (2,5%, 40 µL) intraplantar e os grupos VI, VII e VIII receberam a administração da formalina (2,5%, 40 µL) intraplantar além do SPG nas mesmas concentrações do grupo controle.

4.9.3 Teste Rotarod

O teste do Rotarod (DUNHAM E MIYA, 1957) é um dos mais antigos usados para avaliar os efeitos de uma droga no comportamento animal. Ele fornece uma estimativa rápida se uma substância tem algum efeito na coordenação neuromuscular. O Rotarod consiste em uma haste circular girando a uma velocidade constante ou crescente (BOHLEN et al, 2009). Drogas que alteram a coordenação neuromuscular, como os benzodiazepínicos, reduzem o tempo que os animais são capazes de permanecer na haste (RUSTAY et al., 2003). Diazepam é normalmente utilizado como referência na realização do teste (WILLIAMS, 2007).

O teste foi executado com os camundongos dos mesmos grupos utilizados no teste crônico, no 12° dia após os testes de Von Frey, assim como no 17° dia após a realização dos testes de Von Frey.

4.10 Estudos bioquímicos e preparo das amostras

4.10.1 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados por decapitação, na ausência de anestesia. O sangue total e nervo ciático foram removidos dos animais do modelo crônico e posteriormente utilizados para determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px; avaliação de dano proteico por meio do conteúdo total de sulfidrilas; avaliação de lipoperoxidação por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).

O sacrifício dos animais, no modelo crônico, ocorreu no 18°dia após a indução da SDCR-I e os tecidos foram retirados para as análises, os animais do modelo agudo foram sacrificados imediatamente após a realização de cada um dos testes.

4.10.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue

total obtidas de camundongos. O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação de TBA-RS e do conteúdo total de sulfidrilas.

Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para determinação da atividade das enzimas antioxidantes. Para realizar a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13,500 × g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

4.10.3 Preparação do nervo ciático

O nervo ciático removido foi decapsulado e mantido em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris–HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão específico usando homogeneizador Potter-Elvehejem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas (DE PRÁ, 2017).

4.10.4 Preparação de tecido para análise histopatológica

Após a morte dos animais, o fígado e o rim esquerdo foram retirados e fixados em formol a 10% e preparados conforme protocolo de técnicas histológicas de rotina: desidratados em série crescente de álcool e banhos de xilol e preparados para inclusão em parafina para posterior microtomia com cerca de 6µm de espessura (BANCROFT'S, 2013). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise qualitativa em microscopia de luz.

4.11 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

4.11.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979). A metodologia de TBA-RS mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. O nervo ciático homogeneizado, assim como o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidos num banho de água fervente durante 60 min. Após o período em que as amostras permaneceram em água fervente, elas foram retiradas e o TBA-RS foi determinado pela absorbância a 535 nm. Uma curva de calibração foi construída utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o das amostras. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

4.11.2 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado (plasma ou nervo ciático) foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µl de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Após o período em que as amostras foram incubadas foi realizada a leitura no espectofrotômetro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

4.11.3 Catalase

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H_2O_2 a 240 nm num meio de reação contendo 25µL de amostra (eritrócitos ou homogenato de nervo ciático) e 600 µL de tampão de fosfato de potássio 10mM, pH 7,0, H_2O_2 20mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos em espectrofotômetro.Uma unidade foi definida como 1 µmol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

4.11.4 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). 90 µL de cada amostra (eritrócitos ou homogenato de nervo ciático) foi adicionado ao meio contendo 800 µL de tampão, 20 µL de GSH 2,0 mM, 30 µL de GSH redutase 0,15 U/mL, 10 µL de azida 0,4 mM e 10 µL de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Posteriormente, 50 µL de tert-butilhidroperóxido 0,5 mM foi adicionado e a absorbância foi lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px foi definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

4.11.5 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido (O_2-), que é um substrato para a SOD. O processo consiste em 15 µL de amostra (eritrócitos ou homogenato de nervo ciático), 215 µL de tampão Tris 50 uM (pH 8,2), 1 µM de EDTA e 30 uM de CAT. Subsequentemente, foi adicionado 20 uL de pirogalol e a absorbância foi registada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi construída com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatado como unidades de SOD/mg de proteína.

4.12 Investigação de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade de SPG

Os camundongos foram divididos em doze grupos (sete animais por grupo) e tratados uma vez por dia por dezessete dias com SPG (1 mg/kg; 3 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg e 30 mg/kg) ou solução salina (0,1 ml/10 g) por via intraperitoneal. Um dia após a última administração, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma foi separado por processo de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. As análises bioquímicas constaram das dosagens de: transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP), ureia e creatinina.

Os ensaios foram realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automatizado Shimadzu UV-visível, com utilização de Kits comerciais Bioclin/Biosystems e Labtest.

4.13 Análise histológica

Foram analisadas características histopatológicas indicativas de dano aos tecidos, como presença de inflamação, congestão vascular, fibrose e degeneração vacuolar do núcleo e citoplasma (SHARMA et al., 2019). Cada uma dessas características foi graduada em uma escala adaptada de gravidade de 0 a 5 (0=ausente, 1=mínima, 2=leve 3=moderada, 4=acentuada, 5= grave) (CRISSMAN et al. 2004; KERLIN et al 2016; PALAZZI et al. 2016; SCHAFER et al., 2018).

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows, versão 20.0, em computador compatível com PC (IBM Corp. Armonk, NY, EUA). O teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov foi realizado para confirmar uma distribuição paramétrica; os dados foram então analisados por ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Duncan, quando o teste F foi significativo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados são expressos como médias ± DP para sete experiências independentes 70 (animais) realizadas em duplicado. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e *

p <0,05, em comparação com o teste de intervalo múltiplo de Duncan.

5 INTERDISCIPLINARIDADE

Sendo um fenômeno universal, a dor é experimentada em todos os níveis econômicos, em todos os tipos de situações e em todos os ambientes. É sentida de forma única para cada indivíduo e tem impacto em seu bem-estar psicológico, social, físico e econômico (KAZANOWSLI & LACCETTI, 2005).

A SDCR, trata-se de uma doença multifatorial e com poucas opções terapêuticas que, ainda assim, não conseguem resolvem em sua totalidade a situação de cada indivíduo, sabendo que os dados referentes a sua epidemiologia ainda são escassos, seu diagnóstico e tratamento imediatos e correto é prejudicado.

Mesmo sendo rara, a SDCR é caracterizada por dor intensa, edema, aumento da sensibilidade ao frio e ao toque, sudor, alterações de cor e diminuição da mobilidade (BORTAGARAY et al, 2019). Numerosos incidentes relacionados a traumas, como os causados por entorses, fraturas, luxações, lacerações, contusões e distensões, bem como imobilizações prolongadas, gesso apertado, traumas cirúrgicos, pós-operatórios, após processos inflamatórios, infartos do miocárdio, encefalopatia vascular, infecções, tumores e isquemia do membro, seguida de sua reperfusão, podem resultar no aparecimento dessa síndrome (FELIU; EDWARDS, 2010; ARTIOLI et al, 2011; CORDON et al, 2002; BIRKLEIN & DIMOVA, 2017).

Os radicais livres são produtos do metabolismo celular normal, porém quando ocorre sua produção exacerbada e as funções antioxidantes não conseguem dar conta de realizar sua eliminação, os radicais livres irão levar ao estresse oxidativo (DRÖGE, 2002; BARBOSA et al, 2010; BALA et al. 2011).

A ativação de enzimas antioxidantes participantes da redução do oxigênio molecular gera EROs (YAMAKI et al, 2012; ROCHA et al, 2012) que implicam em dano tecidual responsável por originar diversas respostas celulares deletérias que culminam em inflamação, necrose tecidual, morte celular e falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003; MIGUEL, 2012; YAMAKI et al., 2012).

O desenvolvimento constante da ciência é de extrema importância, e por esse motivo, a pesquisa realizada utilizando o SPG em modelo de dor crônica e

aguda é de grande valia, podendo no futuro trazer benefícios para diversas áreas do conhecimento e a população.

Polissacarídeos de origem fúngica já são utilizados para diversas funcionalidades e seus resultados cada vez mais são demonstrados com pesquisas diversas, buscando-se o desenvolvimento de novos tratamentos e fazendo com que os polissacarídeos tenham novas aplicações.

Com a descoberta e aplicabilidade de novos tratamentos, o desempenho dos indivíduos acometidos pela SDCR, tanto profissional quanto socialmente terá uma melhora, pois os indivíduos poderão exercer mais atividades antes restritas pelos sintomas da doença.

Além disso, o desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas apóia objetivos comerciais e aumenta a competição entre indústrias químicas com o objetivo de melhorar/desenvolver novas formas farmacêuticas cada vez mais eficazes e com menor toxicidade para humanos, corpos hídricos e outros sistemas ambientais.

Deste modo o estudo do SPG associado a SDCR trás diversas possibilidades e benefícios em muitas áreas do conhecimento, gerando ganhos na indústria química e farmacêutica, possibilitando a redução de despesas com o sistema de saúde, além da diminuição de resíduos e contribuindo para diversas áreas, como a biologia, farmácia, medicina, biomedicina, química, fisioterapia, engenharias, aproximando e possibilitando o conhecimento e o avanço das pesquisas, nas áreas de saúde e meio ambiente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Artigo

EFFECT OF SCHIZOPHYLLAN POLYSACCHARIDE FROM *Schizophyllum commune* ON PRECLINICAL MODELS OF CHRONIC AND ACUTE PAIN

Katherine Plautz[1], Gabriela Borgmann[1], Eduardo Manoel Pereira[3], Samira Dal-Toé de Prá[5], Débora Delwing-Dal Magro[6], Ana Paula Vanin[7], Marli Camassola[7], Nicole Dalonso[5], Luiza Lã[6], Brenda Wiggers[6,] Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque[6], Daniela Delwing-de Lima[1,2*]

[1]Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki,10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

[2]Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE,
Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

[3]Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE,
Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

[4]Departamento de Ciências Biológicas, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

[5]Departamento de Saúde, Sociedade Educacional de Joinville – UNISOCIESC,
Rua Albano Schmidt, 3333 - Boa Vista, Joinville - SC, CEP 89206-001, Joinville, SC, Brasil.

[6]Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau - FURB, Rua Antônio da Veiga,140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brasil.

[7]Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul - UCS, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing-de Lima, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente; Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil, Phone 55 47 3461 9112, e-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effect of schizophyllan (SPG) in a Complex Regional Pain Syndrome Type I - (CRPS-I) at concentrations of 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 and 30.0mg/Kg, in models of acute pain at concentrations of 0.1, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 30.0 and 100.0mg/Kg (Abdominal contortions), and 1.0, 10.0 and 30.0mg/Kg (Formalin), perform the Rotarod test to evaluate the behavioral effects and evaluating oxidative stress by the levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS), the total content of sulfhydryls, carbonyl proteins and the activity of antioxidant enzymes (catalase - CAT, superoxide dismutase – SOD and glutathione peroxidase – GSH-Px) in blood and sciatic nerve, in the chronic phase. The project (CEUA 001/2021) was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Joinville Region. Mechanical threshold measurements were performed using von Frey filaments on 17 consecutive days after ischemia. The animals received intraperitoneal administration of the concentrations of SPG. Data were statistically analyzed by one-way and two-way ANOVA followed by the Duncan and Bonferroni post hoc test, respectively, when indicated ($p<0.05$). In the chronic trial, SPG showed promise on days 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, and 15 for mechanical anti-allodynic results at concentrations of 1, 3, and 10 mg/kg. Concentrations of 5 and 30 mg/kg were effective on days 8, 9, 10, 14 and 15. In the abdominal writhing test, SPG concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 30.0 and 100,0 mg/kg promoted a reduction in writhing, respectively, 90.6%, 86.6%, 83.0%, 86.6% and 76.2%. In the formalin test, the concentration of 30mg/Kg reduced phase II nociception time by 78.06%. The animals did not demonstrate sedation in any of the concentrations used in the Rotarod test, except for the animals that received 100mg/Kg of SPG. Regarding to oxidative stress, SPG was effective in attenuating blood lipid peroxidation, as demonstrated by the reduction of TBA-RS by 5.0, 10.0, and 30.0 mg/kg. Furthermore, SPG at concentrations of 1.0 and 3.0 mg/kg partially reversed, 5.0 mg/kg, 10.0 and 30.0 mg/kg reversed and reduced increases in TBA-RS levels. In the sciatic nerve, concentrations of 1.0 and 3.0 mg/kg partially reversed, 5.0, 10.0 and 30.0 mg/kg reversed increases in TBA-RS levels. SPG at concentrations of 10.0 and 30.0 mg/kg reversed the reduction in plasma sulfhydryl content and at concentrations of 10.0 and 30.0 mg/kg SPG reversed the increase in CAT activity in erythrocytes. At

concentrations of 5.0, 10.0 and 30.0 mg/kg, SPG reversed the decrease in SOD activity in the sciatic nerve, indicating a protective antioxidant effect. The analysis of transaminases showed that the SPG in concentrations of 3.0mg/kg, 30.0mg/kg, and 100.0mg/kg showed changes in ALT activity, in relation to the urea and creatinine dosages, the GSP in none of the concentrations used changed the urea activity, and concentrations of 10.0mg/kg, and 100.0mg/kg showed changes in creatinine activity.

Keywords: Chronic pain, Complex regional pain syndrome, acute pain, SPG, fungal polysaccharide, *Schizophyllum commune*.

1 INTRODUCTION

According to estimates of the World Health Organization (WHO), about 40% of the total world population suffers from some type of chronic pain, and a study carried out by the Brazilian Society for the Study of Pain (SBED), in 2015, only in Brazil, the incidence of chronic pain was 37% among the population studied, indicating that this is an important public health problem. Patients who suffer from chronic pain are partially incapacitated, temporarily or permanently, significantly compromising their quality of life and hindering their ability to work (KRELING, CRUZ & PIMENTA, 2006; GARCIA, VIEIRA & GARCIA, 2013; SIQUEIRA, 2020).

Complex regional pain syndromes (CRPS) are multifactorial diseases with complex etiology and pathogenesis (ÁLVARES et al., 2009). CRPS is characterized as a condition of intense pain, associated with sensory and motor changes, which may arise spontaneously or after some type of trauma or injury (SILVA et al., 2018). Managing CRPS is challenging, in part due to a lack of clinical data on the effectiveness of various therapies, and in part, because successful treatment of CRPS requires a multidisciplinary, patient-adapted approach.

Studies report the link between the generation of free radicals by the mitochondrial respiratory chain and the pathophysiology of CRPS, as well as the increase in malondialdehyde, lactic dehydrogenase, uric acid, and superoxide dismutase in serum and saliva of patients with CRPS compared to control patients (CODERRE et al., 2004; EISENBERG et al., 2008; TAHA & BLAISE, 2012).

Common sensory changes in CRPS include hyperalgesia, allodynia, dysesthesia, and hyperesthesia, and the most common clinical signs are temperature difference and skin color (SILVA et al., 2018). Azambuja et al. (2004) point that the diagnosis of CRPS is mainly clinical, and its primary manifestation is the individual's regional pain, as objective diagnostic tests with sufficient specificity and sensitivity to be used in clinical practice are not yet available. Although analgesics from the non-steroidal anti-inflammatory class are among the best-selling drugs worldwide, with a market of about 25 million dollars annually, effective pharmacological monitoring of some types of pain continues to be a significant challenge for the medical-scientific community (ELY et al., 2015).

Polysaccharides of fungal origin have already been described in the literature for various treatments, one of which, the β-(1→3)-glucans, is associated with the activation of the immune system, and for this reason, these molecules may be new targets for the treatment of complex pain and syndromes (KHOURY et al., 2012).

Schizophyllum commune, mainly found in rotting wood in rainy seasons in tropical and subtropical forests is one of the species of *Schizophyllum* known primarily for being edible. Furthermore, the literature indicates that this macrofungus carries anti-carcinogenic, anti-tumor, and immunomodulatory compounds (AINSWORTH, 2008; BRADY et al., 2005; PATEL & GOYAL, 2011).

Yao et al. (2016) reported that phenolic acids isolated from *S. commune* in the writhing test reduced the number of writhes in mice by up to 71% and that in the formalin test, both phases (neurogenic and inflammatory) were significantly reduced. Smirdele et al. (2008) and Baggio et al. (2010) indicated the antinociceptive and anti-inflammatory action of the β-glucan (1→3),(1→6) isolated from *Pleurotus pulmonarius,* a macrofungus from the same class as *S. commune,* in acute pain models (acetic acid-induced writhing and formalin test), that promoted a significant reduction of nociception time with the 30mg/Kg dose.

Given the above, emphasis has been placed on the search for new molecular targets for pain treatment. In the process of searching for new analgesics, pre-clinical research is important to define paths and minimize risks, in order to propose more effective and safer therapies.

Considering the anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic potential of *S. commune* (SMIRDELE et al., 2008; BAGGIO, 2010; YAO et al., 2016) and the relative difficulty of controlling CRPS pain, it is possible that substances derived from this macrofungus may be an effective and safe alternative to alleviate it. Thereby, this study aimed to evaluate the effects of polysaccharides extracted from *Schizophyllum commune* on acute pain and chronic neuropathic pain in mice.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Production, extraction, purification, and characterization of the polysaccharide

The cultivation for the production of exopolysaccharides, as well as the extraction and purification processes, were carried out in partnership with

researchers Ana Paula Vanin, Marli Camassola and Nicole Dalonso in partnership with the Institute of Biotechnology of the University of Caxias do Sul.

The strain used for the production of exopolysaccharides was Schizophyllum commune 227E.32 (28°58'08.33"S; 50°28'58.08"W).

The purification and characterization of polysaccharides in relation to monosaccharide composition, types of glycosidic bonds, and structure was developed in partnership with Professor Dr. Elaine Rosechrer Carbonero from the Department of Chemistry at the Federal University of Catalão - GO.

To carry out this work, a 3g sample of β-(1→3)-glucan partially substituted in O-6 by non-reducing glucose residues was received, characterizing this polysaccharide as β-(1→3)-(1→ 6)-glucan.

2.5 Animals

Male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days) were used. Before the experimentation process, the animals were accommodated (7 per cage) and acclimated for 7 days to adapt to a new environment. They were kept in rooms on a 12h light/dark cycle, at a constant temperature of 22° C, with free access to food and water. The experiments were carried out according to the provisions of Law 11,794, of October 8, 2008, and in the other rules applicable to the use of animals in teaching and/or research, especially the Normative Resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation - CONCEA. The project was submitted for evaluation by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the University of the Region of Joinville (UNIVILLE) and approved by the opinion document 001/2021. All procedures involving animals were performed only and exclusively after the ethical approval of the project.

The conditions of environment, lighting, accommodation, and nutrition followed the recommendations required by the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

After the adaptation period, all animals were evaluated before any type of experimental procedure (baseline test) for physiological comparison between different organisms. The animals were also evaluated after the induction of neuropathic pain, and then after the administration of the SPG of *S. commune.*

2.6 CRPS-I ischemia-reperfusion model

Animals were anesthetized intraperitoneally with an association of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg) for general anesthesia to last for 120 minutes. After induction of anesthesia, an elastic tourniquet (Oband n 16; Kyowa Limited, Osawa, Japan), was placed around the left posterior leg of the mice just next to the ankle joint for 120 minutes (KLAFKE et al, 2016). The cessation of anesthesia was scheduled so that the mice would recover fully within 120 minutes after reperfusion, which occurred immediately after the tourniquet was removed. Control groups were anesthetized, but the elastic tourniquet was cut right after so the ankle was only loosely surrounded and did not obstruct blood flow in the hind leg. Previous experiments have shown that during this time interval, the development of mechanical hyperalgesia and cold allodynia is successfully induced (CODERRE et al, 2004; KLAFKE et al, 2016).

2.7 Chronic model

After confirming the development of ischemic pain by the model associated with ischemia-reperfusion, the test to evaluate the reduction of ischemic pain in a chronic model with SPG at different doses was performed.

The SPG administrations were carried out for sixteen consecutive days, with a 24-hour interval between administrations, before the Von Frey test was performed. The animals were divided into 12 groups, each containing 7 animals. Groups II, III, IV, V, and IV of the SDCR-I model received an intraperitoneal application of SPG at the respective concentrations: 1, 3, 5, 10, and 30 mg/kg. Groups I and VII received an intraperitoneal application of vehicle (saline) and control groups VIII, IX, X, XI, and XII received an intraperitoneal application of SPG at the following concentrations: 1, 3, 5, 10, and 30 mg/kg.

On the 18th day, the animals were sacrificed by decapitation in the absence of anesthesia, with all blood collected and the sciatic nerve removed for evaluation of oxidative stress parameters.

2.8 von Frey test (mechanical stimulus)

To study the sensitivity to mechanical stimuli, the test was performed using von Frey filaments of increasing intensity (0.02-10 g), as previously described (DIXON, 1980; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). Briefly, the animals were acclimatized in the experimentation site, which consists of elevated chambers with a wire mesh floor, for 1 hour. After this period, stimulation of the right hind paw of each animal was performed with von Frey filaments by the up-and-down method.

The first filament used promoted a pressure of 0.60 g, if the paw was withdrawn, a filament with lower pressure would be applied. If there was no withdrawal, a filament with greater pressure would be used. In total, up to six simulations could be performed, using 0.16 filaments; 0.40; 0.60; 1.0: 1.4; and 2.0. With the results obtained, the value corresponding to 50% of the threshold, in g, that each animal endured (threshold 50%) was calculated. A decrease in this value was considered mechanical hyperalgesia and a reversal in this decrease was an antinociceptive (anti-hyperalgesic) effect (DIXON, 1980).

After induction of CRPS, the test was performed daily for 16 consecutive days.

2.10 Acute model

2.10.1 Writhing test

The nociceptive response was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 0.9% acetic acid (0.1 mL/10 g, i.p.) in mice pretreated thirty minutes before with SPG at different doses (0.1, 1, 3, 5, 10, 30 and 100 mg/kg, via i.p.) to screen for the most effective dose via this route. Control animals received 0.9% saline solution (0.1 mL/10 g, i.p.). The animals were observed for 20 minutes and the number of abdominal writhings was recorded, as described by Koster, Anderson, and Debeer (1959).

The animals were divided into 14 groups, each with 7 animals, control group I received only saline administration, and control groups II, III, IV, V, VI, and VII received saline in addition to SPG at the concentrations described above.

Group VIII received administration of saline in addition to 0.9% acetic acid and groups IX, X, XI, XII, XIII, and XIV received administration of acetic acid in addition to SPG at the same concentrations as the control group.

2.10.2 Formalin test

Animals treated half an hour before with SPG at concentrations of 1, 10, and 30 mg/kg, via i.p., to screen the most effective concentration by this route, received an intraplantar injection of formalin (2.5%, 40 µL) or intraplantar saline solution (40 µL) in the left paw. Soon after, the animals were observed for 40 minutes to monitor the time of nociceptive behavior. Control animals received 0.9% saline solution (40 µL, intraplantar) in the left paw (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR, HOLE, 1987).

The animals were divided into 8 groups, each with 5 animals, control group I received only intraplantar saline administration, and control groups II, II,I and IV received intraplantar saline in addition to intraperitoneal SPG at the concentrations described above. Group V received intraperitoneal saline administration in addition to intraplantar formalin (2.5%, 40 µL) and groups VI, VII and VIII received intraplantar formalin administration (2.5%, 40 µL) in addition to SPG at the same concentrations of the control group.

2.10.3 Rotarod Test

The Rotarod test (DUNHAM and MIYA, 1957) is one of the oldest used to assess the effects of a drug on animal behavior. It provides a quick estimate of whether a substance has an effect on neuromuscular coordination. The Rotarod consists of a circular rod rotating at a constant or increasing speed (BOHLEN et al, 2009). Drugs that alter neuromuscular coordination, such as benzodiazepines, reduce the time that animals are able to remain on the pole (RUSTAY et al., 2003). Diazepam is normally used as a reference when performing the test (WILLIAMS, 2007).

The test was performed with mice from the same groups used in the chronic test, on the 12th day after the Von Frey tests, as well as on the 17th day after the Von Frey tests.

2.11 Samples Preparation

Erythrocyte and plasma preparation

For erythrocyte separation, peripheral blood was collected and transferred to heparinized tubes, which were centrifuged at 1,000 rpm. The plasma was removed by aspiration and maintained frozen at −80 °C until assay. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and lysates were prepared by adding 1 mL of distilled water to 100 µL washed erythrocytes and maintained frozen at −80 °C until the determination of the antioxidant enzyme activities (LIMA *et al*., 2017). For the determination of antioxidant enzyme activity, erythrocytes were frozen and thawed three times and centrifuged at 13,500 rpm for 10 min. The supernatant was diluted to contain approximately 0.5 mg/mL of protein (LIMA *et al*., 2017).

Serum preparation

Serum was prepared from total blood samples obtained from rats. The peripheral blood was rapidly collected and transferred to tubes without anticoagulant, centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, after the serum was separated and used for the analyses of liver and kidney function (LIMA *et al*., 2017).

Sciatic nerve preparation

The sciatic nerve of the ischemic hind paw was removed, kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl), and homogenized in ten volumes (1:10 w/v) of the appropriate buffer. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuged at 800 rpm for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved and stored at −80°C for further determination of parameters of oxidative stress (LIMA *et al*., 2017).

Tissue preparation for histopathological analysis

After the animals died, the liver and the left kidney were removed and fixed in 10% formalin and prepared according to the protocol described below: dehydrated in a growing series of alcohol, and xylol baths and prepared for inclusion in paraffin for subsequent microtomy about 6μm thick. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin for qualitative analysis under light microscopy.

2.8 Biochemical studies

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa *et al.* (1979). The methodology for the analysis of TBA-RS measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Initially, plasma or sciatic nerve in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetra methoxy propane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed/mg of protein.

Total Sulfhydryl Content

The total sulfhydryl content was determined according to the method of Aksenov & Markersbery (2001), which is based on the reduction of dithiol nitrobenzoic acid (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB), which is measured spectrophotometrically at 412 nm. For the assay, 50 μL of homogenate or plasm were added to 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 μL of 10 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Analysis of a blank (DTNB absorbance) was also performed. The results were expressed as nanomoles of TNB/mg protein.

Catalase Assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984). This method is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) in a reaction medium composed of 25µL of sample and 600 µL of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 20 mM H_2O_2. The absorbance was counted every 10 seconds for 1 minute and 40 seconds at 240 nm using a spectrophotometer. One CAT corresponds to 1 µmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Superoxide Dismutase Assay (SOD)

The activity of SOD was assayed by the method described by Marklund (1985), a highly dependent superoxide (O_2^-) process, which is a substrate for SOD. 15 µL of each sample were added to 215 µL of a mixture containing 50 µM Tris buffer, 1 µM EDTA, pH 8.2, and 30 µM CAT. Subsequently, 20 µL of pyrogallol was added and the absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a spectrophotometer. Inhibition of auto-oxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly tested spectrophotometrically. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Glutathione Peroxidase Assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using *tert*-butylhydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was controlled in a spectrophotometer at 340 nm for 3 minutes and 30 seconds. 90 µL of each sample was added to the medium containing 800 µL of buffer, 20 µL of 2.0 mM GSH, 30 µL of 0.15 U/mL GSH reductase, 10 µL of 0.4 mM azide, and 10 µL of 0.1 mM NADPH. The absorbance was counted every 10 seconds for 1 minute and 30 seconds. Subsequently, 50 µL of 0.5 mM *tert*-butylhydroperoxide were added and the absorbance was read for a further 2 minutes. One GSH-Px unit is characterized as 1 µmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is defined as GSH-Px units/mg of protein.

Determination of transaminases, urea, and creatinine

The measurements of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, and creatinine were performed with Liquiform kits (Labtest). Absorbance was determined using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer, following the manufacturer's package instructions.

2.9 Histopathological analysis

Histopathological characteristics indicative of damage to the tissues were analyzed, such as the presence of inflammation, vascular congestion, fibrosis, and vacuolar degeneration of the nucleus and cytoplasm (SHARMA et al., 2019). Each of these characteristics was graded on a severity scale from 0 to 5 (0=absent, 1=minimal, 2=slight 3=moderate, 4=marked, 5= severe) adapted from (CRISSMAN et al. 2004; KERLIN et al. 2016; PALAZZI et al. 2016; SCHAFER et al., 2018).

2.10 Statistical analysis

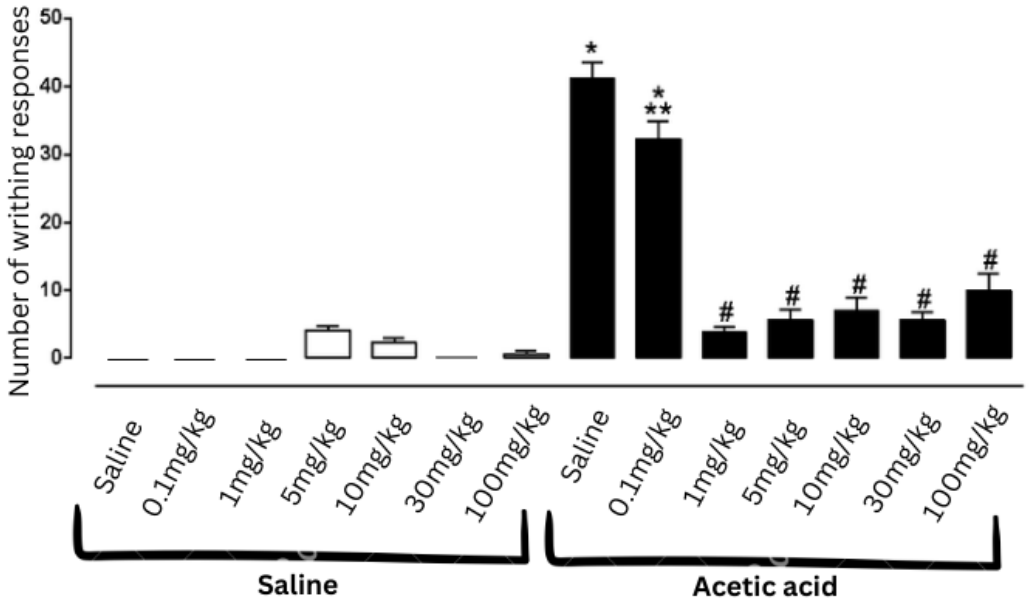
Statistical analyses were performed using the IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows, version 20.0, using a PC-compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov normality test was performed to confirm a parametric distribution; data were then analyzed by ANOVA, followed by Duncan's *posthoc* test, when the F-test was significant. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Results are expressed as means ± SD for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. ***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05, compared to Duncan's multiple range test.

3 RESULTS

3.1 Effect of the administration SPG on the writhing test

Results showed that animals treated with saline solution intraperitoneally thirty minutes before receiving saline solution, SPG at concentrations of 0.1, 1, and 30 mg/kg showed no writhing. Despite concentrations of 5, 10 and 100 mg/kg promoted a little number of writhing in the animals that received saline, however, was not statistically significant compared to controls. The application of acetic acid thirty minutes after the administration of saline solution induced abdominal contortions in greater intensity ($p < 0.001$), which were significantly reduced by all concentrations of SPG. Only 0.1 mg/Kg concentration differed statistically from the other in writhing reduction. Concentrations of 1; 5 and 30 mg/kg did not differ even from the group that received saline intraperitoneally. The concentration of 0.1 mg/Kg of SPG promoted a significant reduction in the number of writhes (21.8%), but its intensity was lower than the concentrations of 1mg/Kg onwards (Figure 1). The concentrations of 1, 5, 10, 30 and 100 mg/kg of the SPG promoted reduced writhing of, respectively, 90.6%, 86.6%, 83.0%, 86.6% and 76.2%.

Figure 1. Test of abdominal writhing in mice exposed to different concentrations of SPG.



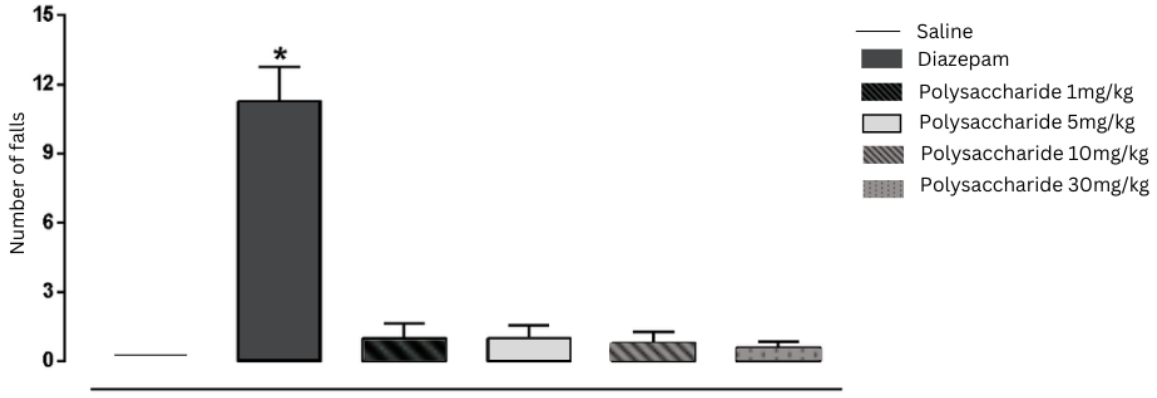
*Statistically significant difference between the saline group which received acetic acid and groups treated with SPG ($p < 0.001$). **Statistically significant difference between the 0.1mg/kg group

which received acetic acid and groups treated with SPG ($p < 0.001$). #Statistically significant difference between the 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 30mg/kg and 100mg/kg groups wich received acetic acid and groups treated with SPG ($p < 0.001$).

3.2 Effect of acute and chronic administration of SPG on rotarod test

In this test, the number of falls of the device's bar that rotated at 8 rpm in a time interval of three minutes was measured. According to Figure 2, in the acute administration, the application of 0.9% saline solution (0.1 ml/10g) intraperitoneally 30 minutes before the motor coordination test (control group) did not promote falls, while the previous administration of diazepam (5mg/Kg), a central nervous system depressor, promoted a significant increase ($p<0.001$) in the number of falls (Figure 2), while no concentration of SPG differed from the saline group in a number of falls.

Figure 2. Rotarod test in animals exposed to different concentrations of SPG in a time interval of three minutes.

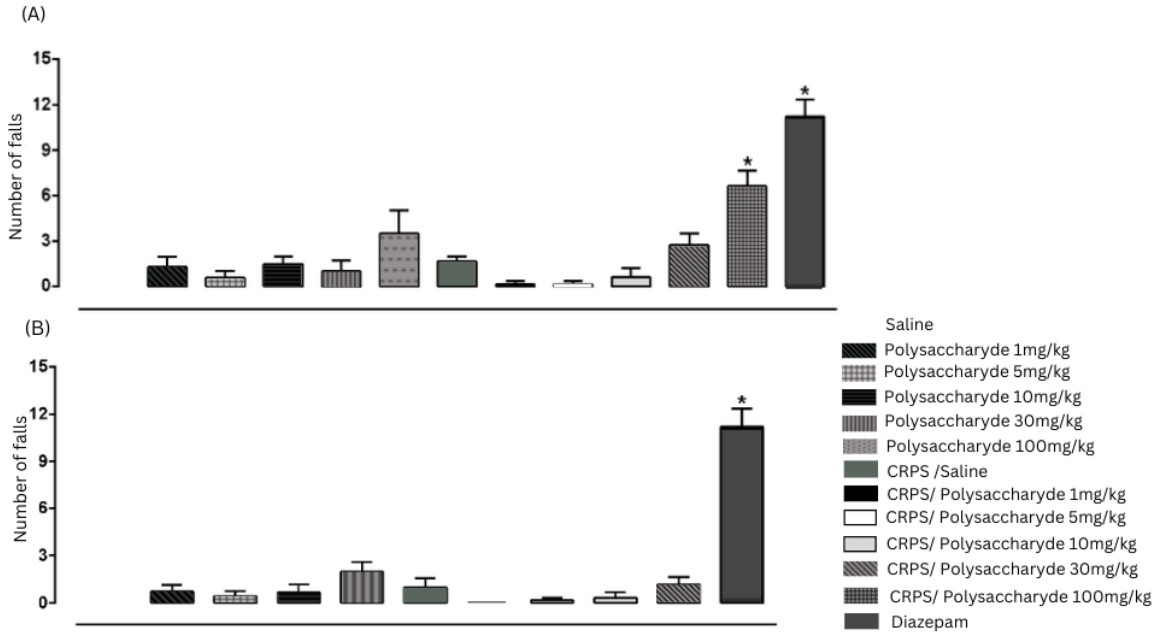


*statistically significant difference between the saline group and groups treated with SPG ($p < 0.001$).

In the chronic administration of the extract, the concentration of 100 mg/kg promoted statistically significant sedation in the animals that underwent CRPS induction, reflected by the increase in the number of falls in this on the 12th day (Figure 3A) of extract application. However, at the time of the last test day (Figure 3B), all animals that received this concentration of the extract (CRPS inducted or

not) died. There was no significant sedation promoted by the other concentrations of the SPG on the twelfth and seventeenth days of exposure.

Figure 3. Rotarod test in animals exposed to different concentrations of SPG for twelve and seventeen days.

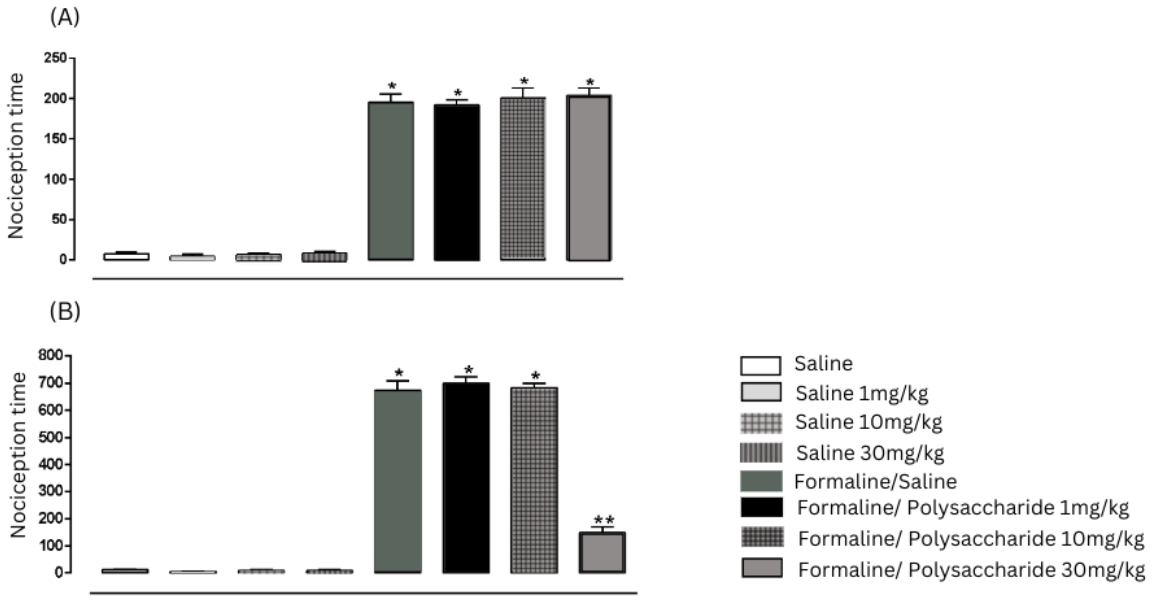


(A) Twelve days (B) Seventeen days *Statistically significant difference between the saline group and groups treated with SPG ($p < 0.001$).

3.3 Effect of the administration of SPG on the formalin test

SPG was ineffective in reducing the nociception time of the first phase of the formalin test (Figure 4A). The second phase was not changed by 1 and 10mg/Kg, however, the 30 mg/Kg concentration promoted a significant reduction of 78.06% (Figure 4B) of nociception time. No SPG concentration promoted significant nociception time in animals that received saline solution in the paw.

Figure 4. Effect of different concentrations of SPG on the first and second phases of the formalin test.



(A) First phase (B) Second phase. *Statistically significant difference about the saline-saline group ($p<0.001$). **Statistically significant difference between the saline-formalin, 1mg/kg-formalin, and 10mg/kg-formalin groups ($p < 0.001$).

3.4 Effect of the administrations of SPG on chronic post-ischemia-induced mechanical allodynia

The CRPS promoted an increase in sensitivity to von Frey filaments on days (D) 3 to D6, D8, D10 to D12, D14, and D15, in which there was a statistically significant reduction in the pressure on the paw tolerated by the animals. Concentrations of 1, 3, and 10 mg/kg of the SPG effectively promoted a significant increase in filament tolerability on all these days, with no statistical difference between concentrations.

Concentrations of 5 and 30 mg/kg were effective on D8 to D10 and D14 and D15. It is possible that the greater variability of the measurements contributed to the fact that these concentrations did not reach significant efficacy on the other days as the other concentrations. No concentration of SPG promoted significant changes in mechanical sensitivity in control animals (Table 1).

A reduction of the lower tolerability intensity of mechanical allodynia from 55% to 86% was observed (Table 2). Although there was a tendency to increase the reduction intensity over time, no statistically significant difference was found between the days.

Table 1. Effect of SPG on mechanical allodynia in response to von Frey filaments (g).

	Control (C) + vehicle	C + (SPG) 1 mg/Kg	C + (SPG) 3 mg/Kg	C + (SPG) 5 mg/Kg	C + (SPG) 10 mg/Kg	C + (SPG) 30 mg/Kg	CRPS + vehicle	CRPS + (SPG) 1 mg/Kg	CRPS + (SPG) 3 mg/Kg	CRPS + (SPG) 5 mg/Kg	CRPS + (SPG) 10 mg/Kg	CRPS + (SPG) 30 mg/Kg
D0	1.76 ± 0.24	2.00 ± 0.08	2.00 ± 0.10	2.00 ± 0.18	2.00 ± 0.07	2.00 ± 0.12	1.76 ± 0.24	2.00 ± 0.14	2.00 ± 0.19	2.00 ± 0.06	2.00 ± 0.06	1.58 ± 0.08
D1	1.58 ± 0.01	2.00 ± 0.18	1.79 ± 0.23	2.00 ± 0.21	1.01 ± 0.25	2.00 ± 0.09	1.24 ± 0.34	2.00 ± 0.18	2.00 ± 0.08	1.76 ± 0.20	2.00 ± 0.01	2.00 ± 0.08
D2	2.00 ± 0.01	1.80 ± 0.19	1.79 ± 0.23	2.00 ± 0.17	1.91 ± 0.17	2.00 ± 0.17	2.00 ± 0.43	0.69 ± 0.01	2.00 ± 0.08	1.76 ± 0.23	2.00 ± 0.18	1.76 ± 0.23
D3	1.26 ± 0.13	1.71 ± 0.70	2.00 ± 0.12	2.00 ± 0.08	2.00 ± 0.16	2.00 ± 0.27	**0.59 ± 0.30***	**2.14 ± 0.29****	**1.88 ± 0.21****	0.90 ± 0.09	**1.90 ± 0.18****	1.29 ± 0.23
D4	1.58 ± 0.01	2.00 ± 0.16	1.90 ± 0.09	1.58 ± 0.09	2.00 ± 0.17	1.76 ± 0.16	**0.56 ± 0.17***	**1.58 ± 0.17****	**1.52 ± 0.12****	1.20 ± 0.29	**2.00 ± 0.19****	**2.00 ± 0.01****
D5	1.76 ± 0.24	1.23 ± 0.12	2.00 ± 0.06	2.00 ± 0.22	1.70 ± 0.03	1.78 ± 0.05	**0.27 ± 0.16***	**1.11 ± 0.47****	**1.66 ± 0.14****	1.29 ± 0.71	**1.36 ± 0.28****	1.29 ± 0.70
D6	2.00 ± 0.11	1.73 ± 0.26	1.79 ± 0.13	1.11 ± 0.34	1.27 ± 0.70	2.00 ± 0.10	**0.53 ± 0.05***	0.99 ± 0.07	**1.76 ± 0.15****	**2.00 ± 0.28****	**2.00 ± 0.24****	1.39 ± 0.23
D7	1.52 ± 0.01	1.24 ± 0.34	1.87 ± 0.14	1.52 ± 0.21	2.00 ± 0.20	1.58 ± 0.13	1.16 ± 0.01	1.79 ± 0.12	2.00 ± 0.11	2.01 ± 0.12	2.01 ± 0.15	2.00 ± 0.01
D8	1.26 ± 0.10	2.00 ± 0.16	2.00 ± 0.03	2.00 ± 0.16	2.00 ± 0.08	1.58 ± 0.10	**0.73 ± 0.01***	**2.00 ± 0.17****	**2.00 ± 0.10****	**2.00 ± 0.10****	**2.00 ± 0.10****	**2.00 ± 0.10****
D9	1.79 ± 0.21	1.58 ± 0.11	2.00 ± 0.36	1.45 ± 0.34	1.90 ± 0.17	2.00 ± 0.10	2.00 ± 0.01	1.52 ± 0.18	0.97 ± 0.28	1.79 ± 0.09	1.52 ± 0.20	2.00 ± 0.01
D10	2.22 ± 0.20	2.00 ± 0.23	2.00 ± 0.01	1.58 ± 0.24	1.58 ± 0.10	1.58 ± 0.14	**0.73 ± 0.01***	**2.00 ± 0.15****	**2.00 ± 0.01****	**2.00 ± 0.03****	**2.00 ± 0.03****	**1.96 ± 0.05****
D11	2.00 ± 0.14	2.00 ± 0.20	2.00 ± 0.09	1.90 ± 0.09	2.00 ± 0.12	1.55 ± 0.11	**0.76 ± 0.01***	**1.69 ± 0.08****	**2.00 ± 0.07****	**2.00 ± 0.08****	**2.00 ± 0.08****	**2.00 ± 0.08****
D12	2.20 ± 0.21	1.79 ± 0.13	1.79 ± 0.20	1.58 ± 0.15	1.34 ± 0.25	2.00 ± 0.10	**0.54 ± 0.06***	**2.00 ± 0.10****	**2.01 ± 0.05****	**2.00 ± 0.08****	**1.90 ± 0.10****	**2.00 ± 0.12****
D13	2.22 ± 0.19	1.55 ± 0.30	2.00 ± 0.36	1.58 ± 0.22	1.54 ± 0.13	2.00 ± 0.16	2.00 ± 0.33	1.58 ± 0.11	2.03 ± 0.20	1.55 ± 0.01	2.00 ± 0.20	2.00 ± 0.09
D14	1.68 ± 0.07	166 ± 0.10	2.00 ± 0.14	1.59 ± 0.43	1.55 ± 0.44	1.50 ± 0.49	**0.31 ± 0.17***	**2.00 ± 0.30****	**1.76 ± 0.13****	**2.00 ± 0.14****	**1.90 ± 0.05****	**2.21 ± 0.12****
D15	1.58 ± 0.14	2.00 ± 0.12	2.00 ± 0.26	1.55 ± 0.21	1.62 ± 0.10	2.00 ± 0.14	**0.54 ± 0.05***	**2.00 ± 0.07****	**1.81 ± 0.10****	**1.79 ± 0.10****	**2.00 ± 0.15****	**2.00 ± 0.07****

D16	1.78 ± 0.20	1.79 ± 0.21	2.00 ± 0.18	1.58 ± 0.16	1.79 ± 0.12	1.52 ± 0.20	1.67 ± 0.12	1.42 ± 0.15	2.00 ± 0.11	2.00 ± 0.08	2.00 ± 0.08	2.00 ± 0.07

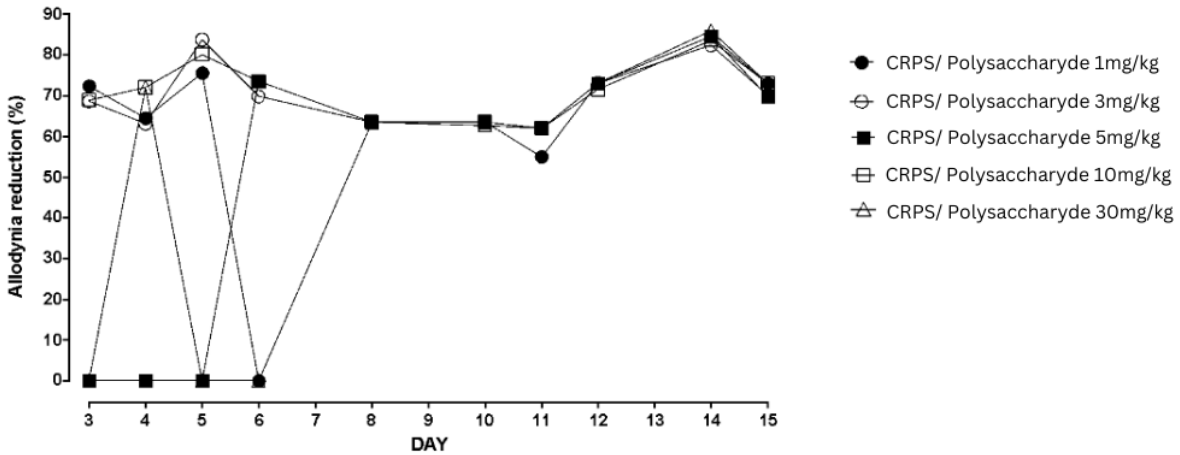
*Statistically significant difference in relation to the control group + saline (P < 0.01).

**Statistically significant difference in relation to the CRPS + saline group (P < 0.01).

Table 2. The intensity of mechanical allodynia reduction after treatment with SPG.

	CRPS + (SPG) 1 mg/Kg	CRPS + (SPG) 3 mg/Kg	CRPS + (SPG) 5 mg/Kg	CRPS + (SPG) 10 mg/Kg	CRPS + (SPG) 30 mg/Kg
D3	72.4%	68.6%	Not applicable	68.9%	Not applicable
D4	64.5%	63.1%	Not applicable	72.0%	72.0%
D5	75.6%	83.7%	Not applicable	80.1%	Not applicable
D6	Not applicable	69.8%	73.5%	73.5%	Not applicable
D8	63.5%	63.5%	63.5%	63.5%	63.5%
D10	63.5%	63.5%	63.5%	63.5%	62.7%
D11	55.0%	62.0%	62.0%	62.0%	62.0%
D12	73.0%	73.1%	73.0%	71.5%	73.0%
D14	84.5%	82.3%	84.5%	83.6%	86.0%
D15	73.0%	70.1%	69.8%	73.0%	73.0%

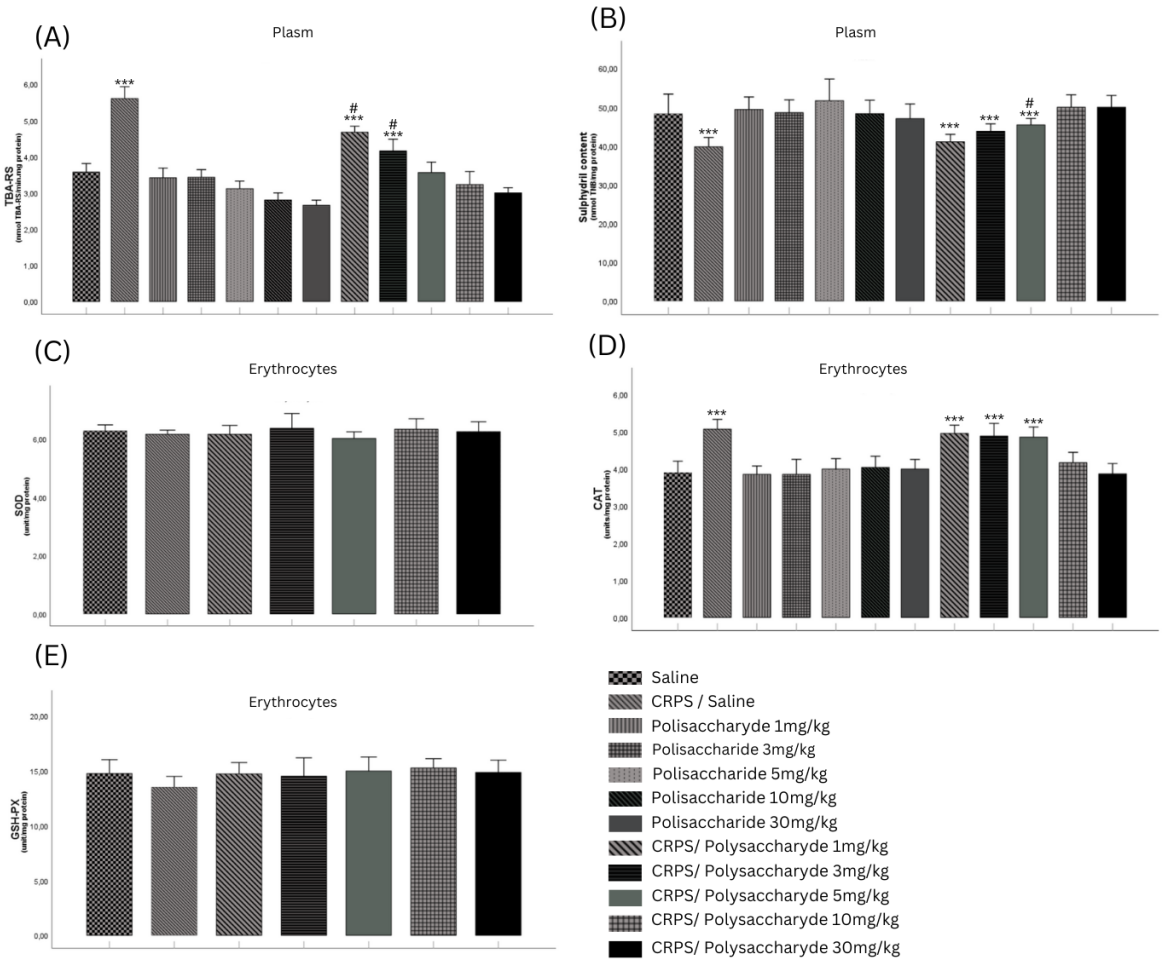
Figure 5. Effect of SPG on mechanical allodynia in response to von Frey filaments (g).



3.5 Chronic effect of the administration of SPG on the alterations in the blood oxidative stress parameters caused by a model of regional complex pain syndrome (CRPS)

CRPS model increased TBA-RS (A) [$F(11,72)=67.763$; $p<0.001$], reduced total sulfhydryl content (B) [$F=(11,72)=7.087$; $p<0.001$], increased CAT activity (D) [$F(11,720=17.441$; $p<0.001$] and did not alter SOD (C) [$F(6,42)=0.832$; $p>0.05$] and GSH-Px (E) [$F(6,42)=1.303$; $p>0.05$] activities (Figure 6). *Post hoc* analysis showed that polysaccharides from *S. commune, "per se"* did not alter the parameters analyzed when compared to the control group, except, "*per se"* reduced TBA-RS at concentrations of 5, 10, and 30 mg/kg. Furthermore, SPG at concentrations of 1 and 3 mg/kg partially reversed, at 5 mg/kg reversed, and at 10 and 30 mg/kg reversed and diminished the increases in TBA-RS levels, when compared to the control group (Figure 6A), at concentrations of 1 and 3 mg/kg did not reverse, at 5 mg/kg partially reversed and at 10 and 30 mg/kg reversed the reduction in sulfhydryl content (Figure 6B). For antioxidant enzyme CAT, polysaccharides from *S. commune,* at concentrations of 1, 3, and 5 mg/kg did not reverse, and at 10 and 30 mg/kg reversed the increase in CAT activity (Figure 6D) caused by CRPS model in the blood of mice.

Figure 6. Chronic effect of the administrations of SPG (1, 3, 5, 10 and 30 mg/kg) on the alterations in the blood oxidative stress parameters.



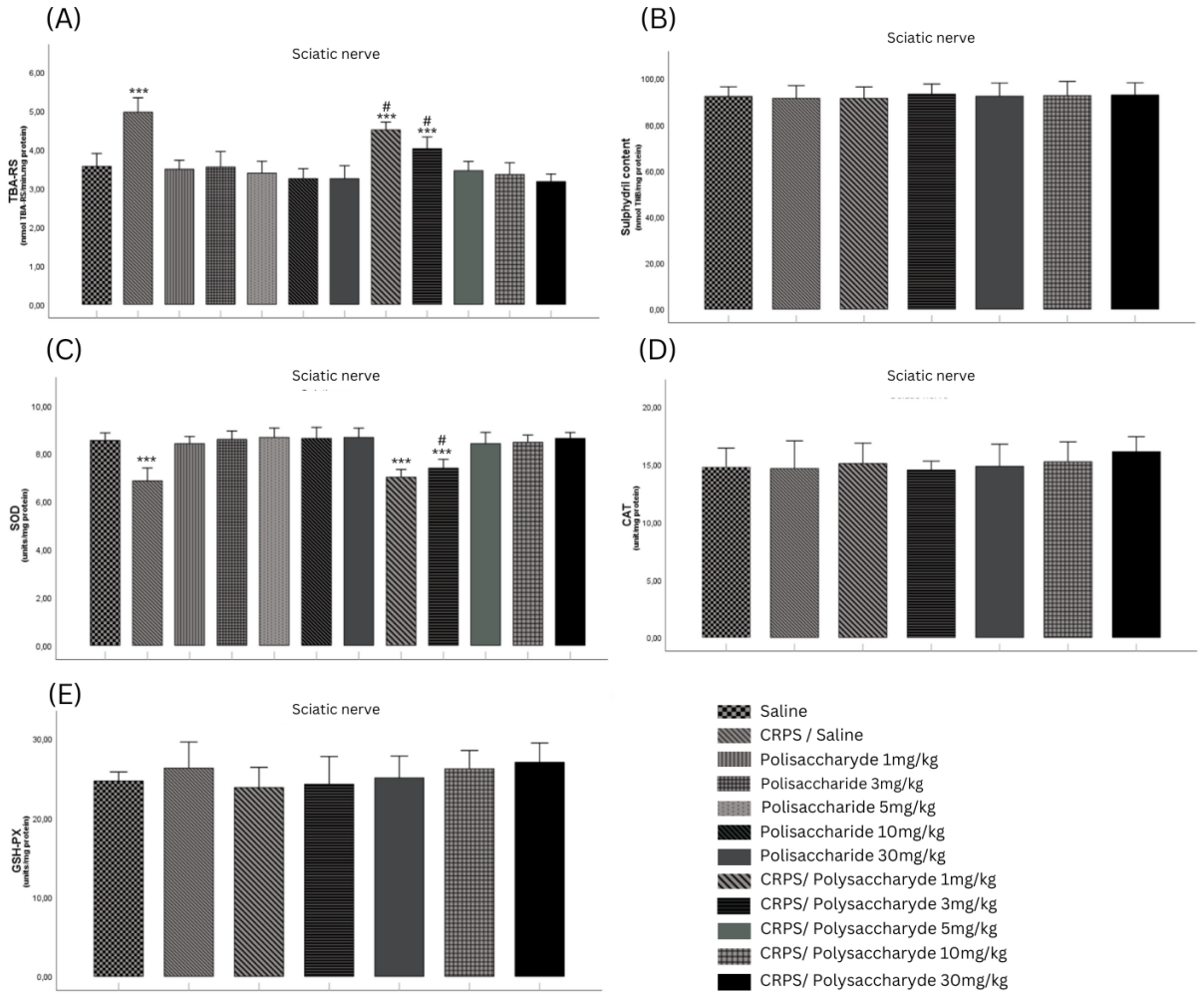
(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) Sulfhydryl content in the plasm, (C) SOD activity (D,) CAT activity and (E) GSH-Px activity in the erythrocytes of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). ***p<0.001, compared to saline; #partially prevented.

3.6 Chronic effect of the administration of SPG on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters caused by a model of regional complex pain syndrome (CRPS)

Figure 7 shows that the CRPS model increased TBA-RS (A) [F(11,67)=20.898; p<0.001] and reduced SOD activity (C) [F(11,72)=19.483; <0.001] in the sciatic nerve of mice. Conversely, did not alter total sulfhydryl content (B) [F(6,42)=0.103; p>0.05], CAT (D) [F(6,42)=0.581; p>0.05] and GSH-Px (E) [F(6,37)=1.263; p>0.05] antioxidant enzymes activities, when compared to the control group. *Post hoc* analysis showed that SPG*, "per se"* did not alter the

parameters analyzed when compared to the control group. Furthermore, SPG at concentrations of 1 and 3 mg/kg partially reversed and at 5, 10 and 30 mg/kg reversed the increases in TBA-RS levels (Figure 7A). Regarding SOD activity, SPG at 1 mg/kg did not reverse, at 3 mg/kg partially reversed and at 5, 10 and 30 mg/kg reversed the decrease in the activity of SOD (Figure 7C).

Figure 7. Chronic effect of the administrations of SPG (1, 3, 5, 10, and 30 mg/kg) on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters.



(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) Sulfhydryl content (C) SOD activity (D) CAT activity and (E) GSH-Px activity in the sciatic nerve of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). ***p<0.001, compared to control; # partially prevented.

3.7 Investigation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of SPG

Verifying the effect of the administrations of SPG on the activity of transaminases (AST and ALT) to assess hepatotoxicity and on urea and creatinine to assess nephrotoxicity in mice. Table 3 shows that SPG in concentrations of 3mg/kg, 30mg/kg, and 100mg/kg showed alterations in the activity of ALT [p>0.05], and no alterations on AST [p>0.05].

Table 3. Effect of SPG on hepatic parameters.

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
Control	266,60	21,90
SPG 1 mg/kg	325,30	41,00
SPG 3 mg/kg	337,20	55,08
SPG 5 mg/kg	396,00	37,80
SPG 10 mg/kg	362,00	24,96
SPG 30 mg/kg	256,80	47,94
SPG 100 mg/kg	387,33	64,43

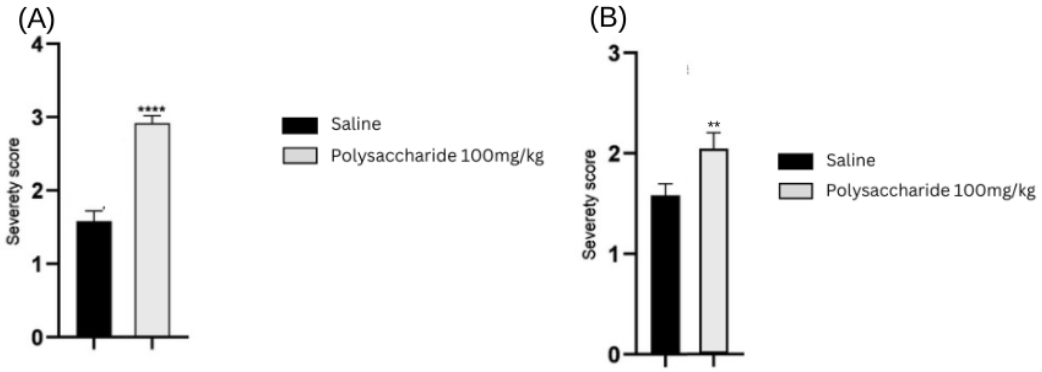
Finally, we also verified the effect of the administrations of SPG on the activity of urea and creatinine to assess nephrotoxicity in mice. Table 4 shows that SPG in none of the concentrations used altered the activity of urea and concentrations of 10mg/kg, and 100mg/kg showed alterations in the activity of creatinine [p>0.05].

Table 4. Effect of SPG on renal parameters.

Group	UREA (mg/dL)	CREATININE (mg/dL)
Control	49,17	0,37
SPG 1 mg/kg	49,50	0,37
SPG 3 mg/kg	51,20	0,28
SPG 5 mg/kg	51,80	0,39
SPG 10 mg/kg	50,50	0,44
SPG 30 mg/kg	48,00	0,40
SPG 100 mg/kg	49,20	0,51

Histological analysis of kidney and liver (Figure 8) showed that in concentrations of 100mg/kg, were observed in the kidney, leukocyte infiltration, vascular congestion, glomerular necrosis, and fibrosis (A), while in the liver, leukocyte infiltration, vascular congestion, acidophilia that indicates the death of hepatocytes and rare steatosis were observed (B).

Figure 8. Histological analysis of kidney and liver or mice.



(A) Histological analysis of kidney tissue, (B) Histological analysis of liver tissue. Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). ***p<0.001, compared to control; **p<0.005 compared to control.

4 DISCUSSION

Considering that analgesics available for CRPS-I efficacy are not well established and promote low to moderate control of pain intensity, this study investigated the effect of SPG in the acute and chronic phases of an animal model of CRPS-I, and acute pain, oxidative stress parameters and on the activity of antioxidant enzymes in the blood and sciatic nerve of mice. We also evaluated SPG's acute hepatic and nephrotoxicity in order to predict toxicity.

Data from the literature show that by applying a tourniquet, the ischemia-reperfusion model promotes a state of nociceptive sensory hypersensitivity that lasts up to 4 weeks in rats and allows acute and chronic evaluation of potential treatments (CODERRE et al, 2004). In the same study, the authors showed that the administration of antioxidant compounds, N-acetyl-L-cysteine (NAC) and 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperydine-1-oxyl (Tempol) 48 hours after ischemic injury significantly reversed mechanical allodynia

in the animals, demonstrating the contribution of oxidative stress to the installed process.

Thereafter, Coderre & Bennet (2010) characterized the pathophysiological profile of the model. When installed, CRPS-I is featured by significant regional edema that develops due to plasma leakage into the interstitial space, increased vascular permeability, and pressure exerted by fluid accumulation, which compresses the capillaries of adjacent tissues and causes a compartment syndrome, in which there is occlusion of capillary flow, thus, it is possible that the edema that develops in the period after tourniquet removal causes compartment syndrome.

Through the use of a tourniquet, Tang et al. (2017) observed the development of edema in both males and females and the installation of the CRPS-I condition three days after reperfusion in males and two days after in females. This was done to confirm the model's applicability in mice. Increased serum levels of interleukin-2, TNF-alpha, different isoprostanoids, and malondialdehyde were linked to allodynia, indicating that inflammation and oxidative stress were involved in the process.

Similar to the results of Coderre et al. (2004), there was an increase in pro-inflammatory cytokines (interleukin-2 and TNF-alpha) and a decrease in interleukin-4 (an anti-inflammatory), as well as the development of edema in both males and females and mechanical allodynia. Altogether, these findings imply that CRPS-I is caused by ischemia injury, which produces cytokines, inflammation, and oxidative stress, leading to both acute and chronic pain (TANG et al., 2017).

In order to better understand the fungal polysaccharides and polysaccharide-protein complexes, a number of biological responses have been presented, including anticancer, antioxidative, and immunological stimulatory actions, as well as, more recently, antinociceptive and anti-inflammatory properties (BAGGIO et al. 2010; CARBONERO et al. 2008; NOVAK and VETVICKA 2008; RUTHES et al. 2013; SMIRDELE et al. 2008).

Thus, total polysaccharides have lower protective effects when compared to purified β-glucans, which only contain polysaccharides with b linkages. This can be explained by the lower amount of β-glucan in the total extracts, as β-glucan is known to have important antioxidant properties. Fungal β-glucans may elicit a

range of other biological activities, and our goal was to correlate anti-inflammatory, antinociceptive, and antioxidant activity with their chemical structure.

Acetic acid formalin tests are thought to act by releasing endogenous inflammatory mediators such as glutamate, bradykinins, prostanoids, and cytokines that stimulate primary sensory neurons (RIBEIRO et al, 2000; IKEDA et al 2001; SCHEIDT et al., 2002).

The manifestations of abdominal writhings in mice were first described by Sigmund (1957). The abdominal writhing test is susceptible to the presence of analgesic activity in test compounds, being fast and simple to perform and, therefore, widely used to screen for the existence of anti-inflammatory properties, since acetic acid promotes the response to the local inflammatory process, whose mediators result in sensitization of nociceptors and consequent expression of the stereotypical behavior of pain by the animals (COLLIER et al., 1968; BURKE and FITZGERALD, 2006). Thus, the compounds that are effective in reducing the number of writhings act by modulating the inflammatory response triggered by acetic acid.

In the present study, it was observed that 1 mg/kg promoted a maximum analgesic effect, as higher doses did not differ significantly reducing the number of high-intensity abdominal writhing, evidencing the consistency of the SPG effect. No concentration of the SPG promoted writhing at a relevant intensity in animals that received saline as a control of acetic acid, so the SPG does not tend to cause significant local inflammation.

The formalin test evaluates the duration of time the animals spend licking the injected paw as an algic response. An early phase lasting the first five minutes and a late phase lasting 20 to 40 minutes following formalin injection are the two separate phases of intense nociceptive behavior that may be distinguished. A primary afferent C-fiber drive is linked to both phases of the behavioral response, which is expected to initiate and maintain activity-dependent sensitization at the spinal level (DUBUISSON and DENNIS, 1977; TJØLSEN et al., 1992; MCCALL et al., 1996).

Phase one of the formalin test is characterized by nociceptive pain, mediated by direct depolarization of nociceptors due to the stimulus caused by the intraplantar application of formaldehyde, which promotes tissue damage, the early phase is short, followed by a brief (5 min) period of relative quiescence. This

phase is attenuated by drugs that act on opioid receptors since they promote hyperpolarization of nociceptors; or by antagonistic compounds of ionotropic receptors for glutamate, which are ionic channels permeable to ions that trigger action potentials in nociceptive neurons.

The second phase of the formalin test is due to the recruitment of the inflammatory response as a result of tissue damage induced by formalin, which is mainly mediated by prostaglandins and, therefore, is attenuated by compounds with anti-inflammatory action, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs and steroids (FU et al., 2000). Thus, the reduction of the second phase time of nociceptive behavior of the formalin test suggests that the compound has an anti-inflammatory effect and, therefore, analgesic action for pain arising from this nature: SPG may act by modulating the synthesis of pro-inflammatory mediators, such as histamine, serotonin, bradykinin, and prostaglandins, that are recruited after tissue injury caused by formalin.

The Rotarod test described by Dunham and Miya (1957) is one of the earliest methods for evaluating how drugs affect animal behavior, providing a quick, straightforward assessment of whether a chemical has any impact on neuromuscular coordination. Animals may only stay on the rod for a shorter period of time while under the influence of benzodiazepines, such as diazepam, which is typically used as a reference (positive control for CNS depression) (RUSTAY et al., 2003; WILLIAMS, 2007).

Despite the qualitative observation of reduced general activities and drowsiness, the animals were not sedated to the point of being prevented from manifesting the nociceptive behaviors monitored in the abdominal writhing and formalin tests. There was no CNS depression at the level of relevant motor regions when a single concentration of the extract was applied. Thus, this test is relevant for confirming analgesia and excluding a sedative effect that could mask the nociceptive behavior recorded in the other two pain tests.

Smiderle et al. (2008) and Baggio et al. (2010) indicated the antinociceptive and anti-inflammatory action of the β-glucan (1→3),(1→6) isolated from *Pleurotus pulmonarius,* a macrofungus from the same class as *S. commune* in acute pain models (acetic acid-induced writhing and formalin test), such as the present study, that promoted a significant reduction of nociception time with the 30mg/Kg concentration. Ruthes et al. (2013) also demonstrate that *Amanita muscaria*

fucomannogalactan and β-D-glucan were successful in protecting mice against the inflammatory pain caused by formalin-induced nociception with the results of reduction of 91 ± 8% at a concentration of 30 mg/kg.

Abreu et al. (2019) in their work about *Pholiota nameko* demonstrated that the β-D-glucan at 0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg significantly inhibited the inflammatory pain in 24.8, 56.9 and 82.3%, respectively, in the inflammatory phase of the formalin-induced nociception in mice. Interestingly, the same pattern was also observed in the present study.

Purified mannogalactan from *Pleorotus sajor-caju* was effective in reducing the nociception that acetic acid (54,2%) and formalin generated in mice. Furthermore, mannogalactan therapy decreased the antinociceptive and anti-edematogenic effects showing anti-inflammatory properties (SILVEIRA et al., 2015). These tests revealed that the anti-inflammatory action of the mushroom β-D-glucans, which approaches that of nonsteroidal anti-inflammatory medicines, is likely related to the analgesic effect (RUTHES et al. 2013; SMIRDELE et al. 2008). However, more experiments are necessary to identify the specific mechanism behind this inhibition of inflammation.

Peripheral nerve injuries are often accompanied by transient local inflammation, which probably contributes to the initiation of neuropathic pain. Various inflammatory mediators and chemokines can be released from damaged axons or Schwann cells or from satellite cells, mast cells, and infiltrating leukocytes (JI; STRICHARTZ 2004). Our findings showed that SPG significantly reduced the mechanical allodynia's lower tolerability intensity from 55% to 86% in the CPRS-I model, which tended to grow over time.

It was found that the production of pro-inflammatory mediators (NO, IL-6, and TNF-), as well as the expression of iNOS and COX-2, were all in varying degrees reduced by polysaccharides linked to β-glucan, the triple-helical polysaccharides with β-(1→3, 1→6) linked glucose units exhibited stronger anti-inflammatory activity, within a range of concentration that did not result in cell death toxicity (JEN et al, 2021). Baggio et al. (2010, 2011) demonstrated that the β-glucan (1→3),(1→6) isolated from *Pleurotus pulmonarius* carried strong anti-inflammatory and analgesic (antinociceptive) properties related to a mechanism of antinociception involving interleukin-1 pathways, transient receptor potential channels, and ionotropic glutamate receptors.

When the biochemical parameters were examined, it was found that oxidative stress played a significant role in the induction of CRPS-I, as animals that suffered ischemia showed significant elevations of TBA-RS in the sciatic nerve and plasma, as well as a reduction in total sulfhydryl content and increased protein carbonylation in the sciatic nerve, indicating that oxidative stress was not limited to the injured nerve.

The SPG isolated from the mushroom *S. commune* were evaluated for their antioxidant potential known to reduce the damage mainly through reactive oxygen species. Mushroom fungi's β-(1→3) glucan had a significant impact on its antioxidant activities, a similar phenomenon was documented in other investigations (CHEN et al., 2009; ANGELI et al., 2009), and this implied a connection between the β-glucan content and antioxidant ability.

The antioxidative activity of fungus polysaccharides is attributed to their capacity for ROS scavenging, reduction property, and capacity to chelate Fe2+, as well as to their inhibition of lipid peroxidation and induction of erythrocyte hemolysis, and increased activity of enzymes in both eukaryotic and prokaryotic cells that participate in antioxidative processes, such as SOD, CAT, and GSH-Px (JIA et al., 2009; KOZARSKI et al., 2014).

According to Zhonghui et al. (2013), the polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, which contains β- (1→3) glucan, enhanced the serum activities in skeletal muscle tissues of mice of SOD, GSH-Px, and CAT , leading to a significant decrease in lipid peroxidation products like malondialdehyde in mice on exhaustive exercise-induced oxidative stress.

SPG was effective in attenuating blood lipid peroxidation, as shown by TBA-RS reduction in 5, 10, and 30 mg/kg. Furthermore, SPG at concentrations of 1 and 3 mg/kg partially reversed (45.78% and 71.11% respectively), 5 mg/kg reversed 100.68%, and 10 and 30 mg/kg reversed and reduced 16.86% and 28.14%, respectively the increases in TBA-RS levels. In the sciatic nerve, 1 and 3 mg/kg concentrations partially reversed (32.6% and 67.1% respectively), 5, 10, and 30 mg/kg reversed 107.6%, 120.9%, and 127.8%, respectively the increases in TBA-RS levels, to the point of the higher concentration resembles the level of control animals, preventing intensely and relevantly neural damage by oxidative stress.

Zou et al. (2015) reported that the antioxidant activity of mushroom extracts can be attributed to many types of compounds present in the mushroom fruit bodies, one of the most important functional components in mushrooms are polysaccharides.

Reactive oxygen species (ROS) can oxidize SH groups in albumin, the plasma's most plentiful source of sulfhydryl groups, boosting oxidative damage (VAN DIJK et al., 2020). SPG at concentrations 10 and 30 mg/kg reversed 119.6% the reduction in sulfhydryl content in plasm and at the concentration of 10 and 30 mg/kg SPG reversed 76.8% and 102.4% respectively the increase in CAT activity in the erythrocytes. At concentrations of 5, 10 and 30 mg/kg SPG reversed 92.3%, 95.7%, and 105.1%, respectively the decrease in the activity of SOD was observed in the sciatic nerve, indicating the antioxidant protector effect.

It should be noted that the degree of these changes reflects the modulation required to reduce the oxidative stress brought on by ischemia. Ryu et al. (2010) used the ischemia-reperfusion model to create CRPS-I and treatment with allopurinol and SOD decreased mechanical allodynia by lowering the phosphorylation of NDMA receptor subunits to glutamate. In contrast to SOD, which acts by preventing the development of peroxynitrite, allopurinol works by inhibiting xanthine oxidase, which reduces the synthesis of superoxide. This reduces central sensitization, which in turn reduces the increase in nociceptive sensory processing.

Other studies also support the idea that oxidative stress plays a role in the pathophysiology of CRPS-I: While Coderre et al. (2004) discovered an increase in TBA-RS in the musculature of the hind paw of rats that underwent induction of CRPS that was susceptible to reduction with antioxidant treatment. Considering that mitochondria are the primary generators of ROS, it makes sense to hypothesize those oxidative stress-related dysfunctions in these cells may play a significant role in the pathophysiology of CRPS-I. However, more research is required to determine whether this trait contributes to or results from CRPS-I.

Polysaccharides' antioxidant activity is attributed to their capacity to scavenge and reduce free radicals and Fe2+ ions chelation, inhibition of lipid peroxidation, erythrocyte hemolysis, and enhancement of antioxidant enzymes activities such as SOD, CAT, and GSH-Px in both eukaryotic and prokaryotic cells

(TSENG et al. 2008; MENGYONG et al. 2009; GUO et al. 2009; LIU et al. 2011; LO et al. 2011).

Some studies have linked the ability of polysaccharides to promote an increase in the synthesis of antioxidant enzymes like SOD and GSH-Px in addition to an increase in their activity (LIU et al. 2014). *L. edodes* was the fungus that has undergone the most research addressing the antioxidant potential of its polysaccharides (JIA et al. 2009). According to Kozarski (2012) in an *in vitro* investigation, *L. edodes* polysaccharides demonstrated an 84.6% reduction of lipid peroxidation at a concentration of 20.0 mg/mL.

The antioxidant activity of polysaccharide extracts from *T. versicolor* and *L. edodes* increased steadily, reaching values of 31.3% and 84.6% at 20.0 mg/mL, respectively (KOZARSKI et al, 2012). By using the conjugated diene technique, Lo et al. (2011) found *in vitro* tests that the polysaccharides of *L. edodes* inhibited lipid peroxidation by 14.56% to 58.27% at a concentration of 1.5 mg/mL, and discovered a significant correlation between the monosaccharide ratio and antioxidant activity.

Given the nature of the damage caused by CRPS-I, oxidative stress is directly involved and can have a considerable impact on how quickly the damage progressed. SPG is able to reduce the oxidative damage caused by CRPS-I, since it reverses the increase in lipid peroxidation, the reduction in the content of sulfhydryls, and the changes caused in enzymatic antioxidant activity in the blood and sciatic nerve, corroborating the anti-inflammatory effect.

Due to the death of some mice, we interrupted the tests using the concentration of 100mg/kg of SPG and performed histological analysis of the kidney and liver of these animals, which demonstrated an increase in the safety score. Were observed in the kidney tissue, leukocyte infiltration, vascular congestion, glomerular necrosis, and fibrosis, while in the liver, were observed leukocyte infiltration, vascular congestion, and acidophilia indicating the death of hepatocytes besides rare steatosis.

The toxicity analyses of transaminases demonstrated that SPG in concentrations of 3mg/kg, 30mg/kg, and 100mg/kg showed alterations in the activity of ALT and didn’t show any statistically significant alterations in AST. Regarding the urea and creatinine dosages, the SPG in none of the concentrations used altered the activity of urea, and concentrations of 10mg/kg,

and 100mg/kg showed alterations in the activity of creatinine, which suggests caution in the concentrations used

In conclusion, the exposed results indicate that SPG has significant antinociceptive and anti-inflammatory effects on chronic and acute pain models, suggesting a potential ability to decrease the perception of pain. Also, SPG has antioxidant activity, especially in concentrations of 10mg/Kg and 30mg/Kg. However, additional research is needed to confirm the preclinical encouraging results so far and to develop better therapeutic options for conditions like CRPS-I.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). Thanks to the researchers Ana Paula Vanin, Marli Camassola, and Nicole Dalonso for supplying the purified polysaccharide, and the biotechnology institute from Universidade de Caxias do Sul. Thanks to Elizia Barbosa da Silva from the Department of Natural Sciences - Universidade Regional de Blumenau (FURB). Thanks to Santa Helena laboratory from Jaraguá do Sul and FAPESC.

5 REFERENCES

ABREU, Hellen; SIMAS, Fernanda Fogagnoli; SMIDERLE, Fhernanda Ribeiro; SOVRANI, Vanessa; DALLAZEN, Jorge Luiz; MARIA-FERREIRA, Daniele; WERNER, Maria Fernanda; CORDEIRO, Lucimara M.C.; IACOMINI, Marcello. Gelling functional property, anti-inflammatory and antinociceptive bioactivities of β-D-glucan from the edible mushroom Pholiota nameko. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 122, p. 1128-1135, fev. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.062.

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzimology, v. 105, p. 121-126, 1984. Doi 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

AINSWORTH, Geoffrey Clough. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. Uk: Cabi, 2008. 771 p.

ÁLVARES, Juliana Furtado, PAZ, Nathalia Mansur, VIÇOSO, Tomas Magno, ABRANTES , Wilson Luiz. Síndrome Dolorosa Regional Complexa: atualização. **Rev Med Minas Gerais**, v *19* p. 111-115, 2009

ANGELI, José Pedro F.; RIBEIRO, Lúcia R.; ANGELI, José Lourenço F.; MANTOVANI, Mário S.. Protective effects of β-glucan extracted from barley against benzo[a]pyrene-induced DNA damage in hepatic cell HepG2. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 83-89, jan. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2008.05.003.

BAGGIO, Cristiane Hatsuko; FREITAS, Cristina Setim; MARTINS, Daniel Fernandes; MAZZARDO, Leidiane; SMIDERLE, Fhernanda Ribeiro; SASSAKI, Guilherme Lanzi; IACOMINI, Marcello; MARQUES, Maria Consuelo Andrade; SANTOS, Adair Roberto Soares. Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β-Glucan Isolated From Pleurotus pulmonarius in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal Of Pain**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 965-971, out. 2010. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.01.005.

BAGGIO, Cristiane Hatsuko; FREITAS, Cristina Setim; MARCON, Rodrigo; WERNER, Maria Fernanda de Paula; RAE, Giles Alexander; SMIDERLE, Fhernanda Ribeiro; SASSAKI, Guilherme Lanzi; IACOMINI, Marcello; MARQUES, Maria Consuelo Andrade; SANTOS, Adair Roberto Soares. Antinociception of β-d-glucan from Pleurotus pulmonarius is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 872-877, abr. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.023.

BOHLEN, Martin; CAMERON, Andy; METTEN, Pamela; CRABBE, John C.; WAHLSTEN, Douglas. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 178, n. 1, p. 10-14, mar. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.11.001.

BRADY, Killian C.; O'KIELY, Padraig; FORRISTAL, Patrick D.; FULLER, Hubert. Schizophyllum commune on big-bale grass silage in Ireland. **Mycologist**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 30-35, fev. 2005. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1017/s0269915x05001059.

BURKE, Anne; FITZGERALD, Garret. Analgesic-antipyretic agents: pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, Laurence (ed.). **Goodman and Gilmans the Pharmacological Basis of Therapeutics.** 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006. Cap. 25. p. 653-670.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; KOMURA, D.L.; MARCON, R.; FREITAS, C.s.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.R.s.; TORRI, G.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.. Lentinus edodes heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 111, n. 3, p. 531-537, dez. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.015.

CHEN, Song; YIN, Deng-Ke; YAO, Wen-Bing; WANG, Yi-Dan; ZHANG, Yi-Ran; GAO, Xiang-Dong. Macrophage receptors of polysaccharide isolated from a marine filamentous fungus Phoma herbarum YS4108. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 1008-1014, jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/aps.2009.93.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) 112 produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. Pain, v. 112, p. 94-105. 2004.

CODERRE, Terence J.; BENNETT, Gary J.. Objectifying CRPS-I. **Pain**, [S.L.], v. 138, n. 1, p. 3-4, 15 ago. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.006.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, Christine A.; SCHNEIDER, C.. THE ABDOMINAL CONSTRICTION RESPONSE AND ITS SUPPRESSION BY ANALGESIC DRUGS IN THE MOUSE. **British Journal Of Pharmacology And Chemotherapy**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 295-310, fev. 1968. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x.

CRISSMAN, James W.; GOODMAN, Dawn G.; HILDEBRANDT, Paul K.; MARONPOT, Robert R.; PRATER, Donald A.; RILEY, Julia H.; SEAMAN, William J.; THAKE, Daryl C.. Best Practices Guideline: toxicologic histopathology. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 126-131, jan. 2004. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1080/01926230490268756.

DALONSO, Nicole; PETKOWICZ, Carmen L.O.; LUGONES, Luis G.; SILVEIRA, Marcia L.L.; GERN, Regina M.M.. Comparison of cell wall polysaccharides in Schizophyllum commune after changing phenotype by mutation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 93, n. 4, 2021. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120210047.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1980; 20:441–62.

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G.. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, [S.L.], v. 4, n. , p. 161-174, out. 1977. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0.

DU, Bin; YANG, Yuedong; BIAN, Zhaoxiang; XU, Baojun. Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of Schizophyllum commune. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 8, p. 254-257, 15 maio 2017. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00252.

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G.. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, [S.L.], v. 4, n. , p. 161-174, out. 1977. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.s.. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice**College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. **Journal Of The American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 208-209, mar. 1957. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1002/jps.3030460322.

EISENBERG, Elon; SHTAHL, Shalom; GELLER, Rimma; REZNICK, Abraham Z.; SHARF, Ordi; RAVBINOVICH, Meirav; ERENREICH, Adam; NAGLER, Rafael M.. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. **Pain**, [S.L.], v. 138, n. 1, p. 226-232, 15 ago. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.019.

ELY, L. S. ENGROFF, P.; GUISELLI, S. R.; CARDOSO, G. C.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A. Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 18, n. 3, p. 475-485, 2015. Disponível em . Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/1809-9823.2015.14141.

FARIÑA, J. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from Sclerotium rolfsii. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 41-50, jan. 2001. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0144-8617(00)00189-2.

FU, K.-Y.; LIGHT, A.R.; MAIXNER, W.. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neuroscience**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 1127-1135, nov. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00376-6.

GARCIA, Beatriz Tavares; VIEIRA, Erica Brandão Mores; GARCIA, João Batista Santos. Relação entre dor crônica e atividade laboral em pacientes portadores de síndromes dolorosas. **Revista Dor**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 204-209, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s1806-00132013000300011.

GUO, Hang; KOUZUMA, Yoshiaki; YONEKURA, Masami. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 238-245, mar. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.081.

HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 103-114, jul. 1987. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1.

IASP. **Therminology**. 2014. Disponível em: https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/. Acesso em: 12 maio 2022.

IASP. **Characterization of chronic pain.** 1994. Disponível em: https://www.iasp-pain.org/publications/free-ebooks/classification-of-chronic-pain-second-edition-revised/. Acesso em: 10 de jun. 2022.

IKEDA, Yuri; UENO, Akinori; NARABA, Hiroaki; OH-ISHI, Sachiko. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, [S.L.], v. 69, n. 24, p. 2911-2919, nov. 2001. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01374-1.

JI, Ru-Rong; STRICHARTZ, Gary. Cell Signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. **Science'S Stke**, [S.L.], v. 2004, n. 252, p. 123-145, 28 set. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/stke.2522004re14.

JIA, Jie; ZHANG, XI; HU, Yong-Shan; WU, Yi; WANG, Qing-Zhi; LI, Na-Na; GUO, Qing-Chuan; DONG, Xin-Cun. Evaluation of in vivo antioxidant activities of Ganoderma lucidum polysaccharides in STZ-diabetic rats. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 115, n. 1, p. 32-36, jul. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.043.

JEN, Chia-I; SU, Chun-Han; LAI, Ming-Nan; NG, Lean-Teik. Comparative anti-inflammatory characterization of selected fungal and plant water soluble polysaccharides. **Food Science And Technology Research**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 453-462, 2021. Japanese Society for Food Science and Technology. http://dx.doi.org/10.3136/fstr.27.453.

KERLIN, Roy; BOLON, Brad; BURKHARDT, John; FRANCKE, Sabine; GREAVES, Peter; MEADOR, Vince; POPP, James. Scientific and Regulatory Policy Committee. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 147-162, 23 dez. 2015. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0192623315623265.

KLAFKE, J. Z; DA SILVA, M. A; ROSSATO, M. F; DE PRÁ, S. D. T; RIGO, F. K; WALKER, C. I. B, et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. Pflügers Arch - Eur J Physiol. 2016; 21;468(2):229–41.

KLAUS, Anita; KOZARSKI, Maja; NIKSIC, Miomir; JAKOVLJEVIC, Dragica; TODOROVIC, Nina; VAN GRIENSVEN, Leo J.L.D.. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete Schizophyllum commune. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 2005-2011, dez. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.010.

KHOURY, D. El; CUDA, C.; LUHOVYY, B. L.; ANDERSON, G. H.. Beta Glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal Of Nutrition And Metabolism**, [S.L.], v. 2012, p. 1-28, 2012. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2012/851362.

KOZARSKI, Maja; KLAUS, Anita; NIKSIC, Miomir; VAN, Griensven; VRVIC, Miroslav; JAKOVLJEVIC, Dragica. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure, and antioxidative activity. **Chemical Industry**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 305-320, 2014. National Library of Serbia. http://dx.doi.org/10.2298/hemind121114056k.

KRELING, Maria Clara Giorio Dutra; CRUZ, Diná de Almeira Lopes Monteiro da; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 509-513, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0034-71672006000400007.

LIMA, A. B. et al. Hypolipemiant and antioxidant effects of Eugenia brasiliensis in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. Biomedicine & Pharmacotherapy 96 (2017) 642–649.

LIU, Qian; KONG, Baohua; LI, Guangxing; LIU, Ning; XIA, Xiufang. Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 49, n. 6, p. 1316-1321, jun. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.013.

LIU, Yong; DU, Yi-Qun; WANG, Jun-Hui; ZHA, Xue-Qiang; ZHANG, Jian-Bo. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 64, p. 63-68, mar. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.029.

LO, Tiffany Chien-Ting; CHANG, Cheng Allen; CHIU, Kong-Hwa; TSAY, Pei-Kwei; JEN, Jen-Fon. Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 320-327, ago. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.056

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-267, 1951.

MENGYONG, Zhu; CAIJIAO, Wang; YONG, Gu; CHANGSHENG, He; XIAO, Teng; PING, Zhang; NING, Lin. Extraction, characterization of polysaccharides from

Morinda officinalis and its antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 78, n. 3, p. 497-501, 15 out. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.008.

MCCALL, W.D.; TANNER, Kimberly D.; LEVINE, Jon D.. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 208, n. 1, p. 45-48, abr. 1996. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12552-0.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: GREENWALD, R. A. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, 1985, p. 243-247.

MURPHY, Emma J.; REZOAGLI, Emanuele; POGUE, Robert; SIMONASSI-PAIVA, Bianca; ABIDIN, Ismin Izwani Zainol; FEHRENBACH, Gustavo Waltzer; O'NEIL, Emer; MAJOR, Ian; LAFFEY, John G.; ROWAN, Neil. Immunomodulatory activity of β-glucan polysaccharides isolated from different species of mushroom – A potential treatment for inflammatory lung conditions. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 809, p. 152177, fev. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152177.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, v. 95, p. 351-358, 1979.

PATEL, Seema; GOYAL, Arun. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **3 Biotech**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-15, 25 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2.

PALAZZI, Xavier; BURKHARDT, John E.; CAPLAIN, Henri; DELLARCO, Vicki; FANT, Pierluigi; FOSTER, John R.; FRANCKE, Sabine; GERMANN, Paul; GRÖTERS, Sibylle; HARADA, Takanori. Characterizing “Adversity” of Pathology Findings in Nonclinical Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 810-824, 11 jul. 2016. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0192623316642527.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, Methods in Enzimology, v. 233, p. 357-363, 1994. Disponível em . Acesso em 24 set. 2020. Doi: 10.1016/s0076-6879(94)33041-7.

RIBEIRO, Ronaldo; VALE, Mariana L; THOMAZZI, Sara M; PASCHOALATO, Adriana B.P; POOLE, Steve; FERREIRA, Sergio H; CUNHA, Fernando Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 387, n. 1, p. 111-118, nov. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00790-6.

RYU, Tae Ha; JUNG, Kyung Young; HA, Mi Jin; KWAK, Kyung Hwa; LIM, Dong Gun; HONG, Jung Gil. Superoxide and Nitric Oxide Involvement in Enhancing of N-methyl-D-aspartate Receptor-Mediated Central Sensitization in the Chronic Post-ischemia Pain Model. **The Korean Journal Of Pain**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-10, 31 mar. 2010. Korean Pain Society. http://dx.doi.org/10.3344/kjp.2010.23.1.1.

ROSSATO, M. F; TREVISAN, G; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; DE OLIVEIRA, A. P, VILLARINHO, J. G, et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. Biochem Pharmacol. 2011; 15;81(4):544–51.

RUSTAY, Nathan R; WAHLSTEN, Douglas; CRABBE, John C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 141, n. 2, p. 237-249, maio 2003. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00376-5.

RUTHES, Andrea Caroline; CARBONERO, Elaine R.; CÓRDOVA, Marina Machado; BAGGIO, Cristiane Hatsuko; SASSAKI, Guilherme Lanzi; GORIN, Philip Albert James; SANTOS, Adair Roberto Soares; IACOMINI, Marcello. Fucomannogalactan and glucan from mushroom Amanita muscaria: structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 761-769, out. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.061.

SHARMA B. R. ; Park, C. M.; KIM, H.; KIM, H. J.; RHYU, D.Y. Tinospora cordifolia preserves pancreatic beta cells and enhances glucose uptake in adipocytes to regulate glucose metabolism in diabetic rats. Phytotherapy Research. 33:2765–2774. 2019

SCHAFER, Kenneth A.; EIGHMY, John; FIKES, James D.; HALPERN, Wendy G.; HUKKANEN, Renee R.; LONG, Gerald G.; MESECK, Emily K.; PATRICK, Daniel J.; THIBODEAU, Michael S.; WOOD, Charles E.. Use of Severity Grades to Characterize Histopathologic Changes. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 256-265, 12 mar. 2018. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0192623318761348.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A.R.s.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimanial. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 340-347, set. 2002. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00117-x.

SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G.. A Method for Evaluating both Non-Narcotic and Narcotic Analgesics. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 95, n. 4, p. 729-731, 1 ago. 1957. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.3181/00379727-95-23345.

SILVA, M. A.; FIGUEIRA, P. J.; SILVA, V. B.; BOAVENTURA, S. B.; MARQUES, E.; BRANCO, P. S. Síndrome dolorosa regional complexa do tipo I: da prevenção ao tratamento. **Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia**, v. 26, n. 1, p. 30-42, 2018. Disponível em . Acesso em 24 set. 2020.

SILVEIRA, Marcia L.L.; SMIDERLE, Fhernanda R.; AGOSTINI, Franciane; PEREIRA, Eduardo M.; BONATTI-CHAVES, Mariane; WISBECK, Elisabeth; RUTHES, Andréa Caroline; SASSAKI, Guilherme L.; CIPRIANI, Thales R.; FURLAN, Sandra A.. Exopolysaccharide produced by Pleurotus sajor-caju: its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal Of Biological**

Macromolecules, [S.L.], v. 75, p. 90-96, abr. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.023.

SIQUEIRA, Vitória de Barros; LUNA, Aislany Warlla Nunes; MELO, Danielly Coelho de; SILVA, Lana Quele Pereira da; GAMA, Mariana Pereira; OLIVEIRA, Monica Larissa do Nascimento Paes. Dor e adoecimento entre a equipe de enfermagem. **Revista de Enfermagem Ufpe On Line**, [S.L.], v. 14, p. 231-242, 2 jul. 2020. Revista de Enfermagem, UFPE Online. http://dx.doi.org/10.5205/1981-8963.2020.244210.

SHU, Chin-Hang; HSU, Hui-Ju. Production of schizophyllan glucan by Schizophyllum commune ATCC 38548 from detoxificated hydrolysate of rice hull. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 387-393, maio 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2010.08.009.

SMIDERLE, Fhernanda R.; OLSEN, Lorena M.; CARBONERO, Elaine R.; BAGGIO, Cristiane H.; FREITAS, Cristina S.; MARCON, Rodrigo; SANTOS, Adair R.s.; GORIN, Philip A.J.; IACOMINI, Marcello. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β-glucan isolated from Pleurotus pulmonarius. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 597, n. 1-3, p. 86-91, nov. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.08.028.

SUTIVISEDSAK, Nongnuch; LEATHERS, Timothy D; PRICE, Neil Pj. Production of schizophyllan from distiller's dried grains with solubles by diverse strains of Schizophyllum commune. **Springerplus**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 470-476, 22 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-476.

TANG, C. et al. Sex differences in complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) in mice. Journal of pain research, v. 10, p. 1811-1819, 2017.

TAHA, Rame; BLAISE, Gilbert A.. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: role of oxidative stress. **Canadian Journal Of Anesthesia/Journal Canadien D'Anesthésie**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 875-881, 14 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12630-012-9748-y.

TJØLSEN, Arne; BERGE, Odd-Geir; HUNSKAAR, Steinar; ROSLAND, Jan Henrik; HOLE, Kjell. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 5-17, out. 1992. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t.

TREVISAN, G; ROSSATO, M. F; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; ROSA, F; OLIVEIRA, S. M, et al. Identification of the plant steroid α-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. J Pharmacol Exp Ther. 2012; 343(2):258–69.

TSENG, Yu-Hsiu; YANG, Joan-Hwa; MAU, Jeng-Leun. Antioxidant properties of polysaccharides from Ganoderma tsugae. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 107, n. 2, p. 732-738, mar. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.073.

VAN DIJK, Peter R.; PASCH, Andreas; VAN OCKENBURG-BRUNET, Sonja L.; WAANDERS, Femke; ABDULLE, A. Eman; MUIS, Marian J.; HILLEBRANDS, J. L.; BILO, Henk J. G.; VAN GOOR, Harry. Thiols as markers of redox status in type 1 diabetes mellitus. **Therapeutic Advances In Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 11, p. 204201882090364, jan. 2020. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/2042018820903641.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. Methods in Enzimology, v. 77, p. 325-333, 1981

YAO, Hui-Min; WANG, Gan; LIU, Ya-Ping; RONG, Ming-Qiang; SHEN, Chuan-Bin; YAN, Xiu-Wen; LUO, Xiao-Dong; LAI, Ren. Phenolic acids isolated from the fungus Schizophyllum commune exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. Chinese Journal Of Natural Medicines, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 661-670, set. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1875-5364(16)30078-4.

YELITHAO, Khamphone; SURAYOT, Utoomporn; LEE, Changsheng; PALANISAMY, Subramanian; PRABHU, Narayanasamy Marimuthu; LEE, Juhun; YOU, Sangguan. Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomannans from Schizophyllum commune. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 218, p. 37-45, ago. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.057.

ZHONGHUI, Zhao; XIAOWEI, Zheng; FANG, Fang. Ganoderma lucidum polysaccharides supplementation attenuates exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle of mice. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 119-123, abr. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.004.

ZOU, Yu; JIANG, Aili; TIAN, Mixia. Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from Auricularia auricula fruiting bodies. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 428-433, 25 ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6712.

6 REFERÊNCIAS

ÁLVARES, Juliana Furtado, PAZ, Nathalia Mansur, VIÇOSO, Tomas Magno, ABRANTES , Wilson Luiz. Síndrome Dolorosa Regional Complexa: atualização. **Rev Med Minas Gerais**, v *19* p. 111-115, 2009

AZAMBUJA MI, TSCHIEDEL PS, Kolinger MD, Oliveira PA, Mendes JM, Bassanesi SL. Síndrome miofascial e síndrome de dor regional complexa em pacientes com LER/DORT atendidos em ambulatório de saúde do trabalhador do SUS - identificação e caracterização clínica dos casos. **Rev Bras Med Trab.** 2004;2(4):176-84.

BALA, Asis; CHETIA, Purbajit; DOLAI, Narayan; KHANDELWAL, Bidita; HALDAR, Pallab Kanti. Cat's whiskers flavonoid attenuated oxidative DNA damage and acute inflammation: its importance in lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 55-61, 15 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10787-013-0193-5.

BANCROFT´S. **Theory and Pratictice of Histological Techniques**. 7th edhition, Churchill Livingstone, 2013.

BALA, Asis; HALDAR, Pallab Kanti; KAR, Biswakanth; NASKAR, Sagar; MAZUMDER, Upal Kanti. Carbon tetrachloride: a hepatotoxin causes oxidative stress in murine peritoneal macrophage and peripheral blood lymphocyte cells. **Immunopharmacology And Immunotoxicology**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 157-162, jul. 2011. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2011.590498.

BALIKI, Marwan N.; APKARIAN, A. Vania. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, [S.L.], v. 87, n. 3, p. 474-491, ago. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, Diana M.; SCHERRER, Grégory; JULIUS, David. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 267-284, out. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028.

BARROS, W. M. Prejuízo cognitivo-emocional de camundongos submetidos ao modelo da síndrome da dor complexa regional tipo I. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

BERRA, Carolina M.; MENCK, Carlos F. M.; MASCIO, Paolo di. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1340-1344, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000600032.

BIRKLEIN, Frank; SCHLERETH, Tanja. Complex regional pain syndrome—significant progress in understanding. **Pain**, [S.L.], v. 156, n. 1, p. 94-103,

abr. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460344.54470.20.

BIRBEN, E, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J 5, 9–19 (2012).

BRIEGER, K., SCHIAVONE, S., MILLER, F.J. Jr & KRAUSE, K.H. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss Med Wkly 142, w13659.

BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 245-313, jan. 2007. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00044.2005.

BELMONTE, Carlos; CERVERO, Fernando. Neurobiology of Nociceptors. **Oxford Scholarship Online**, [S.L.], 1 ago. 1996. Oxford University Press. http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198523345.001.0001.

BONINI, Marcelo G; MALIK, Asrar B. Regulating the regulator of ROS production. **Cell Research**, [S.L.], v. 24, n. 8, p. 908-909, 20 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/cr.2014.66.

BRADY, Killian C.; O'KIELY, Padraig; FORRISTAL, Patrick D.; FULLER, Hubert. Schizophyllum commune on big-bale grass silage in Ireland. **Mycologist**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 30-35, fev. 2005. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1017/s0269915x05001059.

BRATTI, T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
BRADY, Killian C.; O'KIELY, Padraig; FORRISTAL, Patrick D.; FULLER, Hubert. Schizophyllum commune on big-bale grass silage in Ireland. **Mycologist**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 30-35, fev. 2005. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1017/s0269915x05001059.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R.. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 190, n. 3, p. 541-562, 1 jun. 1967. Wiley. http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1967.sp008227.

BULLEN, Michael; LANG, Coran; TRAN, Phong. Incidence of Complex Regional Pain Syndrome I Following Foot and Ankle Fractures Using the Budapest Criteria. Pain Medicine, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 2353-2359, 10 abr. 2016. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/pm/pnw055.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; KOMURA, D.L.; MARCON, R.; FREITAS, C.s.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.R.s.; TORRI, G.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.. Lentinus edodes heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 111, n. 3, p. 531-537, dez. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.015.

CHEN, Jun. History of pain theories. **Neuroscience Bulletin**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 343-350, 29 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12264-011-0139-0.

CODERRE, Terence J.; BENNETT, Gary J.. Objectifying CRPS-I. **Pain**, [S.L.], v. 138, n. 1, p. 3-4, 15 ago. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.006.

CODERRE, Terence J.; XANTHOS, Dimitris N.; FRANCIS, Laura; BENNETT, Gary J.. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type i (crps-i; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 94-105, nov. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2004.08.001.

COLLOCA, L, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers. 2017 Feb 16; 3: 17002.

COHEN, Steven P; VASE, Lene; HOOTEN, William M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **The Lancet**, [S.L.], v. 397, n. 10289, p. 2082-2097, maio 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00393-7.

COSTA, R. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, [S.L.], v. 85, n. 11, p. 1083-1099, nov. 2003. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.017.

CRISSMAN, James W.; GOODMAN, Dawn G.; HILDEBRANDT, Paul K.; MARONPOT, Robert R.; PRATER, Donald A.; RILEY, Julia H.; SEAMAN, William J.; THAKE, Daryl C.. Best Practices Guideline: toxicologic histopathology. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 126-131, jan. 2004. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1080/01926230490268756.

CHAN, Pui-Mun; TAN, Yee-Shin; CHUA, Kek-Heng; SABARATNAM, Vikineswary; KUPPUSAMY, Umah Rani. Attenuation of Inflammatory Mediators (TNF-α and Nitric Oxide) and Up-Regulation of IL-10 by Wild and Domesticated Basidiocarps of Amauroderma rugosum (Blume & T. Nees) Torrend in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 139-154, 1 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139593.

CIUCANU, I., KEREK, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research***,* 131, 2, 209-217.

CHIES, A.B.; CORRÊA, F.M.; DE ANDRADE, C.R.; ROSA-E-SILVA, A.A.; PEREIRA, F.C.; DE OLIVEIRA, A.M. Vascular non-endothelial nitric oxide induced by swimming exercise stress in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30(12):951-7.
COTINGUIBA, G. G, et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2013;15(3):231-7

DALLE-DONNE, Isabella; ROSSI, Ranieri; COLOMBO, Roberto; GIUSTARINI, Daniela; MILZANI, Aldo. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 601-623, 1 abr. 2006. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408.

DESCARTES, Rene. Treatise of Man. New York: Prometheus Books, 2003. 126 p.

DING, Yili; ALKAN, Sefik S.; BASCHANG, Gerhard; DEFAYE, Jacques. Synthesis of the HSA-conjugate of the S-linked thiomimetic of the branched tetrasaccharide repeating unit of the immunostimulant polysaccharide, schizophyllan. Evaluation as potential immunomodulator. **Carbohydrate Research**, [S.L.], v. 328, n. 1, p. 71-76, ago. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6215(00)00082-3.

DUBIN, Adrienne E.; PATAPOUTIAN, Ardem. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 1 nov. 2010. American Society for Clinical Investigation. http://dx.doi.org/10.1172/jci42843.

DRUMMOND, P. D. Sensory disturbances in complex regional pain syndrome: clinical observations, autonomic interactions, and possible mechanisms. Pain Med, 11 (2010), pp. 1257-1266.

DALONSO, Nicole; PETKOWICZ, Carmen L.O.; LUGONES, Luis G.; SILVEIRA, Marcia L.L.; GERN, Regina M.M.. Comparison of cell wall polysaccharides in Schizophyllum commune after changing phenotype by mutation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 93, n. 4, 2021. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120210047.

DRÖGE, Wulf. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 82, n. 1, p. 47-95, 1 jan. 2002. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2001.

EISENBERG, Elon; SHTAHL, Shalom; GELLER, Rimma; REZNICK, Abraham Z.; SHARF, Ordi; RAVBINOVICH, Meirav; ERENREICH, Adam; NAGLER, Rafael M.. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. **Pain**, [S.L.], v. 138, n. 1, p. 226-232, 15 ago. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.019.

ELY, L. S. ENGROFF, P.; GUISELLI, S. R.; CARDOSO, G. C.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A. Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 18, n. 3, p. 475-485, 2015. Disponível em . Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/1809-9823.2015.14141.

ELSHARYDAH, Ahmad; LOO, Nathaniel H.; MINHAJUDDIN, Abu; KANDIL, Enas S.. Complex regional pain syndrome type 1 predictors — Epidemiological perspective from a national database analysis. **Journal Of Clinical Anesthesia**, [S.L.], v. 39, p. 34-37, jun. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinane.2017.03.027.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. Revista Contexto e Saúde, v. 10, n. 20, p. 93–102, 2011.

FRIJHOFF J, P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. Antioxidants & Redox Signaling, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, 2015. Doi: 10.1089/ars.2015.6317.

FELIU, M.H.; EDWARDS, C.L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: History, myth, and evidence. Clin J Pain. v.26: 258–63. 2010.

FONDEVILA, Constantino; BUSUTTIL, Ronald W; KUPIEC-WEGLINSKI, Jerzy W. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. **Experimental And Molecular Pathology**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 86-93, abr. 2003. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4800(03)00008-x.

GARCIA, Beatriz Tavares; VIEIRA, Erica Brandão Mores; GARCIA, João Batista Santos. Relação entre dor crônica e atividade laboral em pacientes portadores de síndromes dolorosas. **Revista Dor**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 204-209, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s1806-00132013000300011.

GOEBEL, Andreas; BIRKLEIN, Frank; BRUNNER, Florian; CLARK, J. David; GIERTHMÜHLEN, Janne; HARDEN, Norman; HUYGEN, Frank; KNUDSEN, Lone; MCCABE, Candy; LEWIS, Jenny. The Valencia consensus-based adaptation of the IASP complex regional pain syndrome diagnostic criteria. **Pain**, [S.L.], v. 162, n. 9, p. 2346-2348, 15 mar. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002245.

GOLDBERG, Daniel s; MCGEE, Summer J. Pain as a global public health priority. **Bmc Public Health**, [S.L.], v. 11, n. 1, 6 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-11-770.

GRYSZCZYńSKA, Bogna; FORMANOWICZ, Dorota; BUDZYń, Magdalena; WANIC-KOSSOWSKA, Maria; PAWLICZAK, Elżbieta; FORMANOWICZ, Piotr; MAJEWSKI, Wacław; STRZYŜEWSKI, Krzysztof Wojciech; KASPRZAK, Magdalena P.; ISKRA, Maria. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2017, p. 1-9, 2017. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2017/4975264.

HAMEDI, Sepideh; SHOJAOSADATI, Seyed Abbas; NAJAFI, Vahid; ALIZADEH, Vahid. A novel double-network antibacterial hydrogel based on aminated bacterial cellulose and schizophyllan. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 229, p. 115383, fev. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115383.

HALLIWELL, Berry; GUTTERIDGE, John M.C.. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. 823 p.

HENTIA, Ciprian; RIZZATO, Alex; CAMPORESI, Enrico; YANG, Zhongjin; MUNTEAN, Danina M.; SăNDESC, Dorel; BOSCO, Gerardo. An overview of

protective strategies against ischemia/reperfusion injury: the role of hyperbaric oxygen preconditioning. **Brain And Behavior**, [S.l], v. 8, n. 5, p. 00959, 30 mar. 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/brb3.959.

IASP. **Therminology**. 2014. Disponível em: https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/. Acesso em: 12 maio 2022.

IASP. **Characterization of chronic pain.** 1994. Disponível em: https://www.iasp-pain.org/publications/free-ebooks/classification-of-chronic-pain-second-edition-revised/. Acesso em: 10 de jun. 2022.

IMTIAJ, Ahmed; JAYASINGHE, Chandana; LEE, Geon-Woo; KIM, Hye-Young; SHIM, Mi-Ja; RHO, Hyun-Su; LEE, Hyun-Sook; HUR, Hyun; LEE, Min-Woong; LEE, U-Youn. Physicochemical Requirement for the Vegetative Growth of Schizophyllum commune Collected from Different Ecological Origins. **Mycobiology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 34-39, 31 mar. 2008. 한국균학회. http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.1.034.

JACOB, K. D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. Mechanisms of ageing and development, 134(3-4), 139–157. https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.02.008

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M.. Medicinal and Therapeutic Value of the Shiitake Mushroom. **Advances In Applied Microbiology**, [S.L.], p. 153-184, 1993. Elsevier. http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70595-1.

KRELING, Maria Clara Giorio Dutra; CRUZ, Diná de Almeira Lopes Monteiro da; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 509-513, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0034-71672006000400007.

KERLIN, Roy; BOLON, Brad; BURKHARDT, John; FRANCKE, Sabine; GREAVES, Peter; MEADOR, Vince; POPP, James. Scientific and Regulatory Policy Committee. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 147-162, 23 dez. 2015. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0192623315623265.

KHOURY, D. El; CUDA, C.; LUHOVYY, B. L.; ANDERSON, G. H.. Beta Glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal Of Nutrition And Metabolism**, [S.L.], v. 2012, p. 1-28, 2012. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2012/851362.

LAU, F.H. & CHUNG, K.C. Silas Weir Mitchell, MD: The physician who discovered causalgia. J Hand Surg. v.29: p.181–187. 2004.

LOESER, John D; MELZACK, Ronald. Pain: an overview. **The Lancet**, [S.L.], v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, maio 1999. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01311-2.

ŁUCZAJ, Wojciech; GęGOTEK, Agnieszka; SKRZYDLEWSKA, Elżbieta. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 111, p. 87-101, out. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033.

MA, Chao; ZHANG, Jun-Ming. **Animal Models of Pain**. New York: Springer, 2011.

MALTA, D. C. Avaliação da função renal na população adulta brasileira, segundo critérios laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, supl. 2, E190010.SUPL.2, 2019. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415790X2019000300407&lng=en&nrm=iso. Acesso em 02 fev. 2022. Doi 10.1590/1980-549720190010.supl.2.

MANTYH, Patrick W.. The neurobiology of skeletal pain. **European Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 508-519, fev. 2014. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12462.

MACHADO, Angelo. **Neuroanatomia Funcional**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2022. 352 p.

MARTIN-SANCHEZ, Diego; RUIZ-ANDRES, Olga; POVEDA, Jonay; CARRASCO, Susana; CANNATA-ORTIZ, Pablo; SANCHEZ-NIÑO, Maria D.; ORTEGA, Marta Ruiz; EGIDO, Jesus; LINKERMANN, Andreas; ORTIZ, Alberto. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid–Induced AKI. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 218-229, 27 jun. 2016. American Society of Nephrology (ASN). http://dx.doi.org/10.1681/asn.2015121376.

MELZACK, Ronald; KENNETH L. Casey. Sensory, motivational, and central control determinants of pain: a new conceptual model. **The skin senses 1** (1968): 423-43.

MENCK, Jeanine Yip; REQUEJO, Susan Mais; KULIG, Kornelia. Thoracic Spine Dysfunction in Upper Extremity Complex Regional Pain Syndrome Type I. **Journal Of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 401-409, jul. 2000. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy (JOSPT). http://dx.doi.org/10.2519/jospt.2000.30.7.401.

MICHEL, Justin; MAUBON, Danièle; VAROQUAUX, Damien Arthur; BOULZE, Carole; NORMAND, Anne Cécile; RIGHINI, Christian Adrien; PIARROUX, Renaud; DESSI, Patrick; RANQUE, Stéphane. Schizophyllum commune: an emergent or misdiagnosed fungal pathogen in rhinology?. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 301-309, 26 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv084

MILLECAMPS, Magali; CODERRE, Terence J.. Rats with chronic post-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome — type I. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 583, n. 1, p. 97-102, mar. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.006.

MIGUEL, M. P; et al. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (caryocar brasiliense).

Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1960, 2012.

MOORE, R. A.; STRAUBE, S.; ALDINGTON, D.. Pain measures and cut-offs - 'no worse than mild pain' as a simple, universal outcome. **Anaesthesia**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 400-412, 24 jan. 2013. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/anae.12148.

MOOKO, Teboho; BALA, Asis; TRIPATHY, Satyajit; KUMAR, Chethan S.; MAHADEVAPPA, Chandrashekara P.; CHAUDHARY, Sushil K.; MATSABISA, Motlalepula G.. Cannabis Sativa L. Flower and Bud Extracts Inhibited In vitro Cholinesterasesand β-Secretase Enzymes Activities: possible mechanisms ofcannabis use in alzheimer disease. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 297-309, mar. 2022. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/1871530321666210222124349.

MOAYEDI, Massieh; DAVIS, Karen D.. Theories of pain: from specificity to gate control. **Journal Of Neurophysiology**, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 5-12, 1 jan. 2013. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/jn.00457.2012.

MOFFAT, R; ERA, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. PAIN. volume 12, issue 1, p12-15, january 01, 2011.

MOS, M. de; HUYGEN, F. J.P.M.; STRICKER, Ch. B.H.; DIELEMAN, J. P.; STURKENBOOM, M. C.J.M.. The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of crps. **Pain**, [S.L.], v. 142, n. 3, p. 218-224, abr. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.032.

MOS, M. de; BRUIJN, A. G.J. de; HUYGEN, F. J.P.M.; DIELEMAN, J. P.; STRICKER, Ch. B.H.; STURKENBOOM, M. C.J.M.. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain**, [S.L.], v. 129, n. 1, p. 12-20, maio 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2006.09.008.

MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: a review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms22073380.

NASTOS, Constantinos; KALIMERIS, Konstantinos; PAPOUTSIDAKIS, Nikolaos; TASOULIS, Marios-Konstantinos; LYKOUDIS, Panagis M.; THEODORAKI, Kassiani; NASTOU, Despoina; SMYRNIOTIS, Vassilios; ARKADOPOULOS, Nikolaos. Global Consequences of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2014, p. 1-13, 2014. Hindawi Limited. http://dx.doi.org/10.1155/2014/906965.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 2022.

NOVAK, M.; VETVICKA, V.. β-Glucans, History, and the Present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal Of Immunotoxicology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 47-57, jan. 2008. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/15476910802019045.

OLIVEIRA, A. J. E, et al. Aspectos clínicos e experimentais da dor em equinos: revisão de literatura. **Science and animal health**. V.4 N.2 MAIO/AGO 2016 P. 131-147

OMERBAŁIć, Damir; SCHUHMACHER, Laura-Nadine; SIERRA, Yinth-Andrea Bernal; SMITH, Ewan St. John; LEWIN, Gary R.. ASICs and mammalian mechanoreceptor function. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 94, p. 80-86, jul. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.007.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free Radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal Of Clinical Biochemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 11-26, 15 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0.

PARK et al. Complex regional pain syndrome type II after cervical transforaminal epidural injection. Medicine (Baltimore). 2018 May; 97(20): e10784.

PANTAZI, Eirini. Role of sirtuins in ischemia-reperfusion injury. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 19, n. 43, p. 7594, 2013. Baishideng Publishing Group Inc.. http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i43.7594.

PALAZZI, Xavier; BURKHARDT, John E.; CAPLAIN, Henri; DELLARCO, Vicki; FANT, Pierluigi; FOSTER, John R.; FRANCKE, Sabine; GERMANN, Paul; GRÖTERS, Sibylle; HARADA, Takanori. Characterizing “Adversity” of Pathology Findings in Nonclinical Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 810-824, 11 jul. 2016. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/0192623316642527.

PATEL, Seema; GOYAL, Arun. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **3 Biotech**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-15, 25 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2.

PERL, Edward R.. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 71-80, jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nrn2042.

PERL, Edward R.; KRUGER, Lawrence. Nociception and Pain. **Pain And Touch**, [S.L.], p. 179-211, 1996. Elsevier. http://dx.doi.org/10.1016/b978-012426910-1/50006-6.

POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J.. Exercise-Induced Oxidative Stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 1243-1276, out. 2008. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00031.2007.

REY, Roselyne. **The History of Pain**. Cambridge: Harvard University Press, 1998.

ROCHA, B. C; et al. Modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal por clampeamento de aorta abdominal em ratos Wistar. Rev. Col. Bras. Cir. 2012; 39(3): 207-210.

ROCHA, Bruno da Costa; MENDES, Rogério Rafael da Silva; LIMA, Gabriel Varjão; ALBUQUERQUE, Gabriel de Souza; ARAðJO, Lucas Lacerda; JESUS, Mateus Neves da Silva de; SANTOS, Washington Luís Conrado dos; CARREIRO, Mário Castro. Modelo experimental de isquemia: reperfusão intestinal por clampeamento de aorta abdominal em ratos wistar. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 207-210, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69912012000300008.

SANTOS Z. A.Envelhecimento: a influência do exercício físico nas alterações moleculares associadas ao stress oxidativo em mulheres.
Vila real, Universidade De Tras-Os-Montes e Alto Douro, 2014

SHARMA B. R. ; Park, C. M.; KIM, H.; KIM, H. J.; RHYU, D.Y. Tinospora cordifolia preserves pancreatic beta cells and enhances glucose uptake in adipocytes to regulate glucose metabolism in diabetic rats. Phytotherapy Research. 33:2765–2774. 2019

SIES, Helmut. Oxidative Stress: concept and some practical aspects. **Antioxidants**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 852, 10 set. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/antiox9090852.

SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do précondicionamento isquêmico. Acta Cirurgica Brasileira, São Paulo, v. 17, suppl. c3, p.96-100, 2002.

SIQUEIRA, Vitória de Barros; LUNA, Aislany Warlla Nunes; MELO, Danielly Coelho de; SILVA, Lana Quele Pereira da; GAMA, Mariana Pereira; OLIVEIRA, Monica Larissa do Nascimento Paes. Dor e adoecimento entre a equipe de enfermagem. **Revista de Enfermagem Ufpe On Line**, [S.L.], v. 14, p. 231-242, 2 jul. 2020. Revista de Enfermagem, UFPE Online. http://dx.doi.org/10.5205/1981-8963.2020.244210.

SIEMS, Werner G.; GRUNE, Tilman; ESTERBAUER, H.. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. **Life Sciences**, [S.L.], v. 57, n. 8, p. 785-789, jul. 1995. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(95)02006-5.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 14, n. 3, p. 441–451, 2011.

SILVA, M. A.; FIGUEIRA, P. J.; SILVA, V. B.; BOAVENTURA, S. B.; MARQUES, E.; BRANCO, P. S. Síndrome dolorosa regional complexa do tipo I: da prevenção ao

tratamento. Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia, v. 26, n. 1, p. 30-42, 2018. Disponível em . Acesso em 24 set. 2020.

SIGLER, Lynne. **Miscellaneous opportunistic fungi: Microascaceae and other Ascomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes, and Basidiomycetes.** 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. 676 p.

SHOAIB, Mohammad; QUADRI, Syed Mohamid Raza; WANI, Omar Bashir; BOBICKI, Erin; GARRIDO, Gerardo Incera; ELKAMEL, Ali; ABDALA, Ahmed. Adsorption of enhanced oil recovery polymer, schizophyllan, over carbonate minerals. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 240, p. 116263, jul. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116263.

SUCIU, A. et al. Transminases: oldies but goldies. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**, v. 66, n. 3, p. 246-251, 2020. Disponível em https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31994373/. Acesso em: 20 nov. 2020. Doi 10.1590/S0102-865020150040000007.

STANTON-HICKS M, Jänig W, Hassenbusch S,et al.:Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy.**Pain** 1995,63:127–133.

SNEDDON, Lynne U.. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 63-73, 1 jan. 2018. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00022.2017.

SODRE, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442007000500005&lng=en&nrm=iso. Acesso em 02 fev. 2022. Doi 10.1590/S1676-24442007000500005.

TANG, C. et al. Sex differences in complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) in mice. **Journal of pain research**, v. 10, p. 1811-1819, 2017.

TAHA, Rame; BLAISE, Gilbert A.. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: role of oxidative stress. **Canadian Journal Of Anesthesia/Journal Canadien D'Anesthésie**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 875-881, 14 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12630-012-9748-y.

TELLI, E. M. R. P.; FRIGERI, M.; MELLO, S. R. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 2, p. 15-22, 2016. Disponível em http://www.rbac.org.br/artigos/avaliacao-da-atividade-de-enzimas-hepaticas-emdependentes-ex-dependentes-e-nao-usuarios-do-etanol-48n-3/. Acesso em 20 jan. 2022.

TSCHOPP, Jürg. Mitochondria: sovereign of inflammation?. **European Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 1196-1202, 26 abr. 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141436.

TREEDE, Rolf-Detlef; RIEF, Winfried; BARKE, Antonia; AZIZ, Qasim; BENNETT, Michael I.; BENOLIEL, Rafael; COHEN, Milton; EVERS, Stefan; FINNERUP, Nanna B.; FIRST, Michael B.. A classification of chronic pain for ICD-11. Pain, [S.L.], v. 156, n. 6, p. 1003-1007, jun. 2015. **Ovid Technologies** (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000160.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 14ª ed. Rio
de Janeiro, Guanabara Koogan, 2016

VELAYUDHAN, Akilan; BELLINGHAM, Geoff; MORLEY-FORSTER, Patricia. Opioid-induced hyperalgesia. **Continuing Education In Anaesthesia Critical Care & Pain**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 125-129, jun. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkt045.

VERBON, Eline Hendrike; POST, Jan Andries; BOONSTRA, Johannes. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, [S.L.], v. 511, n. 1, p. 1-6, dez. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.038.

VITOR, A. O, et al. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. RECIIS – R. Eletr. de Com. Inf. Inov. **Saúde**. Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.87-96, jan.-jun., 2008.Volume 204, Issue 7, 25 July 2008

WEBER, Daniela; DAVIES, Michael J.; GRUNE, Tilman. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions. **Redox Biology**, [S.L.], v. 5, p. 367-380, ago. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005.

WILLIS, William D.; COGGESHALL, Richard E.. Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. **Sensory Mechanisms Of The Spinal Cord**, [S.L.], out. 2004. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-0037-7.

WILLIAMSON, Kimberley J.; STRAM, Mark L.. The Epidemiology of Inadequate Control of Acute Pain. **Pain**, [S.L.], p. 1005-1007, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-99124-5_214.

WOLFF J - Ueber einen Fall von Ellenbogensgelenks-Reaktion. Arch Chir, 1877;20:771

WU, Meng-Yu; YIANG, Giou-Teng; LIAO, Wan-Ting; TSAI, Andy Po-Yi; CHENG, Yeung-Leung; CHENG, Pei-Wen; LI, Chia-Ying; LI, Chia-Jung. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 1650-1667, 2018. S. Karger AG. http://dx.doi.org/10.1159/000489241.

WU, Danhong; LU, Wenmei; WEI, Zhenyu; XU, Ming; LIU, Xueyuan. Neuroprotective Effect of Sirt2-specific Inhibitor AK-7 Against Acute Cerebral Ischemia is P38 Activation-dependent in Mice. **Neuroscience**, [S.L.], v. 374, p. 61-69, mar. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.040.

YAM, Mun; LOH, Yean; TAN, Chu; ADAM, Siti Khadijah; MANAN, Nizar Abdul; BASIR, Rusliza. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2164, 24 jul. 2018. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082164.

YAM, Mun; LOH, Yean; TAN, Chu; ADAM, Siti Khadijah; MANAN, Nizar Abdul; BASIR, Rusliza. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2164, 24 jul. 2018. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082164.

YAMAKI, Vitor Nagai; GONÇALVES, Thiago Barbosa; COELHO, João Vitor Baia; PONTES, Ruy Victor Simões; COSTA, Felipe Lobato da Silva; BRITO, Marcus Vinicius Henriques. Efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S.L.], v. 39, n. 6, p. 529-533, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69912012000600014.

YAO, Hui-Min; WANG, Gan; LIU, Ya-Ping; RONG, Ming-Qiang; SHEN, Chuan-Bin; YAN, Xiu-Wen; LUO, Xiao-Dong; LAI, Ren. Phenolic acids isolated from the fungus Schizophyllum commune exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. **Chinese Journal Of Natural Medicines**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 661-670, set. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1875-5364(16)30078-4.

ZANG, Xinlong; ZHOU, Jingyi; ZHANG, Xiaoxu; HAN, Yantao; CHEN, Xuehong. Ischemia Reperfusion Injury: opportunities for nanoparticles. **Acs Biomaterials Science & Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 6528-6539, 24 nov. 2020. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01197.

ZHANG, Lixiao; WANG, Xianwei; CUETO, Ramón; EFFI, Comfort; ZHANG, Yuling; TAN, Hongmei; QIN, Xuebin; JI, Yong; YANG, Xiaofeng; WANG, Hong. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. Redox Biology, [S.L.], v. 26, p. 101284, set. 2019. **Elsevier BV**. http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284.

ZARKOVIC, Kamelija; JAKOVCEVIC, Antonia; ZARKOVIC, Neven. Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 111, p. 110-126, out. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.00

ANEXO 1

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE

univille

Joinville, 01 de junho de 2021

OFÍCIO N.º 003/2021 – PRPPG/CEP/CEUA

Para pesquisadora Katherine Plautz
Projeto de pesquisa vinculado ao Mestrado em Saúde e Meio Ambiente
Assunto: Parecer Processo n° 01/2021

O projeto de pesquisa intitulado **"EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS DE *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOR AGUDA"**, de sua responsabilidade, foi considerado **APROVADO** de acordo com o Parecer Consubstanciado, de 01/06/2021 em anexo e emitido na mesma data.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA/UNIVILLE, de acordo com as atribuições definidas na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, Resolução 19/07 CEP/UNIVILLE e demais normas, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa CEUA nº 01/2021, protocolado em 22/04/2021.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Marcia Luciane Lange Silveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Univille

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 30/01/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: ( ) Tese (x) Dissertação ( ) Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:
Autor: Katherine Plautz
Orientador: Daniela Delwing de Lima Coorientador: Samira Dal-Toé De Prá
Data de Defesa: 16/12/2022
Título:Efeito dos polissacarídeos de *Schizophyllum commune* em modelos pré-clínicos de dor crônica e aguda.
Instituição de Defesa: UNIVILLE

3.Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim ( ) Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.

Katherine Plautz
Assinatura do autor

Joinville 30/01/2023
Local/Data