



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**



CLARISSA MARIA DIAS MOTA

**Atividade da proteína quinase dependente de RNA (PKR)
no sistema nociceptivo em um modelo experimental de
neuropatia periférica de origem viral**

Ribeirão Preto

2016

CLARISSA MARIA DIAS MOTA

**Atividade da proteína quinase dependente de RNA (PKR)
no sistema nociceptivo em um modelo experimental de
neuropatia periférica de origem viral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mota, Clarissa Maria Dias

Atividade da proteína quinase dependente de RNA (PKR) no sistema nociceptivo em um modelo experimental de neuropatia periférica de origem viral / Clarissa Maria Dias Mota; orientador Guilherme de Araújo Lucas – Ribeirão Preto, 2016.

93 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia.

1. PKR. 2. Neuropatia periférica. 3. Vírus herpes simplex tipo 1. 4. Neuralgia herpética. 5. Neuralgia pós-herpética. 6. Dor crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Clarissa Maria Dias Mota

Atividade da proteína quinase dependente de RNA (PKR) no sistema nociceptivo em um modelo experimental de neuropatia periférica de origem viral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovada em: ____/____/2016

Banca Examinadora

Professor Doutor Guilherme de Araújo Lucas (orientador)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo

Assinatura:_____

Professor Doutor Rafael Simone Saia

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo

Assinatura:_____

Professora Doutora Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo

Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico todas as minhas vitórias a Deus e a meus amados pais: minha mãe Ilza e meu pai Cleber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e por me sustentar nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha família. Minha mãe, Ilza Maria Dias Mota, e meu pai, José Cleber Nunes Mota. Obrigada pelo seu amor incondicional. Obrigada por acreditarem no meu potencial e pelo suporte emocional, financeiro, psicológico. Obrigada por todo o apoio que tornou possível a realização de um sonho, um projeto de vida, uma nova etapa na minha vida profissional. Agradeço ao apoio das minhas avós, vó Arlete e vó Maria José. Agradeço ao apoio dos meus tios, em especial à tia Matilde.

Agradeço ao professor doutor Guilherme Lucas, por ter sido meu orientador durante o mestrado, por contribuir para meu crescimento intelectual, pela parceria científica, pelos conselhos e pela imensa contribuição à minha formação em pesquisa.

Agradeço à técnica de laboratório Sônia Zanon pela sua ajuda de extrema importância na realização dos experimentos e no cuidado com os animais. Obrigada pela amizade, pela convivência e pela boa logística de funcionamento do laboratório.

Agradeço à MSc. Flávia Turcato, obrigada pela sua amizade, apoio, companheirismo, paciência para ensinar e pela ajuda nos experimentos. Você foi essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos e colegas de pós-graduação por tornar os meus dias e horários de almoço mais alegres e por contribuir para o meu crescimento intelectual e pessoal. Agradeço ao MSc. Cayo Almeida por me ajudar desde antes da seleção de mestrado, sou grata pela paciência, pela amizade e todo apoio até hoje.

Agradeço às minhas companheiras de apartamento, Glauce Crivelaro e Angélica Duarte, que fizeram meus dias mais felizes e mais preenchidos. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por ser minha família ribeirão pretana.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação, em especial ao prof. Dr. Ricardo Leão, pelo auxílio durante a preparação para a qualificação e por me permitir aprender mais sobre transmissão sináptica no seu laboratório.

Agradeço ao prof. Dr. José Antunes Rodrigues por ceder uma alíquota de anticorpo secundário para uma parte do western blotting.

Agradeço ao prof. Dr. Eurico Arruda, por ceder material viral utilizado neste trabalho.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio da bolsa desde o início do mestrado.

Agradeço ao bioterista Leonardo pelo auxílio na manutenção do biotério.

Agradeço aos animais. Que suas vidas sejam justificadas pelos frutos deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. Introdução	10
1.1. Conceitos em dor	11
1.2. Dor inflamatória	13
1.3. Dor neuropática	16
1.4. Neuralgias herpética e pós-herpética.....	17
1.5. Vias de sinalização relacionadas à proteína quinase dependente de RNA	20
1.6. PKR e a hiperalgesia térmica	26
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Material e métodos	28
3.1. Animais e aspectos éticos	29
3.2. Propagação dos estoques virais	29
3.3. Modelo experimental de neuropatia de origem viral	30
3.4. Testes comportamentais	30
3.4.1. Teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia mecânica .	30
3.4.2. Teste de sensibilidade térmica para monitoramento de hiperalgesia térmica .	31
3.4.3. Injeção intraperitoneal do PKRi e teste de sensibilidade térmica	32
3.4.4. Teste de desempenho motor.....	33
3.4.5. Teste de resposta nocifensiva à capsaicina	34
3.5. Imunodeteção de proteínas e de seus resíduos fosforilados.....	35
3.6. Análise estatística	36
4. Resultados	37

4.1. HSV1 provoca alodínia mecânica em animais C57bl/6, PKR ^{+/+} e PKR ^{-/-} e hiperalgesia térmica em animais C57bl/6 e PKR ^{+/+} , mas não em animais PKR ^{-/-}	38
4.2. HSV1 promove aumento da expressão de PKR, fosfo-PKR, fosfo-eIF2 α , PACT, IKK β , fosfo-IKK α/β e PP2A α em GRD nas fases herpética e pós-herpética e aumento da expressão de fosfo-PACT em GRD na fase herpética	40
4.3. A inibição farmacológica sistêmica de PKR apresenta efeito analgésico dependente da dose e do tempo nos períodos herpético e pós-herpético, não modifica o desempenho motor e inibe a fosforilação de PKR no GRD de animais inoculados com HSV1	42
4.4. A inibição farmacológica sistêmica de PKR intensifica a redução fosforilação de P38 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético e inibe o aumento da fosforilação de JNK e ERK1,2 no período pós-herpético em animais inoculados com HSV1	45
4.5. A inibição farmacológica sistêmica de PKR inibe o aumento da fosforilação de PLC γ 1 e Akt induzida por infecção pelo HSV1 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético.....	47
4.6. A inibição farmacológica sistêmica de PKR inibe o aumento da fosforilação de IKK α/β e de STAT3 induzido por infecção pelo HSV1 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético	49
4.7. A inibição farmacológica e a deleção genética de PKR previnem a hiperalgesia térmica induzida por infecção pelo HSV1 frente à ativação de receptores TRPV1 ...	51
4.8. A inibição farmacológica reduz e a deleção genética de PKR inibe a resposta nocifensiva à ativação de receptores TRPV1 em animais inoculados com HSV1	53
4.9. A inibição farmacológica sistêmica de PKR provoca o aumento da expressão de Ca-MKII α em GRD no período herpético, redução de Ca-MKII α E aumento de TRPV1 em GRD no período pós-herpético	55
5. Discussão	57
6. Conclusões	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A	90
ANEXO A	91

RESUMO

MOTA, C. M. D. **Atividade da proteína quinase dependente de RNA (PKR) no sistema nociceptivo em um modelo experimental de neuropatia periférica de origem viral.** 2016. 93 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A proteína quinase dependente de RNA (PKR) é uma molécula sentinela ativada em situações de estresse celular, incluindo infecções virais. A ativação de PKR por meio de sua fosforilação aciona cascatas de sinalização intracelular envolvidas em respostas inflamatórias e inibição da síntese proteica. Dados prévios do nosso laboratório sugerem que PKR está envolvida na hiperalgesia térmica de origem inflamatória. No presente estudo, foi investigado o papel da PKR na hiperalgesia térmica induzida pelo vírus da herpes simples tipo 1 (HSV1), durante as fases herpética e pós-herpética, combinando métodos comportamentais, genéticos, farmacológicos e moleculares. Camundongos C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} machos foram inoculados com HSV1. Os grupos controle foram inoculados com HSV1 inativo. Alodínia mecânica e hiperalgesia térmica foram monitoradas antes da inoculação do vírus e 8, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. A curva dose e tempo-resposta e o teste da capsaicina foram realizados no 8^o e 21^o dias após a inoculação do vírus. Também nos períodos herpético e pós-herpético, foi investigado o perfil de expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização de PKR (PKR, eIF2 α , PACT, IKK e PP2A α), assim como o efeito da inibição de PKR pelo monitoramento da fosforilação de PKR, IKK α/β , P38, JNK, ERK1,2 e STAT3, e expressão de Ca-MKII α e TRPV1 nos GRD (L3-L6) ipsilateralmente à pata inoculada. Alodínia mecânica e hiperalgesia térmica ficaram evidentes até 28 dias após a inoculação. Camundongos PKR^{-/-} desenvolveram alodínia mecânica, mas não hiperalgesia térmica, quando comparados com animais PKR^{+/+}. A inibição sistêmica de PKR reverteu a hiperalgesia térmica de modo tempo- e dose-dependente e preveniu o comportamento nocifensivo induzido por capsaicina, enquanto PKR^{-/-} apresentaram resposta nocifensiva praticamente ausente em ambas as fases herpética e pós-herpética. Houve aumento da expressão de PP2A α e da fosforilação de PKR, IKK α/β e eIF2 α , durante os períodos herpético e pós-herpético, e de PACT na fase pós-herpética. A inibição de PKR promoveu o aumento da fosforilação de P38 em ambas as fases, e redução da fosforilação de PLC γ 1 acompanhada do retorno da fosforilação de Akt e STAT3 ao nível do grupo controle e o aumento da expressão de Ca-MKII α na fase herpética. Já na fase pós-herpética, reduziu a fosforilação de JNK e Akt e a expressão de Ca-MKII α , retornou a fosforilação de ERK1,2, PLC γ 1 e STAT3 ao nível do grupo controle e aumentou a expressão de TRPV1. Nossos resultados indicam que a atividade de PKR desempenha papel essencial na hiperalgesia térmica induzida por infecção pelo HSV1.

Palavras-chave: PKR, Neuropatia periférica, Vírus herpes simples tipo 1, Neuralgia herpética, Neuralgia pós-herpética, Dor crônica.

ABSTRACT

MOTA, C. M. D. **Double stranded RNA-activated protein kinase (PKR) activity in the nociceptive system in an experimental model of peripheral neuropathy of viral origin.** 2016. 93 p. Dissertation (Master degree) School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Double stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a sentinel molecule activated by cellular stress conditions, including viral infections. PKR activation by phosphorylation triggers cascades involved in inflammatory response and protein synthesis suppression. Our previous data suggest that PKR is involved in the inflammatory thermal hyperalgesia. Here we investigated the role played by PKR on thermal hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 (HSV-1), during herpetic and post-herpetic phases, by combining behavioral, genetic, pharmacological, and molecular methods. Adult male C57bl/6, PKR^{+/+} and PKR^{-/-} mice were inoculated with HSV-1. Control groups were inoculated with inactive (mock) HSV1. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were monitored before virus inoculation and 8, 14, 21, and 28 days post-inoculation. The dose- and time-response curve and the capsaicin test were performed at 8th and 21st days post virus inoculation. Also in the herpetic and post-herpetic periods, was investigated the expression profile of proteins involved in the PKR signaling pathways (PKR, eIF2 α , PACT, IKK and PP2A α), and the effect of PKR inhibition by monitoring PKR, IKK α/β , P38, JNK, ERK1,2, and STAT3 phosphorylation, and Ca-MKII α and TRPV1 expression in the dorsal root ganglia (L3-L6) ipsilaterally to the inoculated paw. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia became evident until 28 days post-inoculation. PKR^{-/-} mice developed mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia, when compared with PKR^{+/+} mice. Systemic PKR inhibition reversed thermal hyperalgesia in a dose and time-dependent manner, and prevented the capsaicin-induced nocifensive behavior, whereas PKR^{-/-} showed no nocifensive behavior almost absent in both herpetic and post-herpetic phases. There was increased expression of PP2A α and the phosphorylation of PKR, IKK α/β , and eIF2 α , during herpetic and post-herpetic periods, and PACT in the post-herpetic phase. PKR inhibition increased P38 phosphorylation in both phases, and reduction of PLC γ 1 phosphorylation together with the return of the Akt and STAT3 phosphorylation to the control group level, and enhanced Ca-MKII α expression in the herpetic phase. At the post-herpetic phase, suppressed JNK and Akt, and Ca-MKII α expression returned ERK1,2, PLC γ 1 and STAT3 phosphorylation to control group level and increased TRPV1 expression. The data indicate that PKR activity plays an essential role in the HSV-1 infection-induced thermal hyperalgesia.

Keywords: PKR, Peripheral neuropathy, Herpes simplex virus type-1, Herpetic neuralgia, Post-herpetic neuralgia, Chronic pain.

Introdução

1. Introdução

1.1. Conceitos em dor

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano, e de caráter subjetivo, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (MERSKEY et al., 1979). A dor apresenta dois componentes principais, o sensorial-discriminativo, que se refere às propriedades mecânicas, térmicas e espaciais, e o afetivo-motivacional, relacionado às qualidades sensoriais e emocionais, sendo que estados de dor crônica podem levar a efeitos secundários, como ansiedade e depressão (PRICE, 2000).

O componente sensorial-discriminativo identifica e codifica o estímulo nocivo por meio dos terminais nervosos sensoriais aferentes, formados por fibras tipo A α e C, cujos corpos neuronais estão localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRD) (HUNT, MANTYH, 2001). O processo neural de codificação do estímulo nocivo é denominado nocicepção, produzindo a transdução e transmissão do sinal nociceptivo por neurônios centrais ou periféricos do sistema nervoso somatossensorial (MERSKEY et al., 1979).

Os neurônios de primeira ordem são pseudounipolares, apresentando uma projeção periférica, para a pele ou para um órgão, e uma projeção central, que se projeta para o corno dorsal da medula espinal (CDME), onde se comunica sinapticamente com neurônios de segunda ordem. Estes cruzam para o lado contralateral e projetam suas fibras para estruturas supraespinais, emitindo ramos colaterais para núcleos relés no tronco encefálico, e terminam no tálamo, onde se comunicam com neurônios de terceira ordem que se projetam para córtex cerebral.

No córtex cerebral, a informação torna-se consciente e é interpretada como dor (FISCHER, WAXMAN, 2010; HUNT, MANTYH, 2001; WOOLF, 2004).

Em situações fisiológicas, nociceptores de alto limiar de despolarização são ativados somente sob estímulos nocivos (MARCHAND, PERRETTI, McMAHON, 2005). Esse tipo de dor é denominada nociceptiva e é restrita ao local lesionado e é abolido após a cura da lesão.

A dor nociceptiva é necessária para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo (HUNT, MANTYH, 2001). Em situações fisiológicas, nociceptores de alto limiar de despolarização são ativados somente sob estímulos nocivos (MARCHAND, PERRETTI, MCMANON, 2005). Este tipo de dor é restrito ao local lesionado e é abolido após a cura da lesão. Situações que provocam a estimulação persistente do sistema nociceptivo, quer por um processo patológico em desenvolvimento, quer por lesão dos circuitos neurais associados à transmissão da informação dolorosa, resultarão em modificações morfofuncionais do sistema nociceptivo, responsáveis pela cronificação da dor (MARCHAND, PERRETTI, MCMANON, 2005).

Os substratos neurais que mantêm a dor crônica envolvem diferentes formas e níveis de plasticidade neural. A conversão de dor aguda em dor crônica ocorre ao longo do tempo devido a mudanças dinâmicas na modulação neural da dor em níveis molecular, sináptico e celular. O perfil fenotípico molecular dos neurônios modifica-se de uma forma dependente da atividade e altera o seu funcionamento. O resultado dessas alterações envolve o aumento da magnitude e da frequência de respostas a um estímulo sensorial ou à atividade espontânea (MARCHAND, PERRETTI, McMAHON, 2005; KUNER, 2010; WOOLF, SALTER, 2000).

Anormalidades do sistema nociceptivo conduzem à hipersensibilidade sensorial e provoca os fenômenos de alodínia e hiperalgesia. A alodínia ocorre quando estímulos inócuos levam a uma resposta dolorosa. Já a hiperalgesia ou hipernocicepção ocorre quando um estímulo normalmente doloroso resulta em uma percepção dolorosa exacerbada (MERSKEY et al., 1979).

1.2. Dor inflamatória

A dor crônica pode ser de diferentes origens, como a dor oncológica, a dor neuropática e a dor inflamatória (JI, XU, GAO, 2014; REICHLING, LEVINE, 2009). Os principais estímulos que desencadeiam a dor inflamatória são dano tecidual, exposição bacteriana ou viral, substâncias químicas e reações autoimunes que provocam indução da resposta inflamatória por ativação de células do sistema imune. Os sinais e sintomas da inflamação incluem edema, febre, eritema, hiperalgesia, dor e ativação de células da imunidade inata (MARCHAND, PERRETTI, McMAHON, 2005).

Células, como macrófagos e neutrófilos, produzem e secretam mediadores inflamatórios denominados citocinas. Entre as principais citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) podem ser destacados. Tais mediadores podem agir diretamente sobre os nociceptores, ativando os terminais nervosos e cascatas intracelulares, ou indiretamente, através da potencialização da resposta inflamatória e aumento da produção de mediadores pró-nociceptivos (BASBAUM et al., 2009).

Uma das maneiras que as células utilizam para responder a estímulos externos é por meio da atividade de cascatas de sinalização intracelular que levam à modulação da atividade de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK).

Essas proteínas participam de diversos mecanismos nas células, como inflamação, oncogênese, apoptose, autofagia e regulação do ciclo celular. As MAPK mais estudadas são as proteínas quinases regulada por sinal extracelular (ERK 1 e 2 - ERK1,2), a proteína quinase NH2-terminal c-Jun (JNK) e a proteína quinase ativada por mitógeno P38 (P38). As MAPK são proteínas com atividade modulada também por proteínas quinase quinase ativadas por mitógeno (MKK e MEK) (ROUX; BLENIS, 2004).

A inflamação periférica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) ou por carragenina promove a ativação persistente de P38 em neurônios nociceptivos do GRD, a qual regula o aumento persistente da expressão de receptores de potencial transiente vanilóide tipo 1 (TRPV1) nesses GRD, mantendo o comportamento de hiperalgisia térmica (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). O fenômeno de hiperalgisia térmica em condições inflamatórias é classicamente mediado por receptores TRPV1 (CATERINA et al., 2000).

Além disso, a inibição intratecal de P38 atenua a hiperalgisia térmica, mas não a alodínia mecânica. Nesses estudos não houve aumento da atividade de P38 no CDME (KWON et al., 2014; JI et al., 2002a). A inibição intratecal de P38 também previne a resposta nociceptiva induzida pela inflamação por formalina (TAVES et al., 2015). Além disso, demonstrou-se que a inflamação induzida por zymosan promove o aumento da atividade de P38 no CDME, cuja inibição intratecal atenuou tanto a hiperalgisia térmica como a alodínia mecânica (JEONG, SON, KWON, 2015).

De modo semelhante ao que ocorre com P38 no modelo de inflamação por CFA, outros estudos indicam a ativação persistente de ERK1,2 no CDME, cuja inibição intratecal é capaz de reverter a hiperalgisia térmica e a alodínia mecânica

(JI et al., 2002b). Periféricamente, a inibição de ERK1,2 também atenua a hiperalgesia térmica induzida por capsaicina de maneira dose-dependente, ou pelo fator de crescimento do nervo (NGF), sugerindo que vias envolvendo a ativação de ERK1,2 estão envolvidas na sensibilização de neurônios aferentes primários (DAI et al., 2002; ZHUANG et al., 2004).

Kwon e colaboradores (2014) demonstraram que também há aumento da fosforilação de ERK1,2 no GRD de animais com inflamação por carragenina na pata. Entretanto, esse perfil não foi observado quanto a JNK (KWON et al., 2014). Já na inflamação aguda induzida por CFA, ocorre aumento da ativação de JNK no GRD, cuja inibição intratecal reverte a hiperalgesia térmica (DOYA et al., 2005). Em suma, entende-se que as MAPK são proteínas pró-nociceptivas, pois sua inibição no sistema nervoso central promove efeito antinociceptivo em diferentes modelos experimentais de dor.

No sistema nervoso, identificou-se que a ativação de outra proteína de sinalização, Akt ou proteína quinase B, é importante para a plasticidade neuronal cerebral e para o crescimento axonal de neurônios sensoriais (KARPOVA, SANNA, BEHNISCH, 2006; MARKUS, ZHONG, SNIDER, 2002; SANNA et al., 2002). O aumento da fosforilação de Akt também acontece em GRD após a injeção intradérmica de capsaicina *in vivo* (SUN et al., 2006) e quando a capsaicina também é aplicada *in vitro* em GRD (ZHUANG et al., 2004), como também há aumento da fosforilação de Akt em GRD de animais após a injeção intraplantar de carragenina (SHI et al., 2009).

Além destes estudos, outros identificaram o aumento da fosforilação de Akt no GRD em um modelo de dor inflamatória induzida por CFA (LIANG et al., 2013).

Quando Akt foi inibido intratecalmente, houve inibição da hiperalgisia térmica (LIANG et al., 2013). Cascatas de sinalização de Akt medeiam a hipersensibilidade mecânica induzida pela capsaicina (SUN et al., 2006) e a hiperalgisia térmica induzida por capsaicina ou pelo NGF (ZHUANG et al., 2004).

As respostas inflamatórias aguda e crônica também são mediadas por mecanismos dependentes de fosfolipases C (PLC). O tratamento sistêmico com um inibidor não seletivo de PLC reduz a hiperalgisia mecânica induzida por carragenina (JOSEPH et al., 2007). Ademais, a inibição sistêmica de PLC previne o edema de pata induzido por carragenina e o infiltrado de células do sistema imune em um modelo murino de peritonite (HOU et al., 2004).

Com a instalação da inflamação, ocorre dor espontânea e hiperalgisia no tecido inflamado. Normalmente, a dor inflamatória é solucionada ao se abolir os estímulos que afetam o tecido ou quando o processo doloroso é controlado, diferentemente da dor neuropática (MARCHAND, PERRETTI, McMAHON, 2005).

1.3. Dor neuropática

A dor neuropática é de difícil tratamento devido os mecanismos subjacentes à dor persistente serem de difícil identificação. Essa condição dolorosa é causada por lesão, anormalidade ou doença no sistema nervoso somatossensorial periférico ou central, causando dor persistente (MERSKEY et al., 1979). A dor neuropática é causada por diversos mecanismos que aumentam a excitabilidade neuronal, provocam lesões nervosas e modificam fenotipicamente as fibras nociceptivas aferentes ao longo do tempo, causando modificações neuroquímicas nos GRD, na medula espinal e em estruturas supraespinais (GOLD, GEBHART, 2010; HUNT, MANTYH, 2001).

Diversos estudos em condições dolorosas neuropáticas demonstraram que há participação de MAPK no processo patológico. Em animais com lesão de nervo isquiático, ocorre aumento da fosforilação de P38 no GRD e alodínia mecânica, a qual é revertida momentaneamente pela administração intratecal de um inibidor de P38 (JIN et al., 2003). A inibição intratecal de P38 também atenua a alodínia mecânica em período recente da neuropatia induzida por constrição crônica de nervo (TAVES et al., 2015). Em suma, a literatura demonstra a ativação tanto de P38 quanto de Akt no GRD e no CDME são necessárias para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (HAO et al., 2006; JI et al., 2002; JIN et al., 2003; MIZUKOSHI et al., 2013; ORTMANN, CHATTOPADHYAY, 2014; WILKERSON et al., 2012; XU et al., 2007). Similarmente, foi demonstrado que a ativação de ERK1,2 no CDME é necessária para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (HAO et al., 2006).

A alodínia mecânica em um modelo de dor neuropática induzida por lesão de nervo periférico também pode ser atenuada pelo tratamento sistêmico com um inibidor não seletivo de PLC (SHI et al., 2008). Dados anteriores do nosso laboratório identificaram o aumento persistente da fosforilação de PLC γ 1 no CDME ipsilateral, em um modelo de dor neuropática induzido por lesão parcial de nervo isquiático (ALMEIDA et al., 2015; KUSUDA et al., 2013), mas não houve diferenças na fosforilação de P38, ERK1,2 e JNK no CDME (KUSUDA et al., 2013).

1.4. Neuralgias herpética e pós-herpética

A sensibilização do sistema nociceptivo é o fator de desenvolvimento e manutenção das neuralgias herpética e pós-herpética. A infecção primária pelo vírus da varicela zoster (VVZ) provoca manifestações debilitantes como erupções

vesiculares cutâneas difusas e dor (DWORKIN et al., 2007; KATZ et al., 2004). As repercussões clínicas dessa infecção viral são lesões cutâneas, como vesículas e erupções dolorosas com distribuição no dermatomo inervado pelo nervo sensibilizado (BREUER; WHITLEY, 2007), alodínia e hiperalgesia (KINCHINGTON, GOINS, 2011).

Em humanos, o VVZ se estabelece em latência em GRD ou em gânglio de nervo craniano por meses ou anos após a infecção aguda (DWORKIN et al., 2007; KATZ et al., 2004). A reativação do VVZ no GRD provoca o herpes zoster, atingindo o nervo correspondente ao gânglio infectado (BREUER; WHITLEY, 2007; WEITZMAN et al., 2013). A principal consequência clínica do herpes zoster é a neuralgia pós-herpética, que pode permanecer por meses ou anos (RYAN-CEBULA; GRONINGER, 2013; DWORKIN; PORTENOY, 1996; KOST; STRAUS, 1996).

A neuralgia pós-herpética (NPH) é uma condição dolorosa que persiste por mais de três meses, caracterizando-se por dor crônica (BASBAUM et al., 2009; YAWN; GILDEN, 2013; MERSKEY; BOGDUK, 1994). A NPH compromete negativamente a qualidade de vida (OSTER et al, 2005), é incapacitante e gera alto custo econômico devido aos tratamentos (DAVIES et al., 1994).

Apesar de haver alternativas para o tratamento da dor devido a NPH, ela geralmente é de difícil resolução e tratamento (DWORKIN; PORTENOY, 1996; JOHNSON; MCELHANEY, 2009; ARGOFF; KATZ; BACKONJA, 2004). Dessa maneira, é necessário um tratamento multifarmacológico (CAPPUZZO, 2009; DUBINSKY, 2004; ATTAL et al., 2010; DWORKIN et al., 2010; AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY, 2012; HEMPENSTALL et al., 2005) que acarreta em efeitos adversos dos medicamentos utilizados (OSTER et al., 2005; JOHNSON et

al., 2010). Ademais, em torno de 40%-50% dos indivíduos são refratários a qualquer tratamento farmacológico ou apresentam melhora discreta (ROWBOTHAM; PETERSEN, 2001).

Um dos modelos experimentais de herpes zoster utiliza o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1), o qual é capaz de reproduzir as características clínicas da ação do VVZ (TAKASAKI et al., 2000). Neste modelo, a partir do 2º dia de inoculação do vírus na pele escarificada, o DNA viral é detectado no GRD do dermatômo correspondente. Ao 5º dia, surgem alodínia, hiperalgesia, lesões zosteriformes, vesículas e erupções na pele que persistem até o 8º dia. Esse quadro mimetiza a infecção primária pelo VVZ. O quadro doloroso durante o período que compreende as manifestações cutâneas durante essa infecção aguda é denominado neuralgia herpética.

Após a cura das lesões, os animais permanecem com quadro de hiperalgesia térmica e alodínia mecânica pelo menos até 24 dias após a inoculação do HSV1. O quadro doloroso durante o período sem lesões é denominado neuralgia pós-herpética (TAKASAKI et al., 2000). Desse modo, entende-se que a neuralgia pós-herpética é um tipo de dor neuropática e, particularmente, de origem inflamatória e infecciosa, sendo tratável ou prevenida pela ação de corticoides no sistema nervoso central (KOTANI et al., 2000; van WIJCK et al., 2006).

Infecções virais ou bacterianas, interferons e RNA fita dupla, citocinas e estresse celular ativam vias de sinalização de moléculas sentinelas, como o inibidor regulado por heme (HRI), o controle geral não-depressível-2 (GCN2), a proteína quinase dependente de RNA (PKR) e a proteína quinase residente no retículo endoplasmático (PERK) (KAZEMI et al., 2007). Os vírus reorganizam e utilizam

várias funções celulares, apoderando-se de vias de sinalização preexistentes para induzir a expressão de genes virais ou celulares para promover a replicação viral (McLEAN, BACHENHEIMER, 1999; WILLIAMS, 1999).

Estudos demonstraram que proteínas do HSV1 interagem com uma proteína que apresenta efeito antiviral denominada proteína quinase dependente de RNA (PKR), interferindo na sua atividade no ambiente intracelular (CASSADY; GROSS, 2002; LUSSIGNOL et al., 2013). Originalmente descoberta quanto ao seu caráter antiviral durante infecções, a PKR também está envolvida em vias de autofagia, apoptose e alterações transcricionais (KIRKEGAARD, TAYLOR, JACKSON, 2004; WILLIAMS, 1999).

1.5. Vias de sinalização relacionadas à proteína quinase dependente de RNA

A PKR é uma proteína serina/treonina quinase dependente de RNA de fita dupla, consistindo em uma molécula sentinela da infecção viral que atua inibindo a síntese proteica (TAYLOR et al., 1996; WU; KAUFMAN, 1997). Por exemplo, a infecção pelo vírus da doença de *Newcastle* provoca a ativação de PKR, a qual fosforila o fator de iniciação eucariótico 2 α (eIF2 α). A fosforilação de eIF2 α inibe a síntese proteica e, conseqüentemente, a replicação viral. eIF2 α é o principal substrato de PKR e o seu principal meio de inibição da síntese proteica. Este efeito antiviral está ausente em animais *knockout* para PKR (ZHANG et al., 2014).

A ativação de PKR também pode ser mediada pela proteína ativadora de PKR, PACT (do inglês *PKR Activator*) (PATEL; SEM, 1998) tanto por situação de estresse celular (PATEL et al., 2000), como por estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento, estresse oxidativo (GARCIA et al., 2006) e citocinas (GARCIA et al., 2006; ZHENG et al., 2008). PKR é expressa constitutivamente nas células de

mamíferos, em baixos níveis, e no estado desfosforilado, inativo (WANG; CARMICHAEL, 2004). De modo semelhante à PKR, PACT é expressa constitutivamente nas células de mamíferos, também em baixa quantidade (PATEL; SEM, 1998). O estresse celular e oxidativo promove a fosforilação de PACT, liberando-a da ligação inibitória com a proteína TRBP, e conduzindo à sua interação com PKR (DAHER et al., 2009; SINGH et al., 2011).

Um alvo da PKR é proteína fosfatase 2A (PP2A), uma serina/treonina fosfatase que está envolvida na regulação de diversas vias de sinalização intracelulares (GOEDERT et al., 1992; LABIB, NURSE, 1993; SONTAG, SONTAG, GARCIA, 1997), regulação do ciclo celular (LEE et al., 1991; SONTAG et al., 1995), transcrição gênica (ALBERTS et al., 1993), apoptose (DENG et al., 1998), plasticidade sináptica no sistema nervoso central e sensibilização central na dor (WANG et al., 2013). PKR é capaz de fosforilar a subunidade B56 α da PP2A e, então, modula a atividade desta proteína, o que sugere outro mecanismo de inibição da síntese proteica (XU; WILLIAMS, 2000).

PP2A, quando ativa, é capaz de defosforilar eIF2 α , o que desinibe a síntese protéica (XU; WILLIAMS, 2000). PP2A também defosforila proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), o que reduz sua atividade quinase (ANDERSON et al., 1990; SONTAG et al., 1993; SONTAG, SONTAG, GARCIA, 1997). PP2A também pode inibir proteínas importantes da sinalização intracelular, como I κ B (DiDONATO et al., 1997; SONTAG, SONTAG, GARCIA, 1997), JNK (MILLWARD, ZOLNIEROWICZ, HEMMING, 1999), P38 (DOZA et al., 1995) e a molécula cálcio-calmodulina (Ca-MKII) (BARNES, SLEVIN, VANAMAN, 1995), sendo que PP2A também é um substrato de Ca-MKII (WANG et al., 2013). Os vírus redirecionam as atividades de PP2A, utilizando-a para desregular mecanismos de controle do

crescimento e sobrevivência celulares, o que contribui para a replicação viral (GARCIA, CAYLA, SONTAG, 2000).

Por ser ativada em resposta a agentes virais e promover acionamento de cascatas inflamatórias, a PKR é alvo de investigação quanto à mediação da resposta inflamatória, atuando na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (TRONEL et al., 2014), e anti-inflamatórias, como IL-10 (CHAKRABARTI et al., 2008). PKR também promove a ativação da quinase I κ B (IKKB) (GIL; ALCAMÍ; ESTEBAN, 2000) que, por sua vez, ativa a síntese do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (GIL et al., 2004). IKK fosforila e inativa moléculas inibidoras do NF- κ B, que são da família dos I κ Bs (I κ B α e I κ B β) (BONNET et al., 2000; ZAMANIAN-DARYOUSH et al., 2000). O NF- κ B ativo então desempenha suas funções, entre elas a regulação da transcrição de genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória, na diferenciação celular, na apoptose (BAEUERLE, BALTIMORE, 1996; GHOSH; MAY; KOPP, 1998) e na produção de citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF α), mediada pela interação PKR-PACT (YOSHIDA et al., 2012).

Adicionalmente ao NF- κ B, a ativação de MAPK também está relacionada à transcrição de genes relacionados à mediação da resposta inflamatória (ARTHUR; LEY, 2013), resposta imune (ARTHUR; LEY, 2013; KIM et al., 2008) e estresse celular (KIM et al., 2008). Estudos *in vitro* indicaram que a infecção pelo HSV1 ativa P38 e JNK, MAPK transdutoras de sinal ativadas pelo estresse celular. A ativação dessas MAPK ocorreu no intervalo entre 3-4h a 14h após a infecção pelo HSV1, e parece não ativar ERK1,2 nesse período de tempo (McLEAN, BACHENHEIMER, 1999). A atividade de PKR parece ser necessária para a ativação de P38 e de JNK

decorrente de estímulos como dsRNA, lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas pró-inflamatórias (GOH, deVEER, WILLIAMS, 2000).

Em vias de sinalização de proliferação celular, PKR promove a ativação de JNK que, por sua vez, atua em vias relacionadas à Akt (CHEN, 2014). O inibidor da autofosforilação de PKR, a 2-aminopurina (2-AP), é capaz de inibir a fosforilação de Akt de modo dose-dependente em macrófagos *in vitro* (HU, CONWAY, 1993).

PKR também interage com a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3), promovendo sua fosforilação e ativando-a, tanto em fibroblastos estimulados com fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) como em células hepáticas infectadas com o vírus da hepatite C. STAT3 se transloca para o núcleo celular, no qual exerce sua função de ativação da transcrição gênica (DEB et al., 2001; YAN, CHEN, BRECHOT, 2010). STAT3 também é importante em mecanismos de ativação do sistema nociceptivo. Evidências indicam que há ativação de STAT3 em GRD e que a inibição intratecal de STAT3 apresenta efeito analgésico nos testes de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio e ao calor em modelos de dor neuropática (DUBOVÝ et al., 2010; XUE et al., 2014)

A proteína PKR provavelmente atua na resposta à infecção viral regulando o sistema imune inato para equilibrar a relação entre citocinas pró e anti-inflamatórias (CHAKRABARTI et al., 2008), mas seus efeitos em mecanismos de nocicepção são desconhecidos.

1.6. PKR e a hiperalgesia térmica

Dados do nosso laboratório sugerem que a PKR deve estar envolvida na mediação da hiperalgesia térmica de origem inflamatória. A injeção intratecal do inibidor de PKR (PKRi) reverte a hiperalgesia térmica provocada por CFA (KUSUDA, 2013). Em condições dolorosas, a expressão de TRPV1 é regulada no GRD e no CDME pela sinalização via MAPK (BRON et al., 2003; CUI et al., 2008; JI et al., 2009; ZHUANG et al., 2004) e pelo complexo formado entre o Ca^{2+} e a Ca-MKII. A Ca-MKII fosforila o TRPV1 e o ativa, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática ao Ca^{2+} , e aumentando a concentração deste íon no citoplasma (JUNG et al., 2004). A inibição farmacológica de Ca-MKII previne ambos hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em modelos experimentais de lesão neuropática (DAI et al., 2005; OGAWA et al., 2005) e 24 horas após injeção intraplantar com CFA (LUO et al., 2008b).

Estímulos térmicos nocivos promovem respostas comportamentais frente a ativação de receptores TRPV1, os quais são canais catiônicos que promovem despolarização acompanhada por sensação de queimação e estão presentes em fibras nervosas aferentes primárias nociceptivas (CATERINA et al., 1997; 2000; HOLZER, 2008; WANG, 2008). A hiperalgesia térmica que ocorre normalmente após estímulos pró-inflamatórios, como injeção plantar de carragenina, de óleo de mostarda ou de CFA, não acontecem em animais *knockout* para receptores TRPV1. Entretanto, esses mesmos animais desenvolvem alodínia mecânica nesses modelos (CATERINA et al., 1997, 2000; DAVIS et al., 2000). Esse perfil comportamental quanto à hiperalgesia térmica e alodínia mecânica é idêntico à linhagem de animais *knockout* para PKR utilizada em estudos do nosso laboratório (KUSUDA, 2013).

Devido a importância, a incidência e as repercussões clínicas das neuralgias herpética e pós-herpética, faz-se necessário compreender os mecanismos

fisiopatológicos destas doenças. Para tanto, o presente estudo irá possibilitar avanços no estudo das vias da PKR no sistema nociceptivo de animais em um modelo de neuropatia periférica de origem viral.

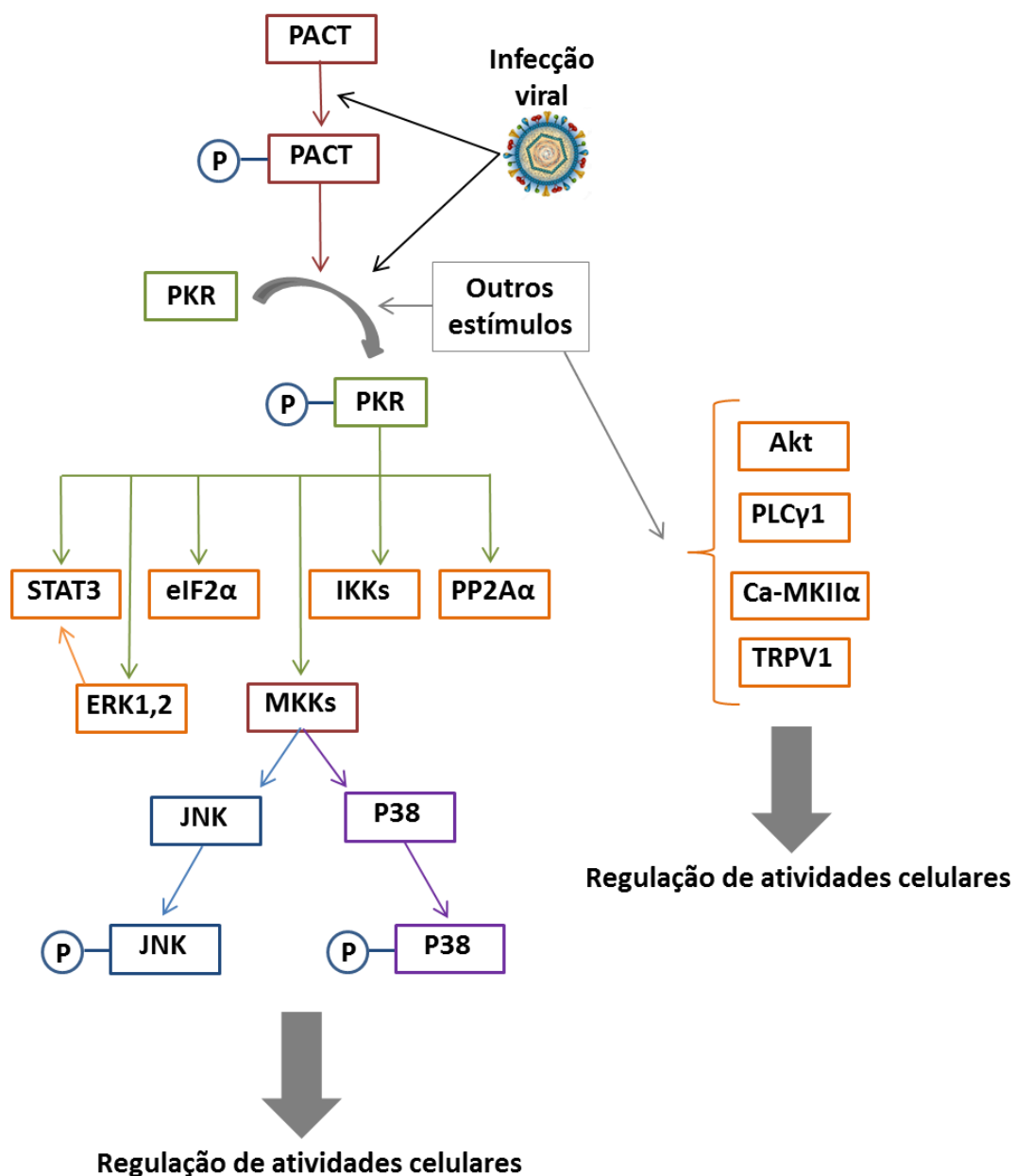


Figura 1. Representação esquemática das proteínas que foram investigadas no presente estudo com base em dados da literatura citados ao longo da introdução. Os significados das siglas estão descritos ao longo do texto.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o perfil de sensibilidade mecânica e térmica e as vias de sinalização intracelulares relacionadas à proteína quinase dependente de RNA em um modelo experimental de neuropatia periférica de origem viral.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica após inoculação do HSV1 na pata posterior esquerda de camundongos das linhagens C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} nos períodos herpético e pós-herpético.
- Investigar o perfil de expressão e/ou fosforilação de PKR, eIF2 α , IKK, PACT e PP2A α em GRD de animais C57bl/6 nos períodos herpético e pós-herpético.
- Investigar o efeito do PKRi sobre a hiperalgesia térmica, o desempenho motor e a fosforilação de PKR no GRD de camundongos C57bl/6 nos períodos herpético e pós-herpético.
- Investigar o efeito do PKRi sobre a fosforilação de P38, ERK1,2, JNK, PLC γ 1, Akt, IKK α/β , STAT3 em GRD de animais C57bl/6 nos períodos herpético e pós-herpético.
- Investigar o efeito da inibição farmacológica e da deleção genética da PKR sobre a resposta nocifensiva e a hiperalgesia térmica à ativação de receptores TRPV1 em camundongos C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} nos períodos herpético e pós-herpético.
- Investigar o efeito do PKRi sobre a expressão de Ca-MKII α e TRPV1 em GRD de animais C57bl/6 nos períodos herpético e pós-herpético.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos machos, com peso de 20-25 g, das linhagens C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-}. Camundongos C57bl/6 foram obtidos do Biotério da Universidade de São Paulo, do campus da cidade de Ribeirão Preto. Camundongos PKR^{+/+} e PKR^{-/-} foram gerados no Instituto de Biologia Molecular da Universidade de Zurique, Suíça, pelo laboratório do Prof. Charles Weissmann (YANG et al., 1995). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), livre acesso a ração e a água e ciclo claro:escuro de 12h:12h.

Os protocolos experimentais descritos foram realizados de acordo com as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo 196/2014). Os animais utilizados foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical.

3.2. Propagação dos estoques virais

O HSV1 foi fornecido pelo Prof. Eurico Arruda do Centro de Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Células Vero foram propagadas com meio MEM (meio essencial mínimo) suplementando com 10% de soro fetal bovino. Quando as células alcançaram 80% de confluência, o estoque de vírus foi inoculado em presença de MEM suplementado com 3% de soro fetal bovino. Após o desenvolvimento do efeito citopático, as culturas foram

congeladas a -70°C e descongeladas em banho-maria a 37°C por três vezes, centrifugadas, e o sobrenadante foi inserido em uma nova cultura de células. Após algumas passagens, o título em TCID₅₀ dos estoques foi determinado em células Vero crescidas em placas de 96 poços.

3.3. Modelo experimental de neuropatia de origem viral

Os camundongos foram inoculados com HSV1 ativo (aproximadamente $2 \times 10^{6.5}$) ou com HSV1 inativado pela incubação em banho seco a 80°C por 1 hora. No dia anterior à inoculação, os animais foram submetidos a tricotomia das patas posteriores com creme depilatório. No dia da inoculação, foi realizada a escarificação da pele e, em seguida, a inoculação do vírus na região anterior da pata posterior esquerda, no dermatomo correspondente ao segmento espinal L3-L6 (5 x 5 mm). Esses procedimentos foram realizados enquanto os animais estavam profundamente anestesiados pela administração via intraperitoneal (i.p.) de cetamina (60 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg).

3.4. Testes comportamentais

3.4.1. Teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia mecânica

O teste de alodínia mecânica foi realizado antes e 8, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do vírus ativo ou inativo (Fig. 2). Animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} foram colocados, individualmente, em compartimentos de acrílico transparente com 15 cm² e sobre superfície de metal vazada, onde permaneceram em ambientação de uma hora. Posteriormente, foram aplicados filamentos de von Frey (de 1,62 mN a 35,59 mN) na superfície plantar da pata posterior esquerda, sendo que o limiar de retirada

da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força de cada estímulo (CHAPLAN et al., 1994). A resposta flexora ao estímulo mecânico também foi monitorada antes da eutanásia para extração de tecidos e somente os animais com alodínia mecânica, no caso da inoculação do vírus ativo, participaram dos experimentos.

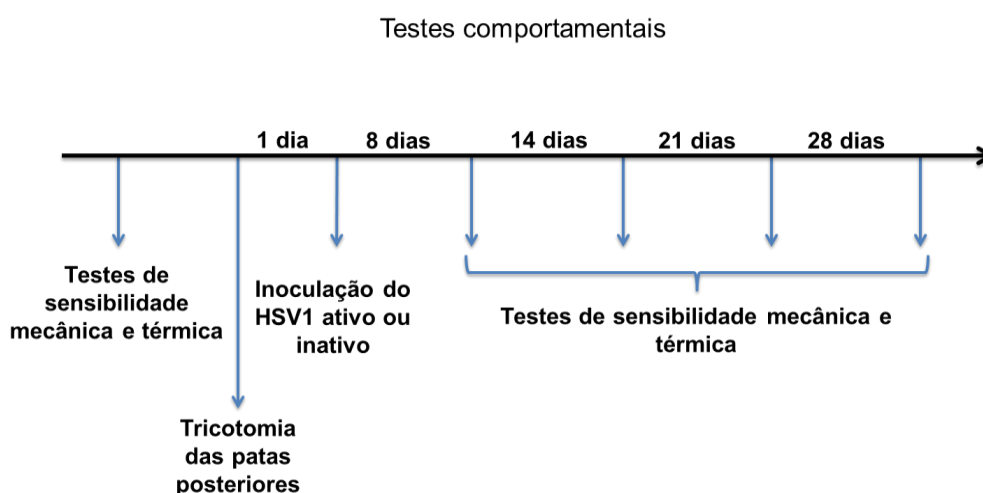


Figura 2. Delineamento experimental dos testes de sensibilidades mecânica e térmica.

3.4.2. Teste de sensibilidade térmica para monitoramento de hiperalgesia térmica

O teste de sensibilidade térmica foi realizado antes e 8, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do vírus ativo ou inativo (Fig. 2). Animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} foram colocados, individualmente, em compartimentos de acrílico de 15 cm² e sobre superfície de vidro transparentes, permitindo a passagem de um feixe de luz capaz de provocar estímulo térmico doloroso quando dirigido à superfície plantar da pata posterior esquerda do animal. A ambientação apresentou a duração de uma hora. Posteriormente, foram realizadas três medidas com intervalo de 5 minutos e a média entre elas foi considerada como latência térmica da pata. O tempo de corte foi de 20 segundos, a fim de evitar lesão tecidual (HARGREAVES et al., 1988).

3.4.3. Injeção intraperitoneal do PKRi e teste de sensibilidade térmica

Com o objetivo de investigar a repercussão comportamental da administração do PKRi - C16 (JAMMI et al., 2003), mensurou-se a sensibilidade térmica nos períodos herpético e pós-herpético (8 e 21 dias após a inoculação do HSV1, respectivamente) em animais C57bl/6, nos períodos anterior e 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos posteriormente a administração i.p. do inibidor ou do seu controle negativo (Fig. 3). O PKRi (PKRi) (Calbiochem WWR International, San Diego, EUA) é um derivado oxindole/imidazole que se liga ao sítio de ligação de ATP de PKR, o que inibe a sua autofosforilação induzida por RNA (JAMMI et al., 2003).

Estudos demonstraram que a injeção sistêmica do PKRi inibe a fosforilação de PKR no córtex cerebral de ratos, em doses de 3.35, 33.5 e 167.5 µg/kg (INGRAND et al., 2007), e aumento da atividade neuronal hipocampal e aumento do armazenamento da memória a longo prazo em camundongos, em dose de 0.1 mg/kg (ZHU et al., 2011), o que sugere que o fármaco ultrapassa a barreira hematoencefálica. Nesse estudo, animais C57bl/6 receberam injeção i.p. de PKRi nas doses de 0.005 mg/kg e 0.2 mg/kg em 200 µL de 0.5% DMSO, a fim de investigar o efeito dose-dependente do PKRi no comportamento dos animais. Os animais controle receberam injeção de 200 µL de controle negativo.

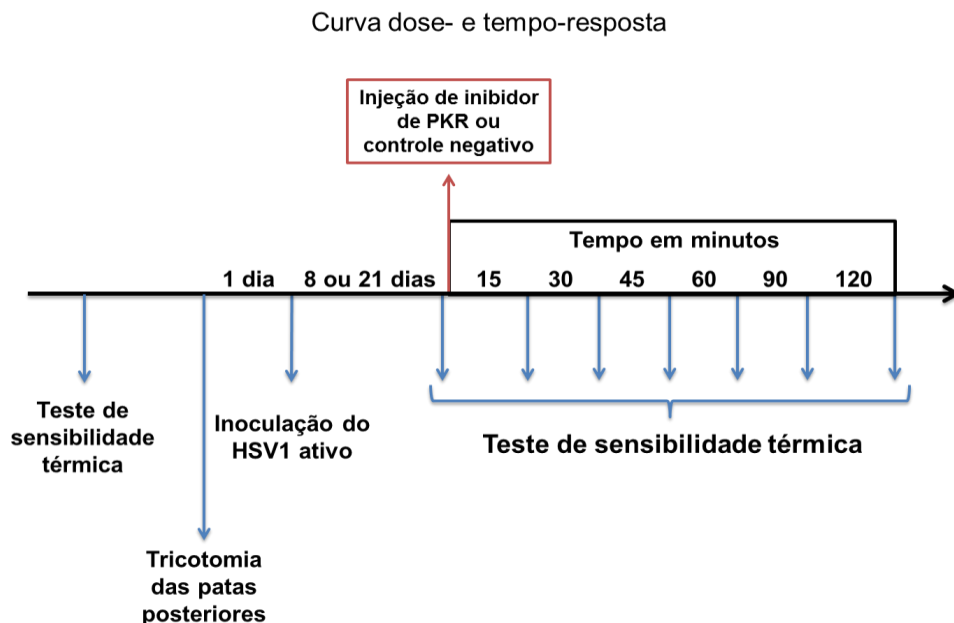


Figura 3. Delineamento experimental da curva dose- e tempo-resposta para o PKRi no teste de sensibilidade térmica.

3.4.4. Teste de desempenho motor

Inicialmente, os animais foram ambientados na plataforma de rota-rod por três dias seguidos. Na ambientação e nos testes, os animais foram colocados na esteira do aparato em rotação de 20 rpm. No 2^o min, a velocidade foi aumentada para 25 rpm, no 3^o min para 28 rpm e, no 4^o para 37 rpm. O tempo máximo que o animal despendeu no rota-rod foi de 5 min. No teste basal, a média do tempo despendido no rota-rod em três tentativas, com o intervalo de 15 min, foi registrada como tempo de permanência no aparato. Para o teste experimental, foi administrado via i.p. o PKRi ou o controle negativo e, 15 min após, foram realizadas três tentativas com o intervalo de 15 min, para cada animal (Fig. 4).

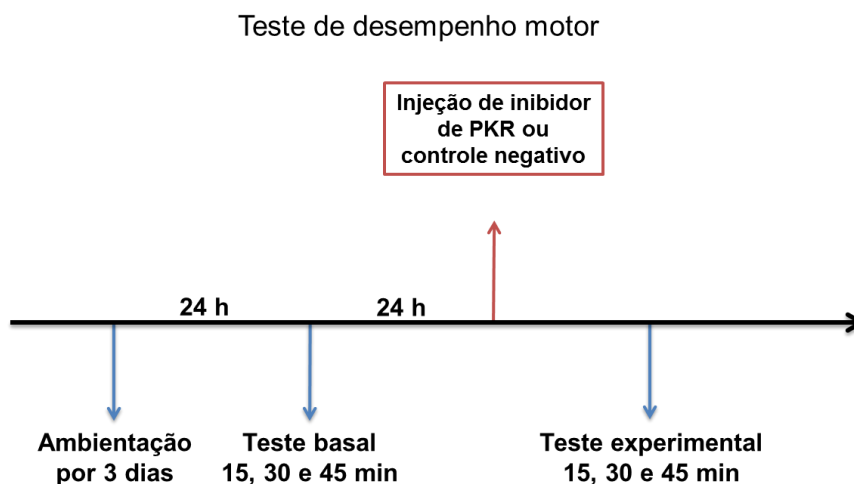


Figura 4. Delineamento experimental do teste de desempenho motor utilizando PKRi e seu controle negativo.

3.4.5. Teste de resposta nocifensiva à capsaicina

A capsaicina é um agonista de receptores TRPV1, que quando administrada subcutaneamente na pata provoca hiperalgesia térmica e resposta nocifensiva de bater, morder e lamber a pata ipsilateral (JULIUS, 2013).

O teste da capsaicina foi realizado nos períodos herpético e pós-herpético em grupos de animais independentes. Animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} foram colocados, individualmente, em compartimentos de acrílico de 15 cm² e sobre superfície de vidro transparentes durante uma hora para ambientação e, então, foi injetado sistemicamente o PKRi ou o controle negativo. Após 15 min, foi mensurada a latência térmica e, então, foram injetados, subcutaneamente e com uma seringa de Hamilton e uma agulha de calibre 26, 10 µg de capsaicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 20 µL de veículo (10% de etanol, 0.5% de Tween-80 e 89.5% de solução salina) no dorso da pata posterior esquerda. O tempo que o animal despendeu realizando o comportamento nocifensivo (mordendo, lambendo ou batendo a pata posterior esquerda) foi cronometrado durante 10 minutos (BENEDETTI et al.,2012;

GILCHRIST; ALLARD; SIMONE, 1996). Após 30 min da administração do PKRi, a latência térmica foi mensurada novamente (Fig. 5).

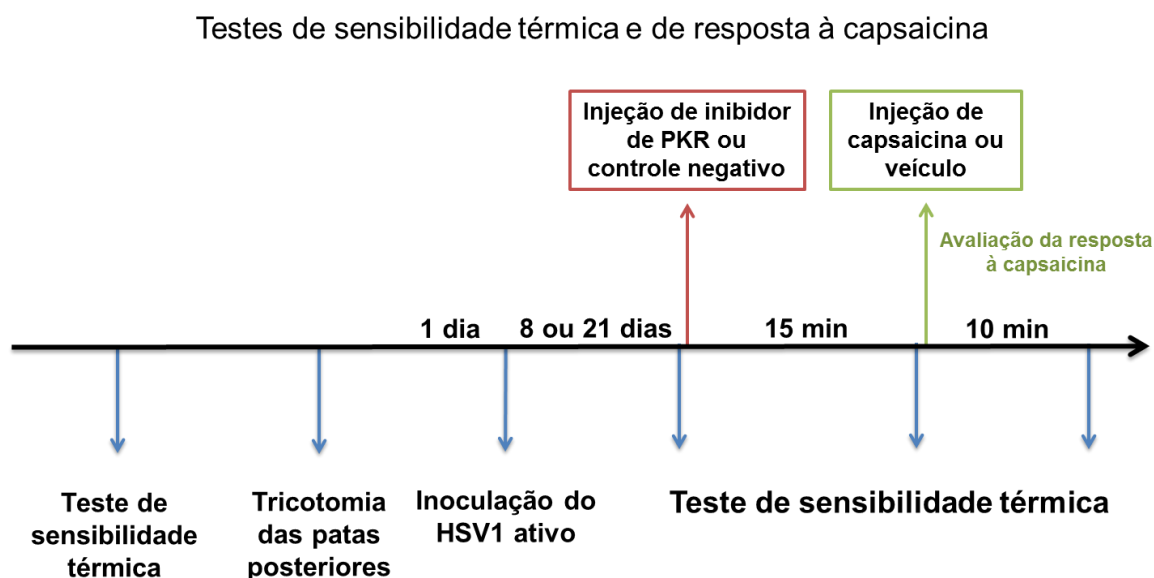


Figura 5. Delineamento experimental dos testes de sensibilidade térmica e resposta nociensiva à ativação de receptores TRPV1 pela capsaicina utilizando PKRi e seu controle negativo.

3.5. Imunodetecção de proteínas e de seus resíduos fosforilados

Para a imunodetecção de proteínas específicas e de seus resíduos fosforilados, foram obtidos extratos proteicos totais dos GRD e da CDME lombar (L3-L6) de camundongos C57bl/6, os quais foram homogeneizados em tampão contendo 137 mM de NaCl, 20 mM de Tris, 1% de NP-40, 0,105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e de fosfatases (NaF e Na₃VO₄) e pH 8.0. Após homogeneização, os tecidos foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 min a 4°C.

O sobrenadante e o precipitado foram separados e a quantidade de proteína total de cada amostra do sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry. Amostras contendo 30 µg ou 50 µg de proteína total foram submetidas à eletroforese

em gel de poliacrilamida contendo 7,5%-12% SDS (SDS-PAGE) e transferidas, por eletroforese, para uma membrana de PVDF. A detecção das proteínas foi feita por incubações sequenciais do anticorpo primário e do secundário, seguidas pela revelação através do método de quimioluminescência.

Anticorpos anti-PKR, anti-fosfo-PKR, anti-eIF2 α , anti-fosfo-eIF2 α , anti-PACT, anti-fosfo-PACT, anti-PP2A α , anti-IKK β , anti-fosfo-IKK α/β , anti-fosfo-p38, anti-fosfo-ERK 1,2, anti-fosfo-JNK, anti-fosfo-PLC γ 1, anti-fosfo-Akt, anti-fosfo-STAT3, anti-Cálcio-calmodulina tipo II α e anti-TRPV1 foram utilizados para a análise da expressão e fosforilação de proteínas. Os filtros foram quantificados por análise de imagem e a quantidade de proteína de interesse foi normalizada pela β -actina de cada amostra.

3.6. Análise estatística

As análises dos testes comportamentais foram realizadas utilizando ANOVA de uma via para análises intragrupo e ANOVA de duas vias para comparações entre os grupos. Para ambos os ensaios foram aplicados pós-testes de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises da imunodeteção de proteínas foram realizadas pelo teste *t* de *Student* não pareado para comparação entre o grupo experimental e o controle. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

4. Resultados

4.1. HSV1 provoca alodínia mecânica em animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} e hiperalgesia térmica em animais C57bl/6 e PKR^{+/+}, mas não em animais PKR^{-/-}

Os animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} inoculados com HSV1 ativo apresentaram redução do limiar da pata do 8º ao 28º dia após a inoculação tanto em relação ao momento basal ($p < 0.001$) quanto em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo ($p < 0.001$) (Fig. 6A e 6B).

Semelhantemente ao limiar de retirada, a latência térmica da pata apresentou-se reduzida em animais C57bl/6 inoculados com HSV1 ativo do 8º ao 28º dia após a inoculação ($p < 0.001$), quando esses momentos foram comparados tanto ao momento basal quanto ao grupo inoculado com o HSV1 inativo ($p < 0.001$) (Fig. 6C). Também houve redução da latência em animais PKR^{+/+} inoculados com HSV1 ativo do 8º ao 28º dia após a inoculação quando esses momentos foram comparados com o momento basal ($p < 0.001$), com os grupos inoculados com o HSV1 inativo e com o grupo de animais PKR^{-/-} com HSV1 ativo ($p < 0.001$) (Fig. 6D). Em animais PKR^{-/-}, o HSV1 ativo não provocou alteração da latência em nenhum dos momentos avaliados, tanto em comparação ao momento basal quanto em relação aos demais grupos.

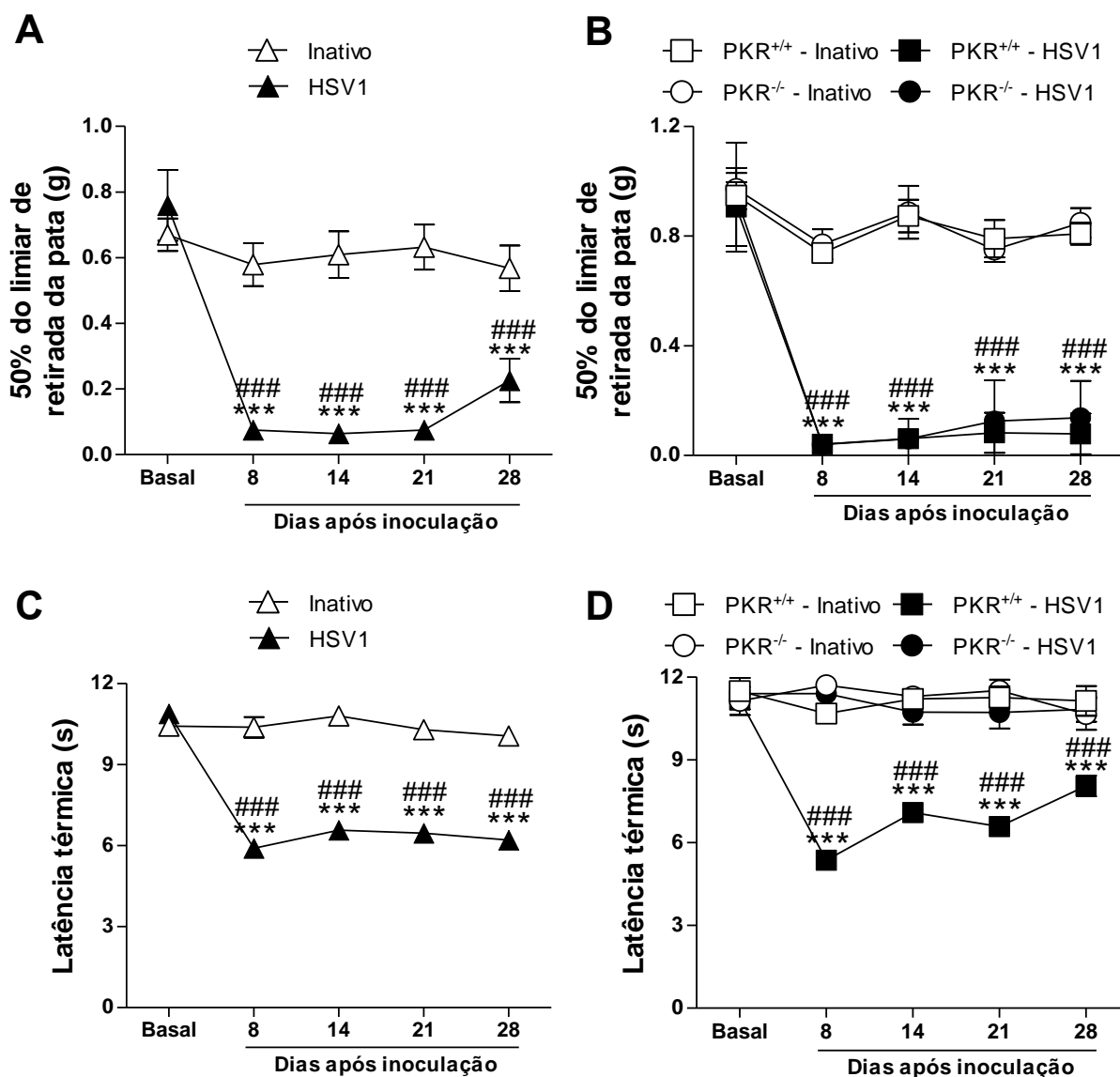


Figura 6. (A e B) Alodínia mecânica expressa como média do limiar de retirada da pata (g), utilizando o método *up and down* e (C e D) hiperalgesia térmica expressa como média da latência (s), utilizando o teste baseado no método de Hargreaves, no momento basal e após a inoculação do HSV1 ativo ou inativo (8^o, 14^o, 21^o e 28^o dias) em animais (A e C) C57bl/6, (B e D) PKR^{-/-} e PKR^{+/+}. Resultados expressos em média ± E.P.M. (###p<0.001 em relação ao momento basal, utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-testes de Bonferroni, ***p<0.001 em relação ao grupo inoculado com HSV1 inativo, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=8-12/grupo).

4.2. HSV1 promove aumento da expressão de PKR, fosfo-PKR, fosfo-eIF2 α , PACT, IKK β , fosfo-IKK α/β e PP2A α em GRD nas fases herpética e pós-herpética e aumento da expressão de fosfo-PACT em GRD na fase herpética

O HSV1 provocou alteração dos perfis de expressão e de fosforilação da PKR e de proteínas relacionadas às suas cascatas de sinalização *upstream* ou *downstream*, em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6. No período herpético, houve aumento da expressão de PKR ($p<0.01$), fosfo-PKR ($p<0.05$), fosfo-eIF2 α ($p<0.05$), PACT ($p<0.05$), IKK β ($p<0.01$), fosfo-IKK α/β ($p<0.05$) e PP2A α ($p<0.05$), em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo (Fig. 7).

No período pós-herpético, houve aumento da expressão de PKR ($p<0.05$), fosfo-PKR ($p<0.05$), eIF2 α ($p<0.05$), fosfo-eIF2 α ($p<0.01$), PACT ($p<0.01$), fosfo-PACT ($p<0.001$), IKK β ($p<0.05$), fosfo-IKK α/β ($p<0.05$) e PP2A α ($p<0.01$), em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo (Fig. 7).

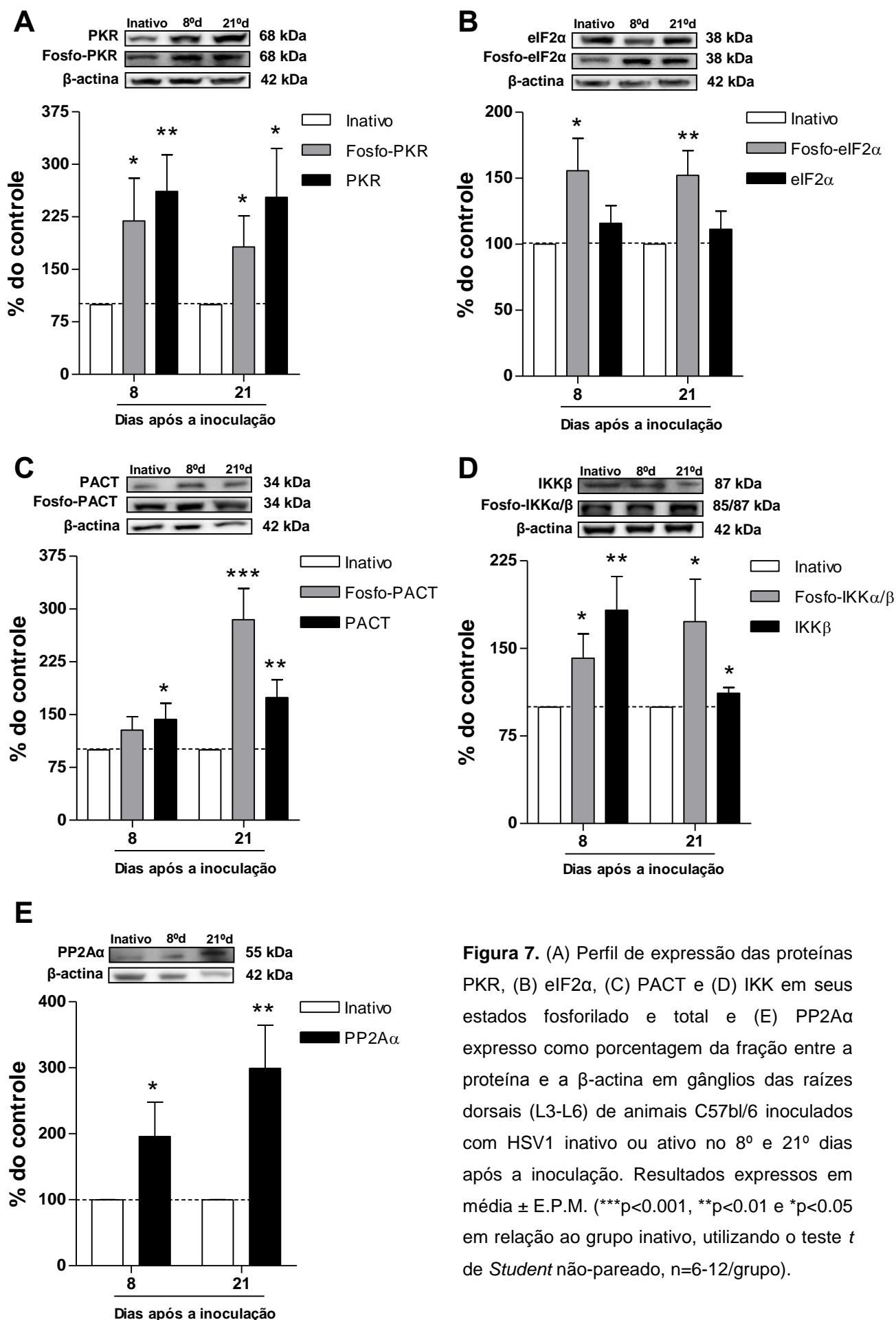


Figura 7. (A) Perfil de expressão das proteínas PKR, (B) eIF2 α , (C) PACT e (D) IKK em seus estados fosforilado e total e (E) PP2A α expresso como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em gânglios das raízes dorsais (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo ou ativo no 8^o e 21^o dias após a inoculação. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) $p < 0.001$, **) $p < 0.01$ e *) $p < 0.05$ em relação ao grupo inativo, utilizando o teste *t* de Student não-pareado, $n = 6-12$ /grupo).

4.3. A inibição farmacológica sistêmica de PKR apresenta efeito analgésico dependente da dose e do tempo nos períodos herpético e pós-herpético, não modifica o desempenho motor e inibe a fosforilação de PKR no GRD de animais inoculados com HSV1

A administração sistêmica do PKRi em animais C57bl/6 inoculados com HSV1 promoveu efeito analgésico reduziu significativamente a hiperalgesia térmica de modo dose- e tempo-dependente nos períodos herpético e pós-herpético (Fig. 8A e 8B). Foram utilizados o inibidor da PKR (PKRi) nas doses de 0.005 mg/kg e 0.2 mg/kg e o controle negativo administrados sistemicamente, via i.p. A latência térmica foi monitorada antes da injeção e 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a administração do PKRi, nos períodos herpético e pós-herpético.

Na fase herpética, o grupo que recebeu a dose de 0.005 mg/kg apresentou reversão da hiperalgesia aos 15 min, quando comparado ao grupo injetado com controle negativo ($p < 0.05$). O grupo que recebeu a dose de 0.2 mg/kg apresentou reversão da hiperalgesia de 15 min a 90 min após a administração, quando comparado ao grupo injetado com controle negativo (15 min e 45 min, $p < 0.001$; 30 min, $p < 0.05$; 60 min e 90 min, $p < 0.01$). Os grupos que receberam as doses de 0.005 mg/kg e 0.2 mg/kg apresentaram diferença significativa de latência aos 45 min ($p < 0.05$) (Fig. 8A).

Na fase pós-herpética, o grupo que recebeu a dose de 0.005 mg/kg apresentou reversão da hiperalgesia aos 15 min, quando comparado ao grupo injetado com controle negativo ($p < 0.05$). O grupo que recebeu a dose de 0.2 mg/kg apresentou reversão da hiperalgesia de 15 a 45 min após a administração, quando comparado ao grupo injetado com controle negativo ($p < 0.01$). Aos 15 minutos,

houve diferença significativa entre os grupos que receberam as doses de 0.005 mg/kg e 0.2 mg/kg ($p < 0.01$) (Fig. 8B).

O teste de desempenho motor identificou que o tempo de permanência de animais C57bl/6 injetados com PKRi, controle negativo ou intactos no rota-rod não houve diferenças significativas desde o momento basal até 15 min, 30 min e 45 min após a injeção (Fig. 8D).

Molecularmente, a administração sistêmica do PKRi (dose de 0.2 mg/kg) reverteu o aumento da fosforilação ($p < 0.001$) da PKR no GRD de animais 21 dias após a inoculação do HSV1 (Fig. 8C).

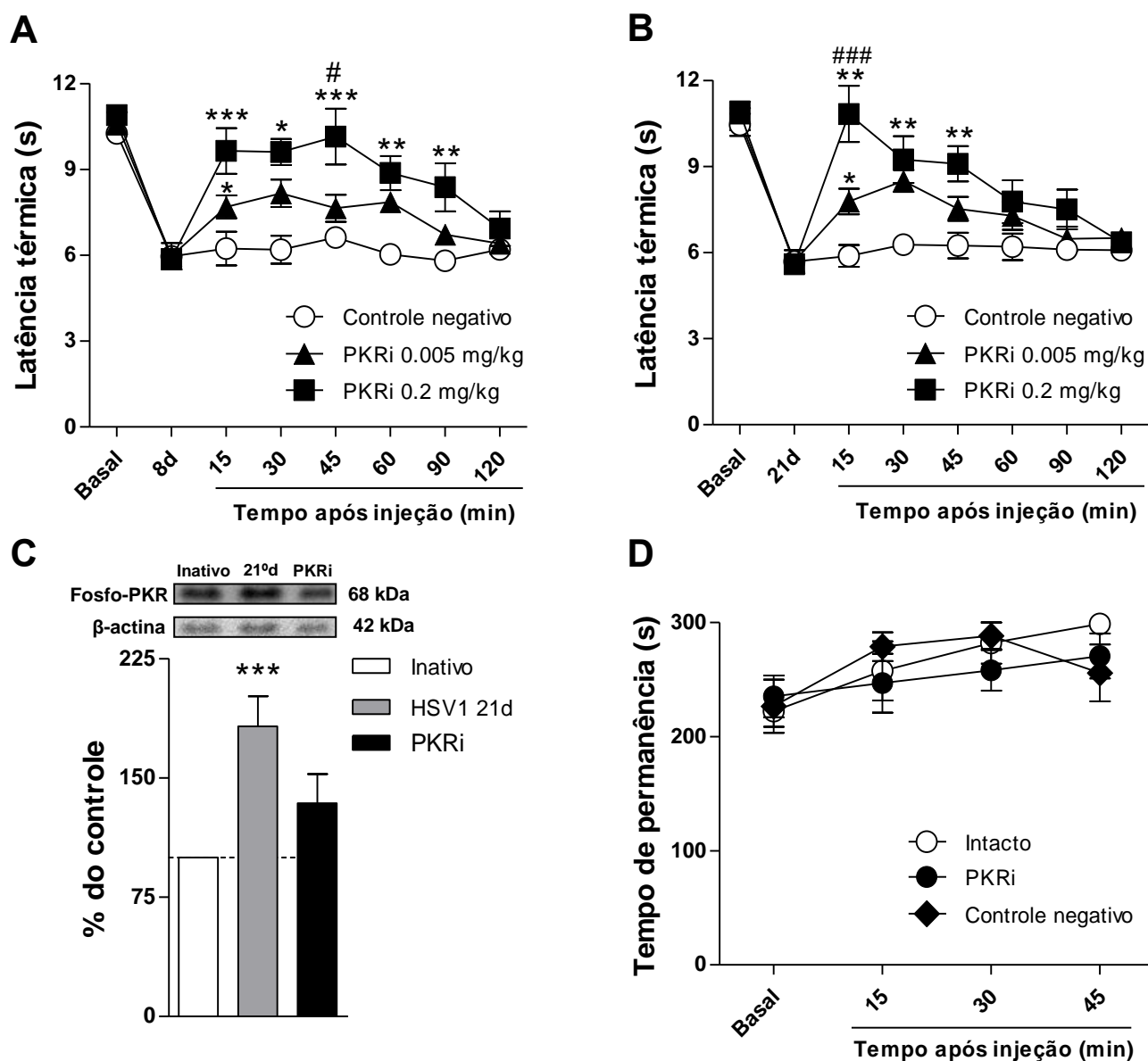


Figura 8. (A e B) Latência térmica em animais C57bl/6 expressa como média da latência (s), utilizando o teste baseado no método de Hargreaves, no momento basal, após 8 ou 21 dias a inoculação do HSV1 ativo e 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a administração sistêmica do PKRi (PKRi) nas doses 0.005 e 0.2 mg/kg ou controle negativo. (C) Perfil de fosforilação de PKR expresso como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 21^o dia após a inoculação e HSV1 ativo no 21^o dia após 15 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi. (D) Tempo de permanência no rota-rod no momento basal e 15, 30 e 45 min após a injeção do PKRi. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0.05$ e ### $p < 0.001$ em relação ao grupo injetado com PKRi 0.005 mg/kg, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni para análises dos testes de comportamento ou teste t de *Student* não pareado para análise do perfil de expressão de fosfo-PKR, $n=7-10$ /grupo).

4.4. A inibição farmacológica sistêmica de PKR intensifica a redução fosforilação de P38 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético e inibe o aumento da fosforilação de JNK e ERK1,2 no período pós-herpético em animais inoculados com HSV1

O HSV1 provoca redução da fosforilação de P38 no período herpético ($p < 0.001$) e o PKRi provoca o aumento da fosforilação tanto em relação ao grupo HSV1 8 dias ($p < 0.05$) quanto em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 9A).

No período pós-herpético, o PKRi provoca aumento da fosforilação de P38 em relação aos grupos HSV1 21 dias ($p < 0,05$) e em comparação ao grupo inativo ($p < 0.01$) (Fig. 9B).

No período herpético, os grupos estudados não apresentam diferenças entre si da fosforilação de ambas as MAPK JNK e ERK1,2 (Fig. 9C e 9E).

No período pós-herpético, o HSV1 provoca aumento da fosforilação de JNK ($p < 0.01$) e o PKRi provoca a redução da fosforilação tanto em relação ao grupo HSV1 21 dias ($p < 0.01$) quanto em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 9D). Nesse mesmo período, houve aumento da fosforilação de ERK1,2 no grupo HSV1 21 dias em relação ao grupo inativo ($p < 0.01$), o qual foi revertido pelo PKRi (Fig. 9F).

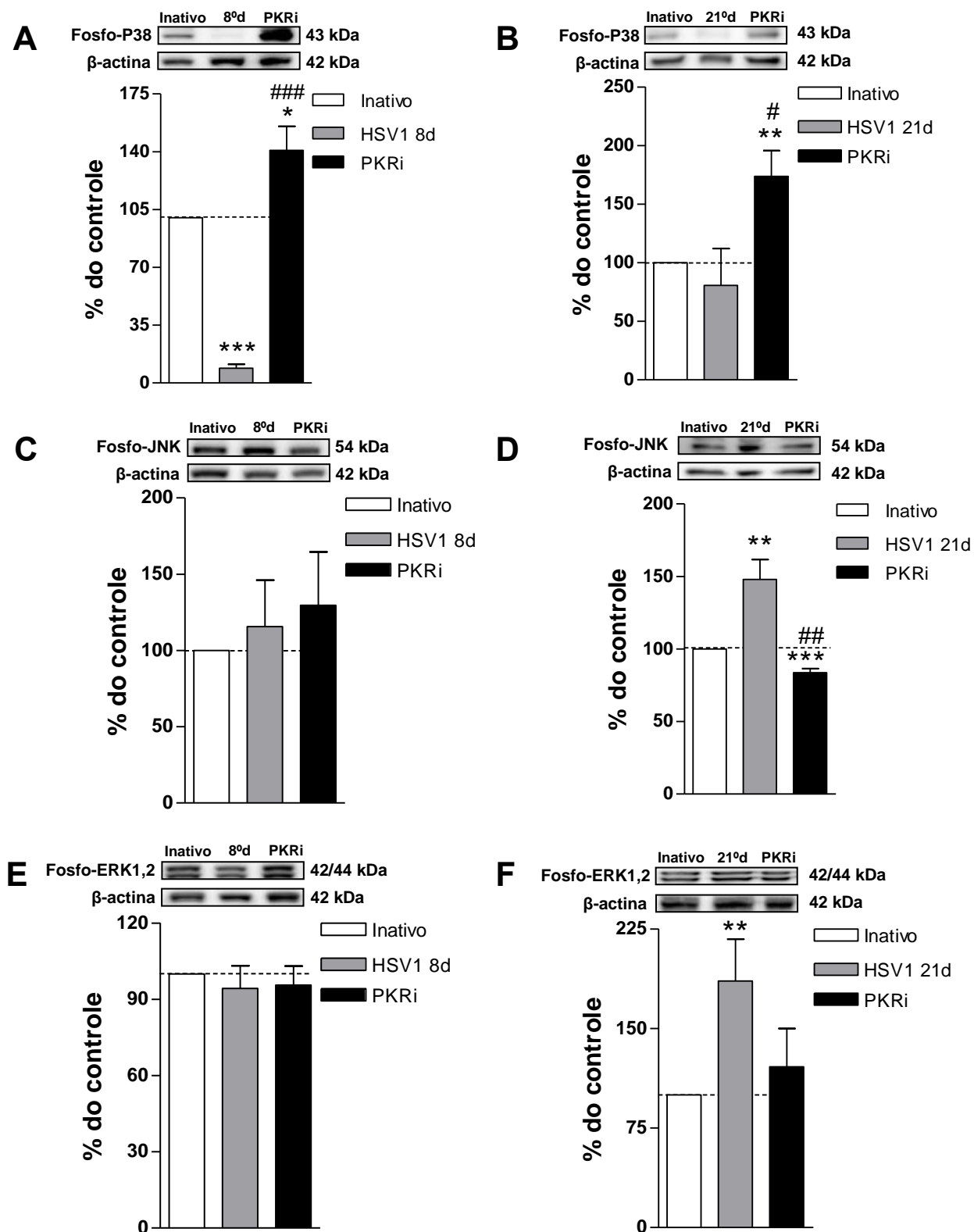


Figura 9. Perfis de fosforilação de (A e B) P38, (C e D) JNK e (E e F) ERK1,2 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após a inoculação e HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após 15 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) p <0.001, (**) p <0.01 e (*) p <0.05 em relação ao grupo inativo; (###) p <0.001, (##) p <0.01 e (#) p <0.05 em relação ao HSV1 ativo, utilizando teste *t* de Student não pareado, $n=5-8$ /grupo).

4.5. A inibição farmacológica sistêmica de PKR inibe o aumento da fosforilação de PLC γ 1 e Akt induzida por infecção pelo HSV1 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético

No período herpético, o HSV1 provocou o aumento da fosforilação de PLC γ 1 ($p < 0.001$). O PKRi inibiu esse aumento em relação ao grupo HSV1 8 dias ($p < 0.05$) e reduziu a fosforilação de PLC γ 1 em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 10A).

No período pós-herpético, houve aumento da fosforilação de PLC γ 1 no grupo HSV1 21 dias ($p < 0.05$), o qual foi inibido pelo PKRi (Fig. 10B).

De modo semelhante, houve aumento da expressão de fosfo-Akt no grupo HSV1 8 dias em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$), o qual foi inibido pelo PKRi (Fig. 10C).

No período pós-herpético, o HSV1 provocou o aumento da fosforilação de Akt ($p < 0.01$). O PKRi inibiu esse aumento em relação ao grupo HSV1 21 dias ($p < 0.05$) e reduziu a fosforilação de Akt em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 10D).

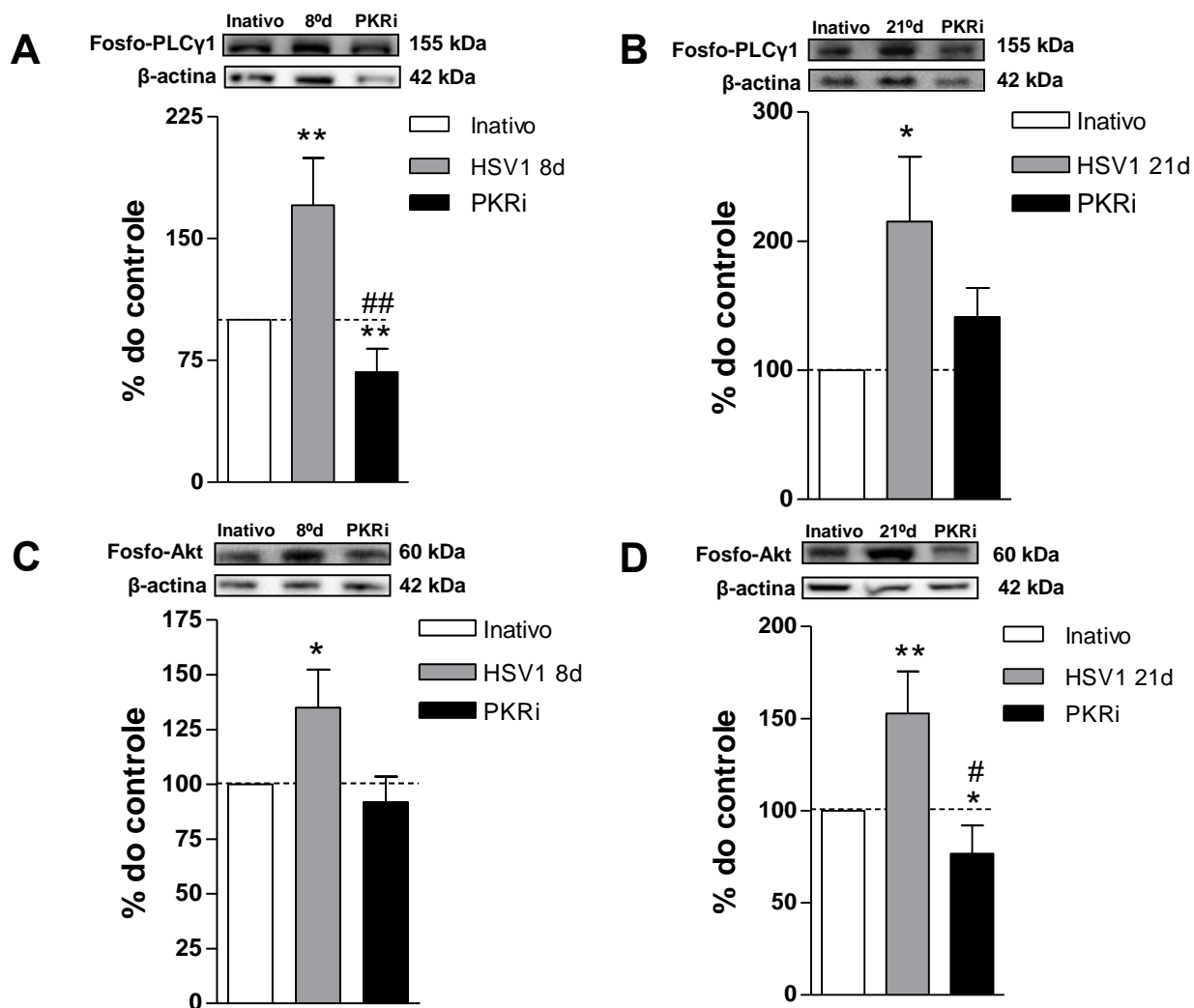


Figura 10. Perfis de fosforilação de (A e B) PLCγ1 e (C e D) Akt expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β-actina em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8º ou 21º dias após a inoculação e HSV1 ativo no 8º ou 21º dias após 15 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi. Resultados expressos em média ± E.P.M. (**p<0.01 e *p<0.05 em relação ao grupo inativo; ##p<0.01 e #p<0.05 em relação ao HSV1 ativo, utilizando teste *t* de Student não pareado, n=5-9/grupo).

4.6. A inibição farmacológica sistêmica de PKR inibe o aumento da fosforilação de IKK α / β e de STAT3 induzido por infecção pelo HSV1 em GRD nos períodos herpético e pós-herpético

No período herpético, houve aumento da fosforilação de IKK α / β no grupo HSV1 8 dias em relação ao grupo inativo ($p < 0.001$), sendo que o PKRi inibiu esse aumento ($p < 0.05$) e reduziu a fosforilação em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 11A).

No período pós-herpético, também houve aumento da fosforilação de IKK α / β no grupo HSV1 21 dias em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$), o qual foi revertido pelo PKRi (Fig. 11B).

Além disso, houve aumento da fosforilação de STAT3 no período herpético ($p < 0.01$), o qual foi revertido pelo PKRi ($p < 0.05$) (Fig. 11C), e no período pós-herpético ($p < 0.05$), o qual também foi inibido pelo PKRi (Fig. 11D).

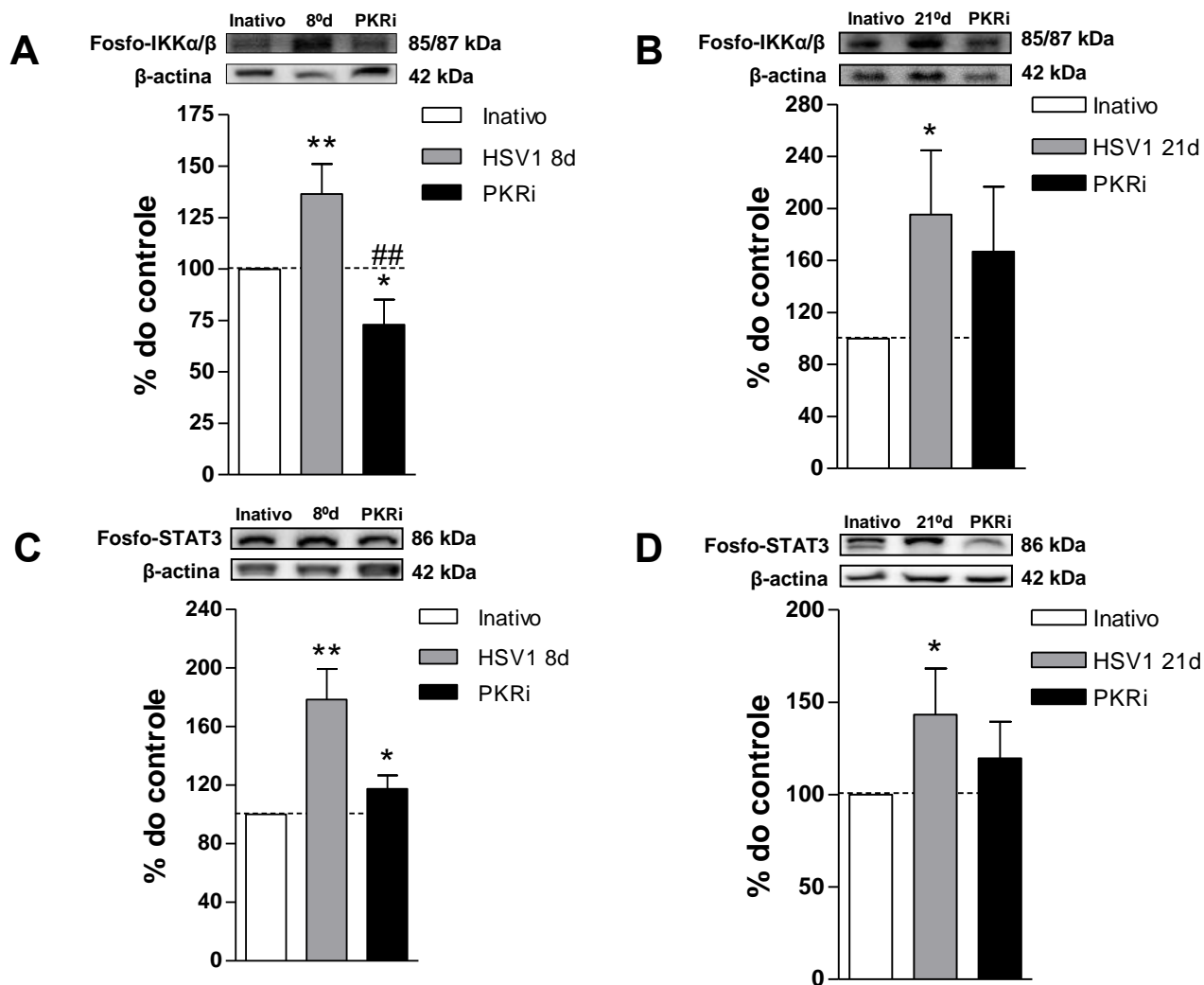


Figura 11. Perfis de fosforilação de (A e B) IKKα/β e (C e D) STAT3 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β-actina em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após a inoculação e HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após 15 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi. Resultados expressos em média ± E.P.M. (**p<0.01 e *p<0.05 em relação ao grupo inativo; ##p<0.01 em relação ao HSV1 ativo, utilizando teste *t* de Student não pareado, n=5-10/grupo).

4.7. A inibição farmacológica e a deleção genética de PKR previnem a hiperalgesia térmica induzida por infecção pelo HSV1 frente à ativação de receptores TRPV1

Como observado anteriormente, a dose de 0.2 mg/kg do PKRi apresentou efeito mais duradouro frente à dose de 0.005 mg/kg. Assim, foi realizado o pré-tratamento com 0.2 mg/kg de PKRi a fim de investigar as respostas comportamentais à ativação de receptores TRPV1 induzida pela capsaicina.

Nossos resultados demonstram que a reversão da hiperalgesia térmica pelo PKRi permanece mesmo após a administração de capsaicina em animais C57bl/6 e PKR^{+/+} nas fases herpética ($p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente) e pós-herpética ($p < 0.001$, para ambos), quando comparados aos grupos injetados com controle negativo e capsaicina (Fig. 12A, 12B, 12C e 12D). Animais PKR^{-/-} não apresentaram hiperalgesia térmica em nenhum dos momentos testados, mesmo após a injeção de capsaicina, em ambos os períodos herpético e pós-herpético (Fig. 12E e 12F).

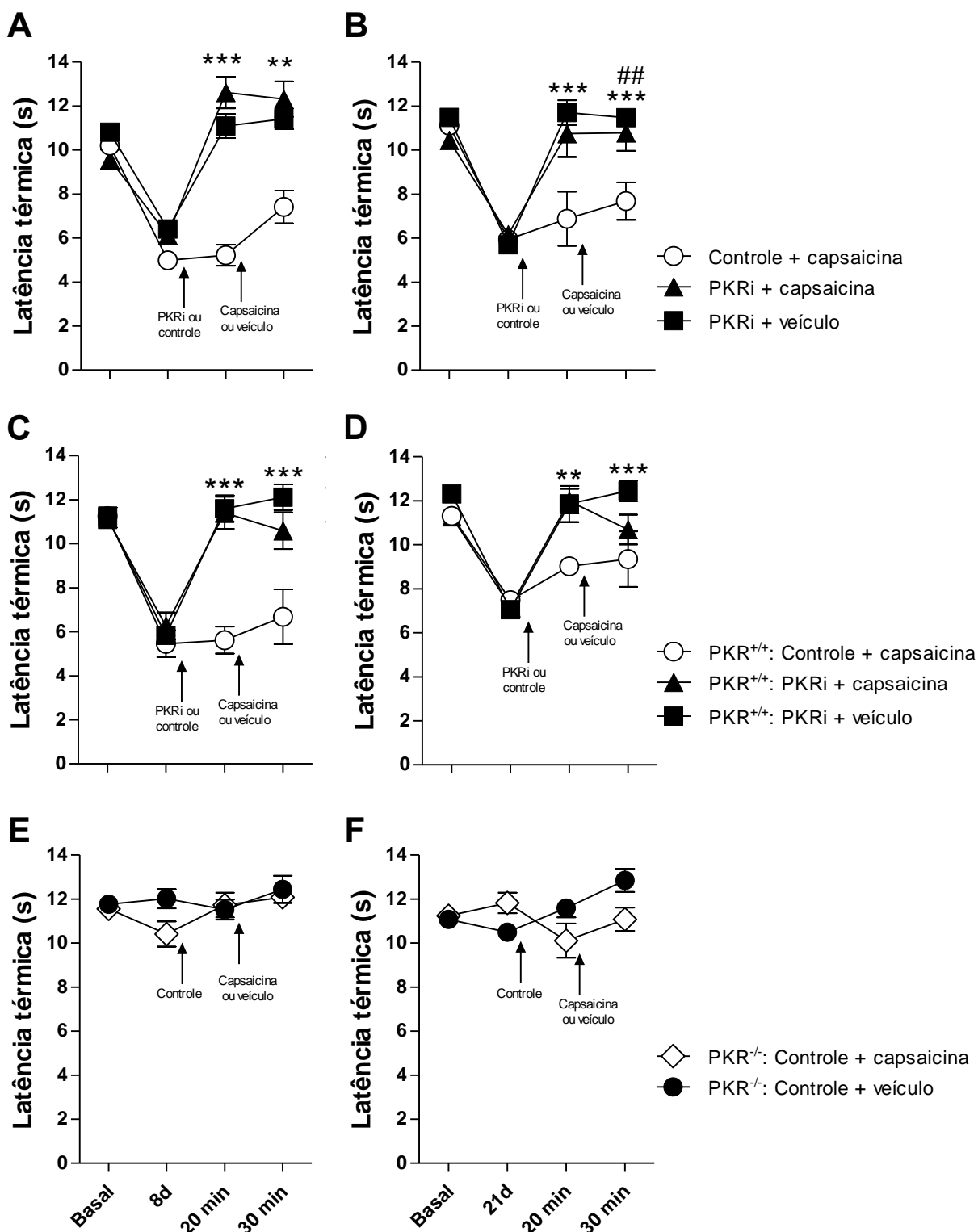


Figura 12. Latência térmica em animais (A e B) C57bl/6, (C e D) PKR^{+/+} e (E e F) PKR^{-/-} após 8 ou 21 dias a inoculação do HSV1 ativo, após 20 e 30 min à administração sistêmica de controle negativo ou 0.2 mg/kg do PKRi (PKRi), sendo que aos 30 min, passaram-se 10 min da injeção subcutânea no dorso da pata esquerda com capsaicina (10 µg) ou veículo. Resultados expressos em média ± E.P.M. (**p<0.01 e ***p<0.001 em relação ao grupo controle + capsaicina; ##p<0.01 quanto ao grupo PKRi + capsaicina em relação ao grupo controle + capsaicina utilizando ANOVA de duas vias e pós-testes de Bonferroni, n=6-13/grupo).

4.8. A inibição farmacológica reduz e a deleção genética de PKR inibe a resposta nocifensiva à ativação de receptores TRPV1 em animais inoculados com HSV1

Identificamos que o PKRi reduz, mas não significativamente, o comportamento nocifensivo à ativação de receptores TRPV1 pela capsaicina em animais C57bl/6, nos períodos herpético e pós-herpético.

Em contrapartida, o PKRi inibe tal comportamento nocifensivo em animais PKR^{+/+} nos períodos herpético ($p < 0.001$) e pós-herpético ($p < 0.001$), quando comparados ao grupo de animais PKR^{+/+} injetado com controle negativo e capsaicina (Fig. 13C e 13D).

Os grupos de animais PKR^{-/-} injetados com controle negativo e capsaicina apresentaram redução significativa do comportamento nocifensivo nos períodos herpético ($p < 0.001$) e pós-herpético ($p < 0.01$), quando comparados aos grupos de animais PKR^{+/+} injetados com controle negativo e capsaicina (Fig. 13C e 13D).

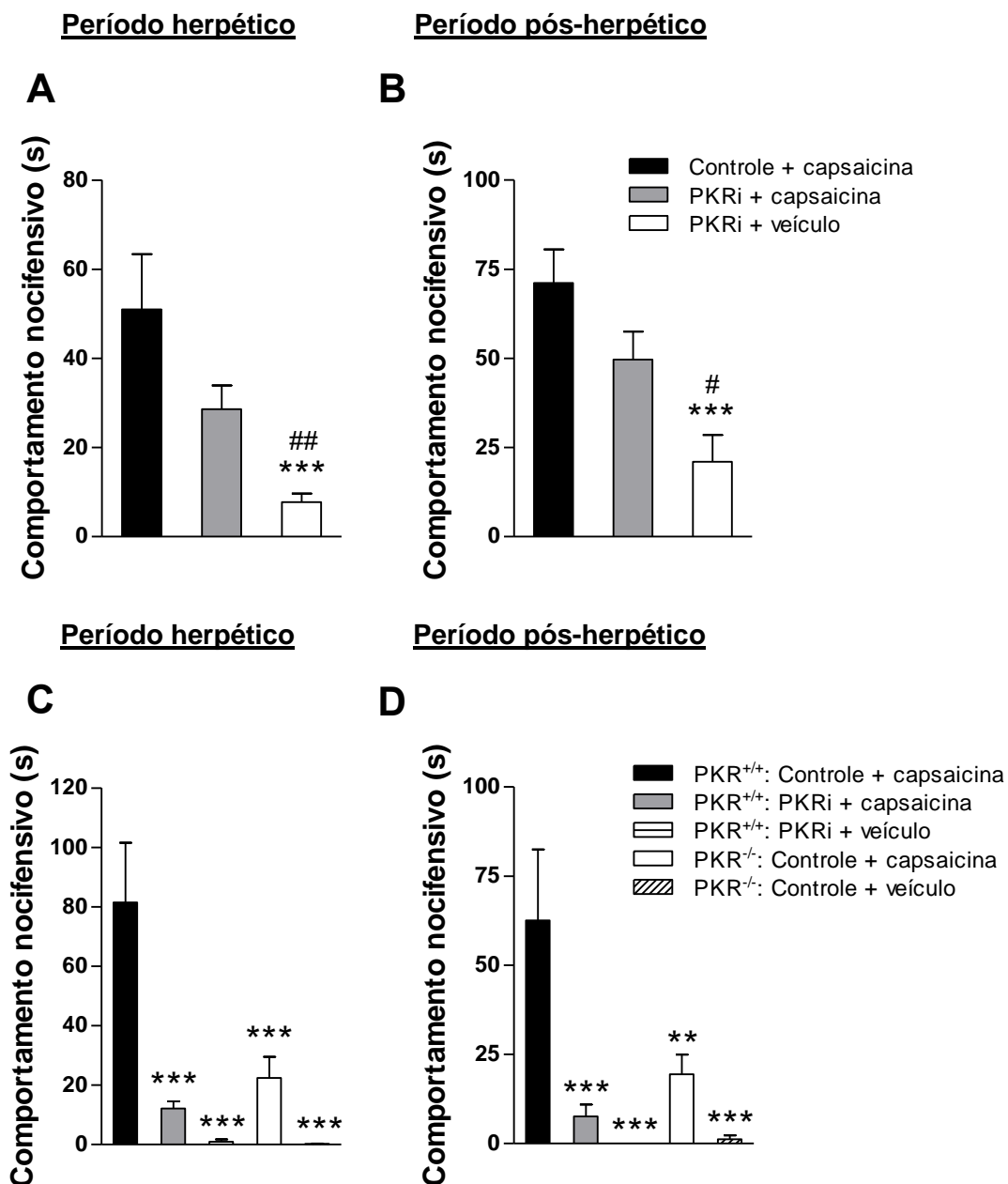


Figura 13. Resposta nocifensiva à capsaicina em animais (A e B) C57bl/6, (C e D) PKR^{+/+} e PKR^{-/-} após 8 ou 21 dias a inoculação do HSV1 ativo, submetidos à administração sistêmica de controle negativo ou 0.2 mg/kg do PKRi (PKRi) e, após 20 min, injetados via s.c. no dorso da pata esquerda com capsaicina (10 µg) ou veículo. Resultados expressos em média ± E.P.M. (**p<0.01; ***p<0.001 e **p<0.01; ##p<0.01 e #p<0.05 em relação ao grupo controle + capsaicina utilizando teste *t* de Student não pareado para A e B e ANOVA de uma via e pós-testes de Bonferroni para C e D; (n=6-13/grupo).

4.9. A inibição farmacológica sistêmica de PKR provoca o aumento da expressão de Ca-MKII α em GRD no período herpético, redução de Ca-MKII α e aumento de TRPV1 em GRD no período pós-herpético

O HSV1 *per se* não provocou alterações dos perfis de expressão de Ca-MKII α ou TRPV1. Entretanto, após a administração do PKRi, houve aumento da expressão de Ca-MKII no grupo HSV1 8 dias em relação ao grupo inativo no período herpético ($p < 0.05$) (Fig. 14A).

No período pós-herpético, observou-se que o PKRi provocou a redução da expressão de Ca-MKII α no grupo HSV1 21 dias em relação ao grupo inativo ($p < 0.05$) (Fig. 14B).

Na fase herpética, o PKRi não influenciou a expressão de TRPV1 (Fig. 14C). Por outro lado, os receptores TRPV1 apresentaram aumento de expressão após o PKRi no período pós-herpético tanto em relação ao grupo HSV1 21 dias ($p < 0.05$) quanto em comparação ao grupo inativo ($p < 0.001$) (Fig. 14D).

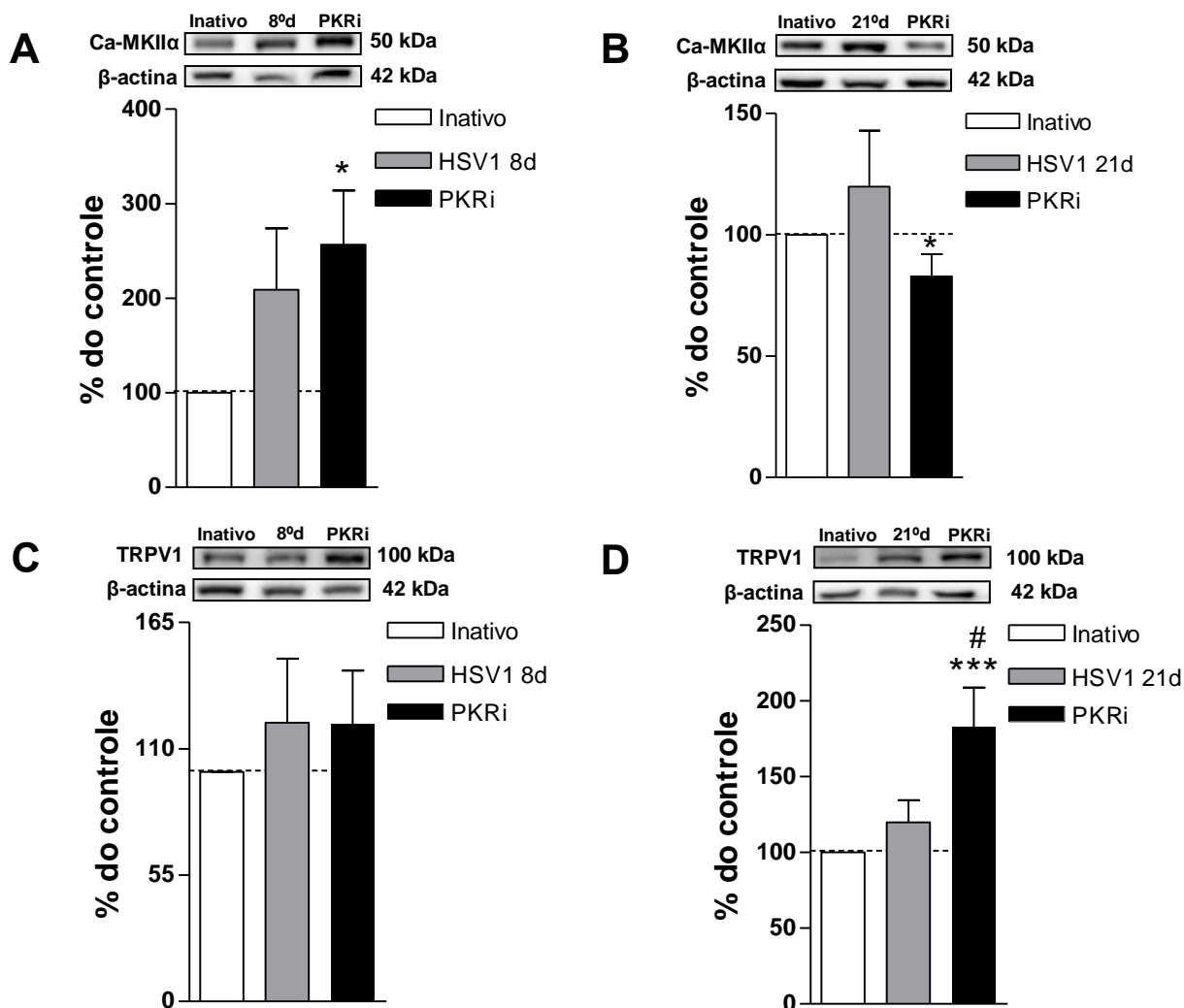


Figura 14. Perfis de expressão de (A e B) Ca-MKII α e (C e D) TRPV1 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em GRD (L3-L6) de animais C57bl/6 inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após a inoculação e HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após 15 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (** p <0.001 e * p <0.05 em relação ao grupo inativo; # p <0.05 em relação ao HSV1 ativo, utilizando teste *t* de Student não pareado, n =6-9/grupo).

Discussão

5. Discussão

No presente estudo, utilizamos abordagens comportamentais, genéticas, farmacológicas e moleculares que indicaram a importância da PKR como molécula sinalizadora, que modula diversas vias de sinalização intracelulares em GRD, e apresenta repercussão crítica na nocicepção térmica. Diante dos nossos resultados, sugerimos que a atividade de PKR é necessária para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica em um modelo de dor crônica, de origem inflamatória e de causa viral.

De acordo com estudos anteriores, o modelo experimental utilizado permite a reprodução de fenômenos que ocorrem durante os períodos herpético e pós-herpético (LOESER, 1986; TAKASAKI et al., 2000; SASAKI et al., 2008a; 2008b; INOMATA et al., 2013). Entende-se que, até o 8º dia, ocorrem sintomas que se assemelhariam ao período herpético (alodínia, hiperalgesia, lesões cutâneas) e que, neste momento, teriam transcorrido sete dias referentes à inoculação do vírus HSV1, entende-se que os efeitos observados no 8º dia de experimentação refletem os efeitos da infecção viral, e não de um processo inflamatório referente ao procedimento de inoculação. Já o período que melhor representaria as modificações funcionais das lesões neuropáticas provocadas pela infecção viral seria aquele período distante do momento de inoculação no qual ainda permanecessem os fenômenos de alodínia e hiperalgesia. Diante disso, os experimentos referentes ao período pós-herpético foram realizados no 21º dia após a inoculação do vírus HSV1.

A alodínia mecânica induzida por infecção pelo HSV1 em animais C57bl/6, PKR^{+/+} e PKR^{-/-} permaneceu desde o 8º até o 28º dia após a inoculação. O HSV1 também causou hiperalgesia térmica em animais C57bl/6 e PKR^{+/+}, a qual

permaneceu desde o 8^o até o 28^o dia após a inoculação. Entretanto, animais PKR^{-/-} não desenvolveram hiperalgesia térmica em nenhum momento investigado. O perfil comportamental distinto da linhagem de animais PKR^{-/-} é de extrema significância, pois demonstra, pela primeira vez, que a PKR exerce efeito funcional crítico no fenômeno de hiperalgesia térmica de origem inflamatória e infecciosa. Nossos resultados confirmam estudos anteriores, nos quais foram identificados alodínia e hiperalgesia mecânicas a partir do 5^o dia após a inoculação (TAKASAKI et al., 2000), se estendendo até o 24^o dia (INOMATA et al., 2013). Outro estudo identificou que a alodínia mecânica pode permanecer por 35 a 42 dias após a inoculação (SASAKI et al., 2008a).

O decurso temporal de ação do HSV1 é refletido no período herpético, o qual compreende o período iniciado no 5^o dia após a inoculação e apresenta alodínia, hiperalgesia, lesões zosteriformes, vesículas e erupções na pele no dermatomo cujo GRD e nervo foram afetados pelo vírus (TAKASAKI et al., 2000). Já o período pós-herpético é caracterizado pela cicatrização das lesões (SASAKI et al., 2008a; 2008b) e pela permanência da alodínia e da hiperalgesia (INOMATA et al., 2013; LOESER, 1986). Deste modo, nossos experimentos foram capazes de reproduzir tanto o período herpético como o pós-herpético.

O desenvolvimento de hiperalgesia térmica no modelo experimental que utiliza o HSV1 parece ser controverso. Enquanto nós identificamos claramente o desenvolvimento crônico de hiperalgesia térmica em duas linhagens distintas de animais, C57bl/6 e PKR^{+/+}, um estudo de Sasaki e colaboradores (2003) demonstrou que camundongos fêmeas BALB/C inoculados com HSV1 ativo desenvolveram alodínia mecânica na pata, mas não hiperalgesia térmica na cauda, no período herpético (SASAKI et al., 2003). Tal divergência pode estar relacionada a diferenças

de sexo, linhagens e teste experimental. Estudos demonstram que os hormônios estrogênicos podem apresentar efeito antinociceptivo e modular a resposta de hiperalgesia térmica induzida por inflamação, de maneira estímulo-dependente (LAWSON et al., 2010; OKUDA et al., 2011).

Considerando os períodos herpético e pós-herpético, utilizamos como parâmetros para análises moleculares o 8^o e o 21^o dias após a inoculação. Os animais utilizados para este fim passaram por triagem para confirmar a alodínia e, então, passaram pela eutanásia e extração de GRD de L3-L6, pois o HSV1 permanece latente no GRD do nervo que faz parte do dermatomo infectado (TAKASAKI et al., 2000).

Segundo nossa hipótese, a atividade do HSV1 no GRD pode provocar a fosforilação de PKR que, por sua vez, participa da hiperalgesia térmica. PKR é conhecida por sua atividade antiviral, inibindo a síntese proteica e assim prejudicando a replicação viral (GRANTIER; WILLIAMS, 2007). Por outro lado, o HSV1 pode ser capaz de induzir a síntese de proteínas que se ligam ao dsRNA e interagem com PKR, inibindo a sua ativação (MULVEY et al., 2003; KHOO, PEREZ, MOHR, 2002). Além desta via, o HSV1 pode inibir a fosforilação de PACT, o que inibe a fosforilação da PKR pela sinalização de estresse celular (PETERS et al., 2002). Todavia, esses estudos foram desenvolvidos *in vitro*, diferentemente do nosso estudo, o qual foi realizado através da indução de um modelo *in vivo*. Neste trabalho, observamos que o HSV1 provoca aumento tanto da expressão quanto da fosforilação de PKR em GRD em ambos os períodos herpético e pós-herpético. Deste modo, PKR parece participar de mecanismos crônicos da infecção viral.

Além de ser ativada pela atividade viral, a PKR pode ser fosforilada pela atividade de seu ativador endógeno, PACT (GOH, deVEER, WILLIAMS, 2000; WILLIAMS, 1999). A ativação de PACT ocorre diante de estresse celular, citocinas e metabólitos bacterianos (SINGH et al., 2011; WILLIAMS, 1999). Nossos resultados demonstram que houve aumento da expressão de PACT nos períodos herpético e pós-herpético. Enquanto isso, a fosforilação dessa proteína apresentou-se aumentada apenas no período pós-herpético. Isso indica que PACT pode ser uma das moléculas envolvidas na ativação de PKR nesse modelo experimental.

O mecanismo mais conhecido pelo qual a PKR exerce suas funções é através da fosforilação de eIF2 α , inibindo a síntese proteica e a replicação viral (SAMUEL, 1993; WILLIAMS, 2001). Neste trabalho, pôde-se observar o aumento da fosforilação do fator de transcrição eIF2 α em GRD tanto no período herpético como no período pós-herpético, indicando a atividade da via PKR/eIF2 α nesse modelo experimental, e inibindo a replicação viral. Dessa maneira, nós confirmamos outros estudos sugestivos de que a via PKR/eIF2 α está ativa em infecções virais (BALACHANDRAN et al., 2000; WILLIAMS, 1999; STARK et al., 1998; STOJDL et al., 2000). Por outro lado, um estudo do nosso laboratório demonstrou que o aumento da atividade de PKR no CDME não é acompanhado pelo aumento da atividade de eIF2 α , em um modelo de dor inflamatória induzida por CFA (KUSUDA, 2013). As diferenças de resultados devem estar pautadas nas diferenças entre os modelos experimentais. Diante disso, entende-se que PKR participa de diferentes vias de sinalização cujas atividades dependem dos estímulos aplicados.

A PKR também pode associar-se ao complexo IKK e estimular a ativação do NF κ B em situações de infecções virais ou bacterianas, citocinas e outras situações de estresse celular (GIL et al., 2001; GIL; ALCAMÍ; ESTEBAN, 2000; KANG; TANG,

2012; ZAMANIAN-DARYOUSH et al., 2000). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, a ponto que demonstramos o aumento da expressão de IKK β e da fosforilação de IKK α/β em GRD nos períodos herpético e pós-herpético. Outros dados do nosso laboratório demonstraram o aumento da fosforilação de IKK β no CDME de animais C57bl/6 3 dias após a injeção de CFA na pata, o qual foi inibido pela injeção intratecal do PKRi (KUSUDA et al., 2013). Diferentemente do que demonstramos com a via PKR/eIF2 α , a via PKR/IKK pode ser recrutada em condições inflamatórias viral e não viral. Além disso, demonstramos no presente estudo que a fosforilação de IKK α/β foi inibida pelo PKRi nos períodos herpético e pós-herpético, indicando que a atividade de NF- κ B pode estar aumentada devido à atividade de PKR.

A atividade de PKR sobre a modulação da síntese protéica e de outras atividades celulares também pode ocorrer através da ação de PKR sobre PP2A. PKR é capaz de fosforilar a subunidade B56 α de PP2A (XU; WILLIAMS, 2000) que, por sua vez, não somente modula atividades celulares como apoptose, autofagia e ciclo celular, como também pode modular a ativação de MAPK, NF- κ B e Ca-MK (CHENG et al., 2013; XU, WILLIAMS, 2000). Nossos resultados indicam o aumento da expressão de PP2A α nas fases herpética e pós-herpética, que pode ter ocorrido devido a ação de PKR.

Após as constatações do aumento da atividade de PKR e do perfil comportamental de animais PKR^{-/-} em relação à hiperalgesia térmica, ambos induzidos por infecção pelo HSV1, utilizamos uma abordagem farmacológica que identificou o efeito analgésico do PKRi administrado sistemicamente. A hiperalgesia térmica foi atenuada pelo PKRi de modo dose- e tempo-dependente, sendo que dose de 0.2 mg/kg apresentou efeito de maior magnitude e mais duradouro que a

dose de 0.005 mg/kg. Evidências da literatura demonstram que o PKRi, quando administrado por via i.p., ultrapassa a barreira hematoencefálica e promove aumento da excitabilidade neuronal e do armazenamento da memória em longo prazo em camundongos (INGRAND et al., 2007; ZHU et al., 2011). Assim, é possível que a administração sistêmica do PKRi promova a antinocicepção através de atividade tanto no sistema nervoso periférico como central.

Posteriormente, nossos resultados demonstraram claramente a influência do PKRi sobre os GRD infectados pelo HSV1 (L3-L6), estruturas sensoriais-chave no processo de transmissão da informação nociceptiva. O HSV1 provocou a redução da fosforilação de P38 e não alterou a fosforilação de JNK nem ERK1,2 no período herpético. Surpreendentemente, o PKRi provocou o aumento da fosforilação de P38 nos períodos herpético e pós-herpético. Este efeito pode estar relacionado a mecanismos complexos de sinalização intracelular. Mogensen e colaboradores (2004) demonstraram que o HSV1 é capaz de inibir a estabilidade do RNA mensageiro das células infectadas e suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias capazes de promover o combate à infecção (MOGENSEN et al., 2004), e um resultado da atividade das MAPK é a produção de citocinas, moléculas importantes na sinalização e promoção da resolução do processo inflamatório (BASBAUM et al., 2009). Tal atividade inibitória do HSV1 é capaz de diminuir a resposta do hospedeiro e permitir o estabelecimento da infecção viral (MOGENSEN et al., 2004).

O aumento da ativação de JNK e ERK1,2 no período pós-herpético, mas não no período herpético, reiteram que há fenômenos distintos mediando modelos de dor diferentes, neuropático e inflamatório, respectivamente. Ao ser estimulada, *in vitro*, por dsRNA, a PKR aumenta a atividade de ERK1,2 e JNK, mas não de P38

(IORDANOV et al., 2000). O LPS, antígeno bacteriano indutor de resposta inflamatória, induz a fosforilação de P38 e JNK dependente de PKR, *in vitro* (LI, XIONG, ZHANG, 2012). Além disso, JNK está envolvida na hiperalgesia térmica inflamatória induzida por NGF (DOYA et al., 2005). Outros estudos *in vitro* indicam que o papel de PKR na ativação de ERK1,2 ainda é obscuro. Por um lado, foi demonstrado que a fosforilação de ERK independente de PKR em macrófagos de camundongos PKR^{-/-} e PKR^{+/+} (MAGGI et al., 2003). Por outro lado, foi identificado que a fosforilação de ERK1,2 e P38 depende da ativação de PKR em monócitos infectados com HIV (LI et al., 2005). Desse modo, a ativação de JNK e ERK1,2 pela PKR pode ser um mecanismo pró-nociceptivo desencadeado pelo vírus no GRD no período pós-herpético e a inibição de PKR inibe a ação pró-nociceptiva dessas MAPK, promovendo analgesia.

Também no período pós-herpético, houve aumento da atividade de PLC γ 1, bem como demonstrado em estudos anteriores do nosso laboratório, que demonstraram essa expressão aumentada em CDME em um modelo de dor neuropática (ALMEIDA et al., 2015; KUSUDA et al., 2013). Nos modelos de neuralgia herpética e pós-herpética, identificamos o mesmo aumento de atividade, o qual foi inibido pelo PKRi. A literatura carece de estudos acerca da relação entre PKR e PLC γ 1. Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade de PLC está relacionada à regulação e ativação de alguns tipos de receptores TRP (HARDIE, 2007; MINKE, 2001; ZYGMUNT et al., 2013). Nossos achados indicam, então, que PKR pode agir também via PLC para provocar hiperalgesia térmica, além de PLC estar envolvida no desenvolvimento da alodínia mecânica e com a modulação do sistema imune diante de processo inflamatório (HOU et al., 2004; JOSEPH et al., 2007; SHI et al., 2008; MANJAVACHI et al., 2010).

Assim como o HSV1 provocou aumento da atividade de PLC γ 1, também houve aumento da atividade de Akt. Esse aumento pode ocorrer devido a atividade de interferons, os quais regulam múltiplas moléculas de sinalização, estando relacionado à ativação de processos apoptótico e neurotóxico (DEDONI, OLIANAS, ONALI, 2010). Além desses fatores, a atividade de Akt está relacionada com a hiperalgesia térmica inflamatória em neurônios sensoriais primários através da sensibilização de TRPV1 e contribui para o comportamento doloroso desencadeado pela capsaicina (ZHUANG et al., 2004; SUN, YAN, WILLIS, 2007). Nossos resultados demonstram a inibição da atividade de Akt pelo PKRi, sugerindo que essa proteína é acionada pela PKR, e poderia ser uma via pela qual se desenvolve a hiperalgesia térmica no modelo experimental estudado, entretanto mais estudos são necessários para investigar essa hipótese.

A ativação de STAT3 por PKR também pode ser um meio pelo qual a PKR promove a hiperalgesia térmica, pois estudos indicam que a inibição intratecal de STAT3 inibe a hiperalgesia térmica ao frio e ao calor em modelos de dor neuropática (DUBOVÝ et al., 2010; XUE et al., 2014). No presente estudo, o aumento da fosforilação de STAT3 foi revertido pelo PKRi nas fases herpética e pós-herpética. Nossos resultados confirmam estudos que inferem que a PKR interage fisicamente com STAT3, promovendo sua fosforilação e ativando-a, tanto em fibroblastos estimulados com fator de crescimento derivado de plaquetas como em células hepáticas infectadas com o vírus da hepatite C (DEB et al., 2001; YAN, CHEN, BRECHOT, 2010). Em um modelo de inflamação sistêmica por LPS, identificou-se que o aumento da ativação de STAT3 e a neuroinflamação no hipocampo dependem da ativação de PKR (CARRET-REBILLAT et al., 2015). Quando ativada, STAT3 se

transloca para o núcleo celular, no qual exerce sua função de ativação da transcrição gênica (DEB et al., 2001; YAN, CHEN, BRECHOT, 2010).

O comportamento nocifensivo frente ao desafio com a injeção de capsaicina demonstrou que PKR participa da nocicepção térmica provavelmente *downstream* à ativação de TRPV1. Nossos resultados demonstram que, nos períodos herpético e pós-herpético, animais C57bl/6 e PKR^{+/+} que receberam o PKRi sistemicamente apresentaram aumento da latência térmica, o qual não foi alterado pela injeção de capsaicina na pata. Animais PKR^{-/-} não apresentaram hiperalgesia térmica mesmo após a estimulação de receptores TRPV1 com capsaicina.

A resposta nocifensiva evocada pela capsaicina apresentou-se tendenciosamente menor em animais C57bl/6 injetados com PKRi e capsaicina em relação a animais C57bl/6 injetados com controle negativo e capsaicina. Em animais PKR^{+/+} injetados com PKRi e capsaicina, a resposta nocifensiva foi substancialmente reduzida em relação a animais PKR^{+/+} injetados com controle negativo e capsaicina. Portanto, a inibição de PKR é capaz de inibir a resposta nocifensiva provocada pela ativação de TRPV1, indicando mais uma vez a possibilidade de PKR ser um efetor *downstream* à ativação de receptores TRPV1.

A deleção genética de PKR confirmou o envolvimento da PKR na nocicepção térmica induzida pela ativação dos receptores TRPV1. Animais PKR^{-/-} injetados com controle negativo e capsaicina apresentaram fenótipo semelhante aos animais PKR^{+/+} que receberam PKRi e capsaicina. Desta maneira, supomos que a ativação de TRPV1 promove ativação de vias intracelulares que desencadeiam a fosforilação de PKR a qual promove ativação do sistema nociceptivo diante de estímulos

térmicos. A interação do ligante com o TRPV1 é mediada pela molécula de Ca-MKII (JUNG et al., 2004).

O HSV1 não provocou alterações basais na expressão de Ca-MKII α em GRD. Entretanto, a inibição de PKR promoveu efeitos opostos. Na fase herpética houve aumento e, na fase pós-herpética, houve redução da expressão de Ca-MKII α . Um estudo que utilizou a injeção intraplantar de capsaicina identificou o aumento da expressão e fosforilação de Ca-MKII α no CDME ipsilateral (FANG et al., 2002). Possivelmente, os mecanismos intracelulares que medeiam a nocicepção são diferentes no CDME e em gânglios sensoriais. Nossos resultados divergem dos resultados de Fang e colaboradores (2002), mas convergem com os resultados de Price e colaboradores (2005), que demonstraram o aumento da fosforilação de Ca-MKII, mas não de sua forma total, em neurônios de gânglios trigeminiais após estímulo com capsaicina (PRICE et al., 2005).

A inibição intratecal de Ca-MKII previne ambos alodínia mecânica e hiperalgesia térmica em modelos experimentais de lesão neuropática, apresentando-se como uma molécula pró-nociceptiva (DAI et al., 2005; OGAWA et al., 2005) e 24 horas após injeção intraplantar com CFA (LUO et al., 2008a). A inibição farmacológica da atividade de Ca-MKII α resultou em prevenção parcial da fosforilação de receptores glutamatérgicos no CDME, demonstrando que esta proteína é importante na modulação da sensibilização central (FANG et al., 2002).

O aumento persistente da atividade de Ca-MKII pode resultar no aumento da sensibilidade térmica através da ativação de receptores TRPV1 em fibras C polimodais de neurônios aferentes primários (SZALLASI et al., 1999; TOMINAGA et al., 1998). Estudos demonstraram a co-localização entre Ca-MKII e TRPV1 em

neurônios de gânglios trigeminais após estímulo com capsaicina (PRICE et al., 2005), bem como em neurônios de GRD estimulados com calor, pH baixo e capsaicina (CARLTON, HARGETT, 2002).

Nós demonstramos que o perfil de expressão de receptores TRPV1 nos períodos herpético e pós-herpético não é alterado no contexto experimental utilizado. Interessantemente, o PKRi provocou o aumento da expressão desses receptores no período pós-herpético. A literatura não apresenta estudos acerca da relação entre a ativação de receptores TRPV1 e a PKR, mas indica que animais infectados com o vírus da varicela zoster apresentam aumento da expressão de RNA mensageiro de TRPV1 em GRD de ratos, no período pós-herpético (GUEDON et al., 2015).

Outro estudo demonstrou a eficácia do uso de antagonistas de receptores TRPV1 no tratamento da dor crônica refratária ao tratamento com anti-inflamatórios não-esteroidais em modelos experimentais de artrite e neuralgia pós-herpética (KITAGAWA et al., 2013). Lembrando que a ativação de receptores TRPV1 está intimamente relacionada ao desenvolvimento da hiperalgesia térmica em condições de origem inflamatória, e que o perfil comportamental de animais TRPV1^{-/-} (CATERINA et al., 1997; 2000) apresenta-se idêntico ao perfil comportamental dos animais PKR^{-/-} estudados no nosso laboratório, sugerimos a existência de uma nova e promissora relação entre TRPV1 e PKR no desenvolvimento da hiperalgesia térmica em modelos de dor com origem inflamatória.

Conclusões

6. Conclusões

- A deleção genética de PKR previne o desenvolvimento de hiperalgesia térmica nos períodos herpético e pós-herpético.
- A inibição de PKR apresenta efeito analgésico sobre a hiperalgesia térmica nos períodos herpético e pós-herpético em efeito dose- e tempo-dependente.
- A infecção pelo vírus HSV1 altera a maquinaria intracelular modificando o perfil de expressão e atividade de diversas proteínas, entre elas PKR e eIF2 α .
- PKR utiliza mecanismos distintos de atuação no ambiente intracelular nos períodos herpético, no qual existe componente inflamatório, e pós-herpético, no qual há um quadro neuropático.
- Tanto a inibição farmacológica como a deleção genética da PKR preveniram a resposta nocifensiva e a hiperalgesia térmica induzidas pela ativação de receptores TRPV1.
- De acordo com os resultados obtidos, pode-se indicar que PKR apresenta papel crucial no desenvolvimento da hiperalgesia térmica no modelo experimental de neuralgia herpética e pós-herpética.

Referências

ALBERTS, A. S.; DENG, T.; LIN, A.; MEINKOTH, J. L.; SCHONTHAL, A.; MUMBY, M. C.; KARIN, M.; FERAMISCO, J. R. Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1-binding elements. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 4, p. 2104-2112, 1993.

ALISI, A.; SPAZIANI, A.; ANTICOLI, S.; GHIDINELLI, M.; BALSANO, C. PKR is a novel functional direct player that coordinates skeletal muscle differentiation via p38MAPK/AKT pathways. **Cell Signaling**, v. 20, n. 3, p. 534-542, 2008.

ALMEIDA, C.; DEMAMAN, A.; KUSUDA, R.; CADETTI, F.; RAVANELLI, M. I.; QUEIROZ, A. L.; SOUSA, T. A.; ZANON, S.; SILVEIRA, L. R.; LUCAS, G. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. **Pain**, v. 156, p. 504-513, 2015.

American Academy of Neurology. AAN Evidence-based guideline summary for clinicians: treatment of postherpetic neuralgia. Disponível em: <www.aan.com/professionals/practice/pdfs/pn_guideline_physicians.pdf>. Acesso em: 10 de Setembro de 2014.

ANDERSON, N. G.; MALLER, J. L.; TONKS, N. K.; STURGILL, T. W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. **Nature**, v. 343, n. 6259, p. 651-653, 1990.

ARGOFF, C. E.; KATZ, N.; BACKONJA, M. Treatment of postherpetic neuralgia: a review of therapeutic options. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 28, n. 4, p. 396-411, 2004.

ARTHUR, J. S. C.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 9, p. 679-692, 2013.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; NURMIKKO, T. European Federation of Neurological Sciences guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 9, p. 1113-1123, 2010.

BALACHANDRAN, S.; ROBERTS, P. C.; BROWN, L. E.; TRUONG, H.; PATTNAIK, A. K.; ARCHER, D. R.; BARBER, G. N. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. **Immunity**, v. 13, n. 1, p. 129-141, 2000.

BARNES, G. N.; SLEVIN, J. T.; VANAMAN, T. C. Rat brain protein phosphatase 2A: An enzyme that may regulate autophosphorylated protein kinases. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 1, p. 340-353, 1995.

BARRIA, A.; MALINOW, R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. **Neuron**, 48, n. 2, p. 289-301, 2005.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BENEDETTI, M.; MERINO, R.; KUSUDA, R.; RAVANELLI, M. I.; CADETTI, F.; DOS SANTOS, P.; ZANON, S.; LUCAS, G. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. **European Journal of Pain**, v. 16, n. 6, p. 803-815, 2012.

BENNETT, G. J. **Neuropathic pain**: an overview. In: BORSOOK, D. ed. *Molecular neurobiology of pain*. Seattle: IASP Press, p. 109-113, 1997.

BONNET, M. C.; WEIL, R.; DAM, E.; HOVANESSIAN, A. G.; MEURS, E. F. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkkappaB kinase complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4532-4542, 2000.

BOWSHER, D. The lifetime occurrence of herpes zoster and prevalence of postherpetic neuralgia: a retrospective survey in an elderly population. **European Journal of Pain**, v. 3, n. 4, p. 335-342, 1999.

BREUER, J.; WHITLEY, R. Varicella zoster virus: natural history and current therapies of varicella and herpes zoster. **Herpes**, Suppl 2, p. 25-29. 2007.

BRON, R.; KLESSE, L. J.; SHAH, K.; PARADA, L. F.; WINTER, J. Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 118-132, 2003.

CAPPUZZO, K. A. Treatment of postherpetic neuralgia: focus on pregabalin. **Clinical Interventions in Aging**, v. 4, p. 17-23, 2009.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L. Stereological analysis of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II alpha -containing dorsal root ganglion neurons in the rat: colocalization with isolectin Griffonia simplicifolia, calcitonin gene-related peptide, or vanilloid receptor 1. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 448, n. 1, p. 102-110, 2002.

CARRET-REBILLAT, A. S.; PACE, C.; GOURMAUD, S.; RAVASI, L.; MONTAGNE-STORA, S.; LONGUEVILLE, S.; TIBLE, M.; SUDOL, E.; CHANG, R. C.; PAQUET, C.; MOUTON-LIGER, F.; HUGON, J. Neuroinflammation and A β accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8489-8497, 2015.

CASSADY, K. A.; GROSS, M. The Herpes Simplex Virus Type 1 US11 Protein Interacts with Protein Kinase R in Infected Cells and Requires a 30-Amino-Acid Sequence Adjacent to a Kinase Substrate Domain. **Journal of Virology**, v. 76, n. 5, p. 2029-2035, 2002.

CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHAKRABARTI, A.; SADLER, A. J.; KAR, N.; YOUNG, H. A.; SILVERMAN, R. H.; WILLIAMS, B. R. Protein kinase R-dependent regulation of interleukin-10 in response to double-stranded RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 37, p. 25132-25139, 2008.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHEN, H. M.; WANG, L.; D'MELLO, S. R. A chemical compound commonly used to inhibit PKR, {8-(imidazol-4-ylmethylene)-6H-azolidino[5,4-g] benzothiazol-7-one}, protects neurons by inhibiting cyclin-dependent kinase. **The European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2003-2016, 2008.

CHEN, S. S.; JIANG, T.; WANG, Y.; GU, L. Z.; WU, H. W.; TAN, L.; GUO, J. Activation of double-stranded RNA-dependent protein kinase inhibits proliferation of pancreatic β -cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 814-820, 2014.

CHENG, X.; BENNETT, R. L.; LIU, X.; BYRNE, M.; MAY, W. S. PKR negatively regulates leukemia progression in association with PP2A activation, Bcl-2 inhibition and increased apoptosis. **Blood Cancer Journal**, v. 3, p. e144-e154, 2013.

COEN, P. G.; SCOTT, F.; LEEDHAM-GREEN, M.; NIA, T.; JAMIL, A.; JOHNSON, R. W.; BREUER, J. Predicting and preventing post-herpetic neuralgia: are current risk factors useful in clinical practice? **European Journal of Pain**, v. 10, n. 8, p. 695-700, 2006.

CUI, X. Y.; DAI, Y.; WANG, S. L.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CHEN, J.; NOGUCHI, K. Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. **Molecular Pain**, v. 4, p. 17-28. doi: 10.1186/1744-8069-4-17, 2008.

DAHER, A.; LARAKI, G.; SINGH, M.; MELENDEZ-PEÑA, C. E.; BANNWARTH, S.; PETERS, A. H.; MEURS, E. F.; BRAUN, R. E.; PATEL, R. C.; GATIGNOL, A. TRBP Control of PACT-Induced Phosphorylation of Protein Kinase R Is Reversed by Stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 1, p. 254-265, 2009.

DAI, Y.; IWATA, K.; FUKUOKA, T.; KONDO, E.; TOKUNAGA, A.; YAMANAKA, H.; TACHIBANA, T.; LIU, Y.; NOGUCHI, K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7737-7745, 2002.

DAI, Y.; WANG, H.; OGAWA, A.; YAMANAKA, H.; OBATA, K.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2467-2474, 2005.

DAVIES, L.; COSSINS, L.; BOWSHER, D.; Drummond, M. The cost of treatment for post-herpetic neuralgia in the UK. **Pharmacoeconomics**, v. 1, n. 2, p. 142-148, 1994.

DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M. J.; HATCHER, J. P.; DAVEY, P. T.; OVEREND, P.; HARRIES, M. H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, A. S.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A. J.; PUGH, P. L.; ROGERS, D. C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183-187, 2000.

DEB, A.; ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; XU, Z.; KADEREIT, S.; WILLIAMS, B. R. G. Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signaling of c-fos gene expression via Erks and Stat3. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 10, p. 2487-2496, 2001.

DEDONI, S.; OLIANAS, M. C.; ONALI, P. Interferon- β induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 6, p. 1421-1433, 2010.

DELANEY, A.; COLVIN, L. A.; FALLON, M. T.; DALZIEL, R. G.; MITCHELL, R.; FLEETWOOD-WALKER, S. M. Postherpetic neuralgia: From preclinical models to the clinic. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 630-637, 2009.

DENG, X.; ITO, T.; CARR, B.; MUMBY, M.; MAY, W. S. Jr. Reversible phosphorylation of bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, p. 34157-34163, 1998.

DiDONATO, J. A.; HAYAKAWA, M.; ROTHWARF, D. M.; ZANDI, E.; KARIN, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 548-554, 1997.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 441-462, 1980.

DOYA, H.; OHTORI, S.; FUJITANI, M.; SAITO, T.; HATA, K.; INO, H.; TAKAHASHI, K.; MORIYA, H.; YAMASHITA, T. c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, n. 1, p. 132-138, 2005.

DOZA, Y. N.; CUENDA, A.; THOMAS, G. M.; COHEN, P.; NEBREDA, A. R. Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. **FEBS Letters**, v. 364, n. 2, p. 223-228, 1995.

DROLET, M.; BRISSON, M.; LEVIN, M. J.; SCHMADER, K. E.; OXMAN, M. N.; JOHNSON, R. W.; CAMDEN, S.; MANSI, J. A. A prospective study of the herpes zoster severity of illness. **The Clinical Journal of Pain**, v. 26, n. 8, p. 656-666, 2010.

DUBINSKY, R. M.; KABBANI, H.; EL-CHAMI, Z.; BOUTWELL, C.; ALI, H. An evidence based report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 63, p. 959-965, 2004.

DUBOVÝ, P.; KLUSÁKOVÁ, I.; SVÍZENSKÁ, I.; BRÁZDA, V. Satellite glial cells express IL-6 and corresponding signal-transducing receptors in the dorsal root

ganglia of rat neuropathic pain model. **Neuron Glia Biology**, v. 6, n. 1, p. 73-83, 2010.

DWORKIN, R. H.; JOHNSON, R. W.; BREUER, J.; GNANN, J. W.; LEVIN, M. J.; BACKONJA, M.; BETTS, R. F.; GERSHON, A. A.; HAANPAA, M. L.; MCKENDRICK, M. W.; NURMIKKO, T. J.; OAKLANDER, A. L.; OXMAN, M. N.; PAVAN-LANGSTON, D.; PETERSEN, K. L.; ROWBOTHAM, M. C.; SCHMADER, K. E.; STACEY, B. R.; TYRING, S. K.; van WIJCK, A. J.; WALLACE, M. S.; WASSILEW, S. W.; WHITLEY, R. J. Recommendations for the management of herpes zoster. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, Supl. 1, p. S1-S26, 2007.

DWORKIN, R. H.; O'CONNOR, A. B.; AUDETTE, J.; BARON, R.; GOURLAY, G. K.; HAANPÄÄ, M. L.; KENT, J. L.; KRANE, E. J.; LABEL, A. A.; LEVY, R. M.; MACKEY, S. C.; MAYER, J.; MIASKOWSKI, C.; RAJA, S. N.; RICE, A. S.; SCHMADER, K. E.; STACEY, B.; STANOS, S.; TREEDE, R. D.; TURK, D. C.; WALCO, G. A.; WELLS, C. D. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, (suppl):S3-S14, 2010.

DWORKIN, R. H.; PORTENOY, R. K. Pain and its persistence in herpes zoster. **Pain**, v. 67, n. 2-3, p. 241-251, 1996.

FANG, L.; WU, J.; LIN, Q.; WILLIS, W. D. Calcium–Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Spinal Cord Central Sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 4196-4204, 2002.

FISCHER, T. Z.; WAXMAN, S. G. Neuropathic pain in diabetes-evidence for a central mechanism. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 8, p. 462-466, 2010.

FORBES, H.; THOMAS, S.; LANGAN, S. The Epidemiology and Prevention of Herpes Zoster. **Current Dermatology Reports**, v.1, n. 1, p. 39-47, 2012.

GARCIA, A.; CAYLA, X.; SONTAG, E. Protein phosphatase 2A: a definite player in viral and parasitic regulation. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 4, p. 401-407, 2000.

GARCIA, M. A.; GIL, J.; VENTOSO, I.; GUERRA, S.; DOMINGO, E.; RIVAS, C.; ESTEBAN, M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 4, p. 1032-1060, 2006.

GARCIA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 879-882, 2006.

GAUTHIER, A.; BREUER, J.; CARRINGTON, D.; MARTIN, M.; RÉMY, V. Epidemiology and cost of herpes zoster and post-herpetic neuralgia in the United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 1, p. 38-47, 2009.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GIL, J.; ALCAMÍ, J.; ESTEBAN, M. Activation of NF- κ B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I κ B kinase complex. **Oncogene**, v. 19, n. 11, p. 1369-1378, 2000.

GIL, J.; GARCIA, M. A.; GOMEZ-PUERTAS, P.; GUERRA, S.; RULLAS, J.; NAKANO, H.; ALCAMÍ, J.; ESTEBAN, M. TRAF family proteins link PKR with NF- κ B activation. **Molecular and Cell Biology**, v. 24, n. 10, p. 4502-4512, 2004.

GILCHRIST, H. D.; ALLARD, B. L.; SIMONE, D. A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, v. 67, n. 1, p. 179-188, 1996.

GOEDERT, M.; COHEN, E. S.; JAKES, R.; COHEN, P. p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease. **FEBS Letters**, v. 312, n. 1, p. 95-99, 1992.

GOH, K. C.; deVEER, M. J.; WILLIAMS, B. R. G. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. **The EMBO Journal**, v.19, n.16, p.4292-4297, 2000.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248-1257, 2010.

GRANTIER, M. P.; WILLIAMS, B. R. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 5-6, p. 363-371, 2007.

GUEDON, J. G.; YEE, M. B.; ZHANG, M.; HARVEY, S. A. K.; GOINS, W. F.; KINCHINGTON, P. R. Neuronal changes induced by Varicella Zoster Virus in a rat model of postherpetic neuralgia. **Virology**, v. 482, p. 167-180, 2015.

HAO, S.; MATA, M.; GLORIOSO, J. C.; FINK, D. J. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 2, p. 6-15, 2006.

HARDIE, R. C. TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 1, p. 9-24, 2007.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.

HEMPENSTALL, K.; NURMIKKO, T. J.; JOHNSON, R. W.; A'HERN, R. P.; RICE, A. S. C. Analgesic therapy in postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. **PLOS Medicine**, v. 2, e164, 2005.

HOLZER, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1145-1162, 2008.

HOU, C.; KIRCHNER, T.; SINGER, M.; MATHEIS, M.; ARGENTIERI, D.; CAVENDER, D. In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 2, p. 697-704, 2004.

HU, Y.; CONWAY, T. W. 2-Aminopurine inhibits the double-stranded RNA-dependent protein kinase both in vitro and in vivo. **Journal of Interferon Research**, v. 13, n. 5, p. 323-328, 1993.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.

INGRAND, S.; BARRIER, L.; LAFAY-CHEBASSIER, C.; FAUCONNEAU, B.; PAGE, G.; HUGON, J. The oxindole/imidazole derivative C16 reduces in vivo brain PKR activation. **FEBS Letters**, v. 581, n. 23, p. 4473-4478, 2007.

INOMATA, Y.; GOUDA, M.; KAGAYA, K.; YAMAGAMI, K.; SASAKI, A.; ANDOH, T.; KURAIISHI, Y. Association of denervation severity in the dermis with the development of mechanical allodynia and hyperalgesia in a murine model of postherpetic neuralgia. **Anesthesia and Analgesia**, v. 116, n. 3, p. 722-729, 2013.

IORDANOV, M. S.; PARANJAPE, J. M.; ZHOU, A.; WONG, J.; WILLIAMS, B. R. G.; MEURS, E. F.; SILVERMAN, R. H.; MAGUN, B. E. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun NH₂-Terminal Kinase by Double-Stranded RNA and Encephalomyocarditis Virus: Involvement of RNase L, Protein Kinase R, and Alternative Pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 2, p. 617-627, 2000.

JAMMI, N. V.; WHITBY, L. R.; BEAL, P. A. Small molecule inhibitors of the RNA-dependent protein kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 1, p. 50-57, 2003.

JEONG, Y. C.; SON, J. S.; KWON, Y. B. The spinal antinociceptive mechanism determined by systemic administration of BD1047 in zymosan-induced hyperalgesia in rats. **Brain Research Bulletin**, [in press], 2015.

JI, R. R.; BEFORT, K.; BRENNER, G. J.; WOOLF, C. J. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 478-485, 2002b.

JI, R. R.; GEREAU, R. W. 4th; MALCANGIO, M.; STRICHARTZ, G. R. MAP kinase and pain. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 135-148, 2009.

JI, R. R.; SAMAD, T. A.; JIN, S. X.; SCHMOLL, R.; WOOLF, C. J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2002a.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533-548, 2014.

JIN, S. X.; ZHUANG, Z. Y.; WOOLF, C. J.; JI, R. R. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4017-4022, 2003.

JOHNSON, R. W.; BOUHASSIRA, D.; KASSIANOS, G.; LEPLEGE, A.; SCHMADER, K. E.; WEINKE, T. The impact of herpes zoster and post-herpetic neuralgia on quality-of-life. **BMC Medicine**, v. 8, p. 37-49, 2010.

JOHNSON, R. W.; MCELHANEY, J. Postherpetic neuralgia in the elderly. **International Journal of Clinical Practice**, v. 63, n. 9, p. 1386-1391, 2009.

JOSEPH, E. K.; BOGEN, O.; ALESSANDRI-HABER, N.; LEVINE, J. D. PLC-beta 3 signals upstream of PKC epsilon in acute and chronic inflammatory hyperalgesia. **Pain**, v. 132, n. 1-2, p. 67-73, 2007.

JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 355-384, 2013.

JUNG, J.; SHIN, J. S.; LEE, S. Y.; HWANG, S. W.; KOO, J.; CHO, H.; OH, U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7048-7054, 2004.

KANG, R.; TANG, D. PKR-dependent inflammatory signals. **Science signaling**, v. 5, n. 247, p. 47-52, 2012.

KARPOVA, A.; SANNA, P. P.; BEHNISCH, T. Involvement of multiple phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways in the persistence of late-phase long term potentiation expression. **Neuroscience**, v. 137, n. 3, p. 833-841, 2006.

KATZ, J.; COOPER, E. M.; WALTHER, R. R.; SWEENEY, E. W.; DWORKIN, R. H. Acute pain in herpes zoster and its impact on health-related quality of life. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 342-348, 2004.

KAZEMI, S.; MOUNIR, Z.; BALZIS, D.; RAVEN, J. F.; WANG, S.; KRISHNAMOORTHY, J. L.; PLUQUET, O.; PELLETIER, J.; KOROMILAS, A. E. A novel function of eIF2alpha kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3635-3644, 2007.

KHOO, D.; PEREZ, C.; MOHR, I. Characterization of RNA determinants recognized by the arginine- and proline-rich region of Us11, a herpes simplex virus type 1-encoded double-stranded RNA binding protein that prevents PKR activation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 11971-11981, 2002.

KIM, C.; SANO, Y.; TODOROVA, K.; CARLSON, B. A.; ARPA, L.; CELADA, A.; LAWRENCE, T.; OTSU, K.; BRISSETTE, J. L.; ARTHUR, J. S.; PARK, J. M. The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1019-1027, 2008.

KINCHINGTON, P. R.; GOINS, W. F. Varicella zoster virus-induced pain and post-herpetic neuralgia in the human host and in rodent animal models. **Journal of Neurovirology**, v. 17, n. 6, p. 590-599, 2011.

KIRKEGAARD, K.; TAYLOR, M. P.; JACKSON, W. T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 301-314, 2004.

KITAGAWA, Y.; TAMAI, I.; HAMADA, Y.; USUI, K.; WADA, M.; SAKATA, M.; MATSUSHITA, M. Orally administered selective TRPV1 antagonist, JTS-653, attenuates chronic pain refractory to non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats and mice including post-herpetic pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 128-137, 2013.

KOST, R. G.; STRAUS, S. E. Postherpetic neuralgia: pathogenesis, treatment, and prevention. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 1, p. 32-42, 1996.

KOTANI, N.; KUSHIKATA, T.; HASHIMOTO, H.; KIMURA, F.; MURAOKA, M.; YODONO, M.; ASAI, M.; MATSUKI, A. Intrathecal methylprednisolone for intractable postherpetic neuralgia. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 21, p. 1514-1519, 2000.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.

KUSUDA, R. **Ação da proteína-quinase ativada por RNA na neurobiologia da dor crônica**. 2013. 65 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2013.

KUSUDA, R.; RAVANELLI, M. I.; CADETTI, F.; FRANCIOSI, A.; PREVIDELLI, K.; ZANON, S.; LUCAS, G. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 10, p. 1162-1172, 2013. Long-term antidepressant treatment inhibits neuropathic pain-induced CREB and PLC γ -1 phosphorylation in the mouse spinal cord dorsal horn.

KWON, S. G.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; MOON, J. Y.; CHOI, S. R.; CHOI, H. S.; KANG, S. Y.; HAN, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Blockade of peripheral P2Y1 receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in GRDs. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 368-379, 2014.

LABIB, K.; NURSE, P. Bring on the phosphatases. **Current Biology**, v. 3, n. 3, p. 164-166, 1993.

LAWSON, K. P.; NAG, S.; THOMPSON, A. D.; MOKHA, S. S. Sex-specificity and estrogen-dependence of kappa opioid receptor-mediated antinociception and antihyperalgesia. **Pain**, v. 151, n. 3, p. 806-815, 2010.

LEE, S. B.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M. The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. **Virology**, v. 231, n. 1, p. 81-88, 1997.

LEE, T. H.; SOLOMON, M. J.; MUMBY, M. C.; KIRSCHNER, M. W. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 415-423, 1991.

LI, J. C.; LEE, D. C.; CHEUNG, B. K.; LAU, A. S. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. **FEBS Letters**, v. 579, n. 14, p. 3055-3062, 2005.

LI, S.; XIONG, C.; ZHANG, J. ATX and LPA receptor 3 are coordinately up-regulated in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells through PKR and SPK1-mediated pathways. **FEBS Letters**, v. 586, n. 6, p. 792-797, 2012.

LIANG, L.; FAN, L.; TAO, B.; YASTER, M.; TAO, Y. X. Protein kinase B/Akt is required for complete Freund's adjuvant-induced upregulation of Nav1.7 and Nav1.8 in primary sensory neurons. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 6, p. 638-647, 2013.

LOESER, J. D. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. **Pain**, v. 25, n. 2, p.149-164, 1986.

LUO, F.; YANG, C.; CHEN, Y.; SHUKLA, P.; TANG, L.; WANG, L. X.; WANG, Z. J. Reversal of Chronic Inflammatory Pain by Acute Inhibition of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 1, p. 267-275, 2008a.

LUO, H.; XU, I. S.; CHEN, Y.; YANG, F.; YU, L.; LI, G. X.; LIU, F. Y.; XING, G. G.; SHI, Y. S.; LI, T.; HAN, J. S.; WAN, Y. Behavioral and electrophysiological evidence for the differential functions of TRPV1 at early and late stages of chronic inflammatory nociception in rats. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p. 2151-2158, 2008b.

LUSSIGNOL, M.; QUEVAL, C.; BERNET-CAMARD, M. F.; COTTE-LAFFITTE, J.; BEAU, I.; CODOGNO, P.; ESCLATINE, A. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. **Journal of Virology**, v. 87, n. 2, p. 859-871, 2013.

MAGGI, L. B. JR.; MORAN, J. M.; BULLER, R. M.; CORBETT, J. A. ERK activation is required for double-stranded RNA- and virus-induced interleukin-1 expression by macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 16683-16689, 2003.

MANJAVACHI, M. N.; MOTTA, E. M.; MAROTTA, D. M.; LEITE, D. F.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345-355, 2010.

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

MARKUS, A.; ZHONG, J.; SNIDER, W. D. Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. **Neuron**, v. 35, n. 1, p. 65-76, 2002.

McLEAN, T. I.; BACHENHEIMER, S. L. Activation of cJUN N-Terminal Kinase by Herpes Simplex Virus Type 1 Enhances Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8415-8426, 1999.

MERSKEY, H.; ALBE-FESSARD, D.; BONICA, J. J.; CARMON, A.; DUBNER, R.; KERR, F. W. L.; LINDBLOM, U.; MUMFORD, J. M.; NATHAN, P. W.; NOORDENBOS, W.; PAGNI, C. A.; RENAER, M. J.; STERNBACH, R. A.; SUNDERLAND, S. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 249-252, 1979.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**. In: MERSKEY, H.; BOGDUK, N. (editors). Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. IASP task force on taxonomy. Seattle: IASP Press; p. 209-214, 1994.

MILLWARD, T. A.; ZOLNIEROWICZ, S.; HEMMING, B. A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 186-191, 1999.

MINKE, B. The TRP channel and phospholipase C-mediated signaling. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 629-643, 2001.

MIZUKOSHI, K.; SASAKI, M.; IZUMI, Y.; MIURA, M.; WATANABE, M.; AMAYA, F. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after plantar incision. **Neuroscience**, v. 234, p. 77-87, 2013.

MOGENSEN, T. H.; MELCHJORSEN, J.; MALMGAARD, L.; CASOLA, A.; PALUDAN, S. R. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5883-5890, 2004.

MULVEY, M.; POPPERS, J.; STERNBERG, D.; MOHR, I. Regulation of eIF2 α phosphorylation by different functions that act during discrete phases in the herpes simplex virus type 1 life cycle. **Journal of Virology**, v. 77, n. 20, p. 10917-10928, 2003.

OAKLANDER, A. L. The density of remaining nerve endings in human skin with and without postherpetic neuralgia after shingles. **Pain**, v. 92, n. (1-2), p. 139-145, 2001.

OGAWA, A.; DAI, Y.; YAMANAKA, H.; IWATA, K.; NIWA, H.; NOGUCHI, K. Ca²⁺/calmodulin-protein kinase II α in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to neuropathic pain following inferior alveolar nerve transection. **Experimental Neurology**, v. 192, n. 2, p. 310-319, 2005.

OKUDA, K.; IWASAKA, H.; HAGIWARA, S.; TAKESHIMA, N.; TAKATANI, J.; UCHINO, T.; NOGUCHI, T. The antinociceptive effects of estradiol on adjuvant-induced hyperalgesia in rats involve activation of adrenergic and serotonergic systems. **Journal of Anesthesia**, v. 25, n. 3, p. 392-397, 2011.

ORTMANN, K. L.; CHATTOPADHYAY, M. Decrease in neuroimmune activation by HSV-mediated gene transfer of TNF α soluble receptor alleviates pain in rats with diabetic neuropathy. **Brain, Behaviour, and Immunity**, v. 41, p. 144-151, 2014.

OSTER, G.; HARDING, G.; DUKES, E.; EDELSBERG, J.; CLEARY, P. D. Pain, medication use, and health-related quality of life in older persons with postherpetic neuralgia: results from a population-based survey. **The Journal of Pain**, v. 6, p. 356-363, 2005.

PATEL, C. V.; HANDY, I.; GOLDSMITH, T.; PATEL, R.C. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37993-37998, 2000.

PATEL, R. C.; SEM, G. C. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 15, p. 4379-4390, 1998.

PETERS, G. A.; KHOO, D.; MOHR, I.; SEM, G. C. Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. **Journal of Virology**, v. 76, p. 11054-11064, 2002.

PRICE, D. D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1769-1772, 2000.

PRICE, T. J.; JESKE, N. A.; FLORES, C. M.; HARGREAVES, K. M. Pharmacological interactions between calcium/calmodulin-dependent kinase II α and TRPV1 receptors in rat trigeminal sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 389, n. 2, p. 94-98, 2005.

PROUD, C. G. PKR: a new name and new roles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 241-246, 1995.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends in Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 611-618, 2009.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004.

ROWBOTHAM, M.; PETERSEN, K. L. Zoster-associated pain and neural dysfunction. **Pain**, v. 93, n. 1, p. 1-5, 2001.

RYAN-CEBULA, S.; GRONINGER, H. Postherpetic Neuralgia #272. **Journal of Palliative Medicine**, v. 16, n. 9, 2013.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. Structure and function of the protein kinase R. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 316, p. 253-292, 2007.

SAMUEL, C. E. Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 2, p. 600-604, 1979.

SAMUEL, C. E. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 11, p. 7603-7606, 1993.

SANNA, P. P.; CAMMALLERI, M.; BERTON, F.; SIMPSON, C.; LUTJENS, R.; BLOOM, F. E.; FRANCESCONI, W. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3359-3365, 2002.

SASAKI, A.; MABUCHI, T.; SERIZAWA, K.; TAKASAKI, I.; ANDOH, T.; SHIRAKI, K.; ITO, S.; KURAISHI, Y. Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice. **Neuroscience**, v. 150, n. 2, p. 459-466, 2007.

SASAKI, A.; SERIZAWA, K.; ANDOH, T.; SHIRAKI, K.; TAKAHATA, H.; KURAISHI, Y. Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 266-273, 2008a.

SASAKI, A.; TAKASAKI, I.; ANDOH, T.; NOJIMA, H.; SHIRAKI, K.; KURAISHI, Y. Roles of α -adrenoceptors and sympathetic nerve in acute herpetic pain induced by herpes simplex virus inoculation in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 4, p. 329-336, 2003.

SASAKI, A.; TAKASAKI, I.; ANDOH, T.; SHIRAKI, K.; TAKESHIMA, H.; TAKAHATA, H.; KURAISHI, Y. Nociceptin-receptor deficiency prevents postherpetic pain without effects on acute herpetic pain in mice. **Neuroreport**, v. 19, n. 1, p. 83-86, 2008b.

SHEN, K.; TERUEL, M. N.; CONNOR, J. H.; SHENOLIKAR, S.; MEYER, T. Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 881-886, 2000.

SHI, T. J.; HUANG, P.; MULDER, J.; CECCATELLI, S.; HOKFELT, T. Expression of p-Akt in Sensory Neurons and Spinal Cord after Peripheral Nerve Injury. **Neurosignals**, v. 17, n. 3, p. 203-212, 2009.

SHI, T. J.; LIU, S. X.; HAMMARBERG, H.; WATANABE, M.; XU, Z. Q.; HÖKFELT, T. Phospholipase C β 3 in mouse and human dorsal root ganglia and spinal cord is a possible target for treatment of neuropathic pain. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 20004-20008, 2008.

SINGH, M.; CASTILLO, D.; PATEL, C. V.; PATEL, R. C. Stress-Induced Phosphorylation of PACT Reduces Its Interaction with TRBP and Leads to PKR Activation. **Biochemistry**, v. 50, n. 21, p. 4550-4560, 2011.

SONTAG, E.; FEDOROV, S.; KAMIBAYASHI, C.; ROBBINS, D.; COBB, M.; MUMBY, M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the MAP kinase pathway and induces cell proliferation. **Cell**, v. 75, N. 5, p. 887-897, 1993.

SONTAG, E.; NUNBHAKDI-CRAIG, V.; BLOOM, G. S.; MUMBY, M. C. A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. **The Journal of Cell Biology**, v. 128, n. 6, p. 1131-1144, 1995.

SONTAG, E.; SONTAG, J. M.; GARCIA, A. Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C ζ signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF- κ B activation. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 18, p. 5662-5671, 1997.

STARK, G. R.; KERR, I. M.; WILLIAMS, B. R.; SILVERMAN, R. H.; SCHREIBER, R. D. How cells respond to interferons. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 227-264, 1998.

STOJDL, D. F.; ABRAHAM, N.; KNOWLES, S.; MARIUS, R.; BRASEY, A.; LICHTY, B. D.; BROWN, E. G.; SONENBERG, N.; BELL, J. C. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. **Journal of virology**, v. 74, n. 20, p. 9580-9585, 2000.

SUGIYAMA, T.; GOTOU, T.; MORIYAMA, K.; KAJIURA, N.; HASEGAWA, T.; TOMIDA, J.; TAKAHASHI, K.; KOMATSU, T.; UEDA, H.; SATO, K.; TOKORO, S.; NERI, P.; MORI, H. Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-induced interferon- β production by 2-aminopurine. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3-4, p. 299-304, 2012.

SUN, R. Q.; TU, Y. J.; YAN, J. Y.; WILLIS, W. D. Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin. **Pain**, v. 120, n. 1-2, p. 86-96, 2006.

SUN, R.; YAN, J.; WILLIS, W. D. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. **Neuroscience**, v. 144, n. 1, p. 286-294, 2007.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M.; ANNICELLI, L. L.; KRAUSE, J. E.; CORTRIGHT, D. N. The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 581-587, 1999.

TAKASAKI, I.; ANDOH, T.; SHIRAKI, K.; KURAISHI, Y. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 95-101, 2000.

TAVES, S.; BERTA, T.; LIU, D. L.; GAN, S.; CHEN, G.; KIM, Y. H.; VAN DE VEN T.; LAUFER, S.; JI, R. R. Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. **Brain, Behavior, and Immunity**, [in press], 2015.

TAYLOR, D. R.; LEE, S. B.; ROMANO, P. R.; MARSHAK, D. R.; HINNEBUSCH, A. G.; ESTEBAN, M.; MATHEWS, M. B. Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 11, p. 6295-6302, 1996.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-543, 1998.

TRONEL, C.; PAGE, G.; BODARD, S.; CHALON, S.; ANTIER, D. The specific PKR inhibitor C16 prevents apoptosis and IL-1 β production in an acute excitotoxic rat model with a neuroinflammatory component. **Neurochemistry International**, v. 64, p. 73-83, 2014.

van WIJCK, A. J.; OPSTELTEN, W.; MOONS, K. G.; van ESSEN, G. A.; STOLKER, R. J.; KALKMAN, C. J.; VERHEIJ, T. J. The PINE study of epidural steroids and local anaesthetics to prevent postherpetic neuralgia: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 367, n. 9506, p. 219-224, 2006.

WANG, Q.; CARMICHAEL, G. G. Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 432-452, 2004.

WANG, X. T.; LIAN, X.; XU, Y. M.; SUO, Z. W.; YANG, X.; HU, X. D. α 2 noradrenergic receptor suppressed CaMKII signaling in spinal dorsal horn of mice with inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 724, p. 16-23, 2014.

WANG, Y. The functional regulation of TRPV1 and its role in pain sensitization. **Neurochemistry Research**, v. 33, n. 10, p. 2008-2012, 2008.

WANG, Y.; LEI, Y.; FANG, L.; MU, Y.; WU, J.; ZHANG, X. Roles of phosphatase 2A in nociceptive signal processing. **Molecular Pain**, v. 8, n. 9, p. 46-56, 2013.

WATSON, P. N. Postherpetic neuralgia. **Clinical Evidence Handbook**, p. 301-303, 2010.

WEITZMAN, D.; SHAVIT, O.; STEIN, M.; COHEN, R.; CHODICK, G.; SHALEV, V. A population based study of the epidemiology of Herpes Zoster and its complications. **The Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 463-439, 2013.

WILKERSON, J. L.; GENTRY, K. R.; DENGLER, E. C.; WALLACE, J. A.; KERWIN, A. A.; ARMIJO, L. M.; KUHN, M. N.; THAKUR, G. A.; MAKRIYANNIS, A.; MILLIGAN, E. D. Intrathecal cannabidiol CB(2)R agonist, AM1710, controls pathological pain and restores basal cytokine levels. **Pain**, v. 153, n. 5, p. 1091-1106, 2012.

WILLIAMS, B. R. PKR, a sentinel kinase for cellular stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6112-6120, 1999.

WILLIAMS, B. R. Signal integration via PKR. **Science's STKE**, v. 2001, n.89, p. RE2, 2001.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.

WU, S.; KAUFMAN, R. J. A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1291-1296, 1997.

XU, J. T.; TU, H. Y.; XIN, W. J.; LIU, X. G.; ZHANG, G. H.; ZHAI, C. H. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 2, p. 269-279, 2007.

XU, J. T.; XIN, W. J.; WEI, X. H.; WU, C. Y.; GE, Y. X.; LIU, Y. L.; ZANG, Y.; ZHANG, T.; LI, Y. Y.; LIU, X. G. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. **Experimental Neurology**, v. 204, n. 1, p. 355-365, 2007.

XU, Z.; WILLIAMS, B. R. The B56 α Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A Is a Target for Regulation by Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 14, p. 5285-5299, 2000.

XUE, Z. J.; SHEN, L.; WANG, Z. Y.; HUI, S. Y.; HUANG, Y. G.; MA, C. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for bCCI neuropathic pain rats. **Brain Research**, v. 1583, p. 79-88, 2014.

YAN, X.; CHEN, Z.; BRECHOT, C. Associations among Genotype 1b Hepatitis C Virus Core Protein, Protein Kinase R, and Signal Transducer and Activator of Transcription 3. **Hepatitis Monthly**, v. 10, n. 4, p. 275-284, 2010.

YANG, Y. L.; REIS, L. F.; PAVLOVIC, J.; AGUZZI, A.; SCHÄFER, R.; KUMAR, A.; WILLIAMS, B. R.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 24, p. 6095-6106, 1995.

YAWN, B. P.; GILDEN, D. The global epidemiology of herpes zoster. **Neurology**, v. 81, n. 10, p. 928-930, 2013.

YOSHIDA, K.; OKAMURA, H.; HOSHINO, Y.; SHONO, M.; YOSHIOKA, M.; HINODE, D.; YOSHIDA, H. Interaction between PKR and PACT mediated by LPS-inducible NF- κ B in human gingival cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 165-173, 2012.

ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; MOGENSEN, T. H.; DI-DONATO, J. A.; WILLIAMS, B. R. NF- κ B activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF- κ B-inducing kinase and IkappaB kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 4, p. 1278-1290, 2000.

ZHANG, S.; SUN, Y.; CHEN, H.; DAI, Y.; ZHAN, Y.; YU, S.; QIU, X.; TAN, L.; SONG, C.; DING, C. Activation of the PKR/eIF2 α signaling cascade inhibits replication of Newcastle disease virus. **Virology Journal**, 11:62, 2014.

ZHENG, J. C.; HUANG, Y.; TANG, K.; CUI, M.; NIEMANN, D.; LOPEZ, A.; MORGELLO, S.; CHEN, S. HIV-1-infected and/or immune-activated macrophages regulate astrocyte CXCL8 production through IL-1 β and TNF- α : involvement

of mitogen-activated protein kinases and protein kinase R. **Journal of Neuroimmunology**, v. 200, n. 1-2, p. 100-110, 2008.

ZHOU, Y.; TAKAHASHI, E.; LI, W.; HALT, A.; WILTGEN, B.; EHNINGER, D.; LI, G. D.; HELL, J. W.; KENNEDY, M. B.; SILVA, A. J. Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13843–13853, 2007.

ZHU, P. J.; HUANG, W.; KALIKULOV, D.; YOO, J. W.; PLACZEK, A. N.; STOICA, L.; ZHOU, H.; BELL, J. C.; FRIEDLANDER, M. J.; KRNJEVIĆ, K.; NOEBELS, J. L.; COSTA-MATTIOLI, M. Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon- γ -mediated disinhibition. **Cell**, v. 147, n. 6, p. 1384-1396, 2011.

ZHUANG, Z. Y.; XU, H.; CLAPHAM, D. E.; JI, R. R. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8300-8309, 2004.

ZHUANG, Z. Y.; XU, H.; CLAPHAM, D. E.; JI, R. R. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8300-8309, 2004.

ZYGMUNT, P. M.; ERMUND, A.; MOVAHED, P.; ANDERSSON, D. A.; SIMONSEN, C.; JÖNSSON, B. A.; BLOMGREN, A.; BIRNIR, B.; BEVAN, S.; ESCHALIER, A.; MALLET, C.; GOMIS, A.; HÖGESTÄTT, E. D. Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81618-e81632, 2013.

Apêndice A

Dados complementares

Com a finalidade de monitorar o controle das linhagens de animais $PKR^{+/+}$ e $PKR^{-/-}$ de modo representativo, foram realizados experimentos para identificar os perfis de expressão de PKR e de receptores TRPV1 em amostras de GRD (L3-L6) de animais intactos.

Os resultados demonstraram que animais $PKR^{-/-}$ apresentam déficit de PKR quando comparados aos animais $PKR^{+/+}$ ($p < 0.001$) (Fig. 15A). Enquanto isso, o perfil de expressão de receptores TRPV1 apresentou resultados semelhantes em ambas as linhagens (Fig. 15B). Esses resultados comprovam que os animais $PKR^{-/-}$ são deficientes em PKR e que não há diferenças na expressão de receptores TRPV1 no GRD de animais $PKR^{+/+}$ e $PKR^{-/-}$ intactos.

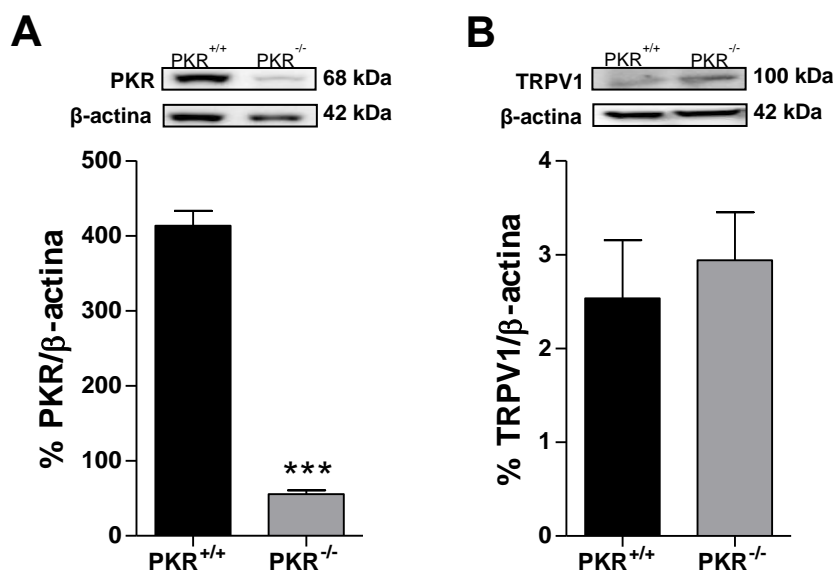



Figura 15. Perfis de expressão de (A) PKR e (B) TRPV1 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em GRD (L3-L6) de animais $PKR^{+/+}$ e $PKR^{-/-}$ intactos. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) $p < 0.001$ em relação aos animais $PKR^{+/+}$, utilizando teste *t* de Student não pareado, $n=2-4$ /grupo).

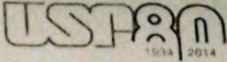
Anexo A

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

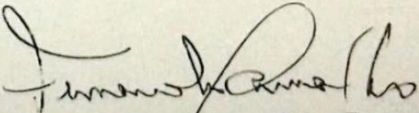


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 196/2014, sobre o projeto intitulado “*Ação da proteína quinase dependente de RNA no sistema nociceptivo em modelo experimental de neuropatia periférica de origem animal*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Guilherme de Araújo Lucas** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** ad referendum na data de 10 de abril de 2015.

We certify that the protocol n° 196/2014, entitled “*Role of RNA-dependent protein kinase in nociceptive system in an animal experimental model of peripheral neuropathy*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved *ad referendum* in 04/10/2015 by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo.

Ribeirão Preto, 10 de abril de 2015.



Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP - USP