



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA
MONOAMINA OXIDASE B EM MODELOS DE DOR
PÓS-OPERATÓRIA E NEUROPÁTICA EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jardel Gomes Villarinho

Santa Maria, RS, Brasil, 2010

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA MONOAMINA
OXIDASE B EM MODELOS DE DOR PÓS-OPERATÓRIA E
NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

Por

Jardel Gomes Villarinho

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA MONOAMINA
OXIDASE B EM MODELOS DE DOR PÓS-OPERATÓRIA E
NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

Jardel Gomes Villarinho

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:



Dr. Juliano Ferreira (Orientador)



Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (UFSC)



Dra. Roselei Fachinnetto (UFSM)

Santa Maria, 26 de março de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Juliano Ferreira, pela excelente orientação, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência e pela compreensão e, acima de tudo, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

À minha namorada, Stela, pelo amor, incentivo e compreensão antes e durante esta trajetória. Sem o seu apoio e companheirismo certamente eu não teria chegado até aqui. Obrigado por estar sempre presente em minha caminhada.

À minha família por me ensinarem a acreditar nos meus sonhos. Gostaria de agradecer em especial à minha mãe Araci pelo amor incondicional e ao meu irmão Cláudio por ter me incentivado a estudar desde criança.

À professora Roselei Fachinetto por ter me ensinado “os primeiros passos” na pesquisa. Ter trabalhado com você ao ingressar na iniciação científica foi uma experiência muito gratificante. Obrigado por sua paciência, amizade e ensinamentos.

Aos meus colegas do LABNEURO pelos diversos aprendizados, pela convivência e pelos inúmeros momentos alegres que vivenciamos juntos. Agradeço em especial às colegas e amigas Sara e Cássia, cuja ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À minha amiga e segunda mãe, Magda, por sua amizade e companheirismo desde o período de graduação.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) que de diferentes formas contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste curso, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

*“Sábio é aquele que conhece os limites
da própria ignorância.”*

(Sócrates)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ENZIMA MONOAMINA OXIDASE B EM MODELOS DE DOR PÓS-OPERATÓRIA E NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS

Autor: Jardel Gomes Villarinho

Orientador: Juliano Ferreira

Local e data da Defesa: Santa Maria, 26 de março de 2010.

As monoaminas possuem uma função modulatória importante nas vias descendentes do controle da dor e estão envolvidas no mecanismo antinociceptivo de diversos fármacos comumente utilizados no tratamento de síndromes dolorosas. Nesse estudo, nós avaliamos a participação da monoamina oxidase B (MAO-B), uma enzima chave envolvida no metabolismo das monoaminas, em modelos de dor pós-operatória e neuropática em camundongos. Para esse propósito, foram avaliados os efeitos da selegilina, um inibidor seletivo e irreversível da MAO-B, na sensibilidade mecânica e na atividade *ex vivo* da MAO-B em diferentes regiões do sistema nervoso central (córtex cerebral, estriado e medula espinhal) de camundongos submetidos à incisão plantar ou à ligação parcial do nervo ciático (PSNL). Os camundongos que foram submetidos à incisão plantar apresentaram uma diminuição significativa no limiar mecânico quando comparados aos animais falso-operados, caracterizando o desenvolvimento de alodínia mecânica. Tanto o pré quanto o pós-tratamento com selegilina, em uma dose capaz de inibir seletivamente a atividade da MAO-B (10 mg/kg, p.o.), apresentaram efeito anti-alodínico a partir de 0,5 até 6 h após o tratamento. A atividade da MAO-B, medida 4 h após o procedimento cirúrgico, não foi alterada nos camundongos submetidos à incisão quando comparada com a atividade dos animais falso-operados em nenhuma das estruturas analisadas. Os camundongos submetidos à PSNL também desenvolveram alodínia mecânica, a qual foi revertida pela selegilina (10 mg/kg, p.o.) de 2 até 6 h após o tratamento. Além disso, os camundongos submetidos à

PSNL apresentaram um aumento significativo na atividade da MAO-B no estriado 4 h após o tratamento, o qual foi revertido pela selegilina. Foi observado também que a selegilina, em uma dose sem efeito antinociceptivo (1 mg/kg, p.o.) em ambos os modelos de dor utilizados, não foi capaz de inibir a atividade da MAO-B. Nossos resultados mostram que a selegilina apresentou um efeito antinociceptivo tanto em um modelo de dor aguda quanto em um modelo de dor crônica, sugerindo um possível envolvimento da MAO-B nos mecanismos da dor.

Palavras-chave: selegilina, monoamina oxidase B, dor pós-cirúrgica, neuropatia, nocicepção, camundongo

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ASSESSMENT OF MONOAMINE OXIDASE B INVOLVEMENT ON MODELS OF POSTOPERATIVE AND NEUROPATHIC PAIN IN MICE

Author: Jardel Gomes Villarinho

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, March, 26th, 2010.

Monoamines appear to play an important modulatory role on pain descending pathways and are involved in the antinociceptive mechanism of several drugs commonly used for the management of pain. In this study, we assessed the involvement of monoamine oxidase B (MAO-B), a key enzyme implicated in monoamine metabolism, on models of postsurgical and neuropathic pain in mice. For this purpose, we evaluated the effects of the selective and irreversible MAO-B inhibitor selegiline on mechanical sensitivity and *ex vivo* MAO-B activity in different central nervous system regions in mice submitted to incisional and partial sciatic nerve ligation (PSNL) pain models. Mice subjected to plantar incision showed a significant decrease in mechanical threshold when compared with sham-operated mice, characterizing the development of mechanical allodynia. Selegiline, at a dose sufficient to inhibit selectively the MAO-B activity (10 mg/kg), showed an anti-allodynic effect from 0.5 until 6 h after incision. The MAO-B activity was not altered in incision submitted mice when compared with sham-operated animals in any analyzed structure. Likewise, PSNL submitted mice also developed mechanical allodynia, which was reversed by selegiline (10 mg/kg) from 2 until 6 h after treatment. In addition, a significant increase on striatal MAO-B activity was observed in mice subjected to PSNL when compared with sham-operated animals, which was reversed by selegiline treatment. Taken together, our results showed that selegiline presented an antinociceptive effect on mice models of both acute and chronic pain, suggesting a potential involvement of MAO-B on pain mechanisms.

Keywords: selegiline, monoamine oxidase B, post-surgical pain, neuropathy, nociception, mouse

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig. 1 - Effects of pretreatment with selegiline (1, 3 or 10 mg/kg, p.o.) or saline on mechanical nociceptive threshold in a mice incisional pain model	32
Fig. 2 - Effects of post-treatment with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline on time-course curve of mechanical nociceptive threshold in a mice incisional pain model	33
Fig. 3 - Effects of pretreatment with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline on <i>ex vivo</i> monoamine oxidase (MAO) activity in spinal cord, cerebral cortex and striatum of sham-operated or plantar incision submitted mice.....	34
Fig. 4 - Effects of selegiline (1, 3 or 10 mg/kg, p.o.) or saline treatment on mechanical nociceptive threshold in a mice neuropathic pain model.....	35
Fig. 5 - Effects of selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline treatment on <i>ex vivo</i> monoamine oxidase (MAO) activity in spinal cord, cerebral cortex and striatum of sham-operated or partial sciatic nerve ligation (PSNL) submitted mice.....	36
Table 1 - Effects of selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline treatment on latency for the first fall and total fall number in the rota-rod test in mice.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina
IMAOs	Inibidores da monoamina oxidase
MAO	Monoamina oxidase
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PEA	β -feniletilamina
p.o.	Via oral (do latim <i>per os</i>)
PSNL	Ligação parcial do nervo ciático
SNC	Sistema nervoso central
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
APRESENTAÇÃO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Monoamina Oxidase.....	7
3.2. Dor	10
3.3 Relação entre monoamina oxidase e dor.....	13
4. ARTIGO	15
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES.....	43
7. PERSPECTIVAS.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A enzima monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) é responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina. Com base em estudos farmacológicos, bioquímicos e genéticos, duas isoformas da MAO foram propostas e designadas MAO-A e MAO-B (BACH *et al.*, 1988; JOHNSTON, 1968; MAGYAR & KNOLL, 1977). Para a maioria das espécies de mamíferos, a MAO-A preferencialmente desamina a serotonina e é seletivamente inibida por baixas concentrações de clorgilina, enquanto que a MAO-B desamina a β -feniletilamina (PEA) e a benzilamina e é sensível à inibição por baixas concentrações de selegilina. A dopamina, a noradrenalina e a tiramina são oxidadas por ambas as isoformas (YOU DIM *et al.*, 2006).

As monoaminas desempenham um papel importante na modulação da dor devido à sua ação central nas vias descendentes inibitórias da dor (MILLAN, 2002; WOOD, 2008). Além disso, os sistemas monoaminérgicos estão envolvidos no mecanismo de ação de diversos fármacos utilizados no tratamento de síndromes dolorosas, como os antidepressivos tricíclicos que são extensivamente utilizados no tratamento da dor crônica (FEINMANN, 1985; LYNCH, 2001; SINDRUP *et al.*, 2005).

Níveis alterados de monoaminas no sistema nervoso central (SNC) estão também relacionados à patofisiologia de diversas desordens neurológicas, como depressão e doença de Parkinson (BERTON & NESTLER, 2006). Devido à importância da MAO para o metabolismo das monoaminas, os inibidores dessa enzima têm sido utilizados como alternativas terapêuticas no tratamento dessas doenças neurológicas (YOU DIM *et al.*, 2006). Nesse contexto, a depressão e a dor crônica coexistem em muitos pacientes e podem ser moduladas pelos mesmos sistemas de neurotransmissores (BAIR *et al.*, 2003; KALSO, 2005; MONGINI *et al.*, 2007; NICHOLSON & VERMA, 2004). A dor também é apresentada frequentemente entre os sintomas não motores de pacientes acometidos pela doença de Parkinson (BEISKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2006; TINAZZI *et al.*, 2006). Desta forma, os inibidores da MAO poderiam ser úteis no manejo da dor.

Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado que os inibidores da MAO-A apresentam efeito antinociceptivo em diversos modelos de dor em animais experimentais, assim como ação analgésica em estudos clínicos (APAYDIN *et al.*, 2001; BIANCHI *et al.*, 1992; DINA *et al.*, 2008; PIRILDAR *et al.*, 2003; SCHREIBER *et al.*, 1998). Contudo, poucos estudos têm avaliado a participação da MAO-B nos

mecanismos de dor e analgesia. Em 1987, Almay e colaboradores mostraram que pacientes com dor neuropática apresentavam uma diminuição na atividade da MAO-B em plaquetas. Além disso, um inibidor seletivo da MAO-B, a selegilina, foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo da morfina em camundongos (SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ *et al.*, 2000). Recentemente foi demonstrada uma associação entre um polimorfismo funcional no gene que codifica a MAO-B e a intensidade de dor pós-operatória em humanos, sugerindo um possível envolvimento da MAO-B na percepção da intensidade da dor (SERÝ *et al.*, 2006). Uma vez que as dores neuropática e pós-cirúrgica são condições de difícil tratamento, estudos voltados para os mecanismos envolvidos nessas condições dolorosas são de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (HARDEN & COHEN, 2003; SCHOLZ & WOOLF, 2002; SWARM *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar um possível envolvimento da enzima monoamina oxidase B em modelos de dor pós-operatória e neuropática em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Examinar o potencial efeito antinociceptivo do pré e do pós-tratamento com selegilina em um modelo de dor pós-operatória;

2.2.2. Investigar se o pré-tratamento com selegilina poderia alterar a atividade *ex vivo* da MAO-A e da MAO-B em camundongos submetidos ao modelo de dor pós-operatória;

2.2.3. Verificar os efeitos do tratamento com selegilina em um modelo de dor neuropática;

2.2.4 Avaliar a atividade *ex vivo* da MAO-A e da MAO-B em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Monoamina oxidase

A monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) é uma flavoproteína localizada na membrana mitocondrial externa de diversas células, como neurônios e células da glia. Ela é uma enzima que utiliza o dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD) como cofator e catalisa a desaminação oxidativa de diversas aminas, incluindo a 5-hidroxitriptamina (serotonina), a histamina, a tiramina e as catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina (SHIH *et al.*, 1999). A reação catalisada pela MAO produz peróxido de hidrogênio, um aldeído e também amônia (no caso de aminas primárias) ou uma amina substituída (para aminas secundárias) (YOU DIM *et al.*, 2006).

Duas isoformas da MAO (MAO-A e MAO-B) são encontradas na maioria dos tecidos de mamíferos, as quais foram originalmente distinguidas devido à sua sensibilidade aos inibidores irreversíveis clorgilina e selegilina (L-deprenil) e à sua especificidade por diferentes substratos (JOHNSTON, 1968; MAGYAR & KNOLL, 1977). A MAO-A desamina preferencialmente a serotonina e é inibida seletivamente por baixas concentrações de clorgilina, enquanto que a MAO-B é inibida seletivamente por baixas concentrações de selegilina e metaboliza a benzilamina e a PEA. As aminas dopamina, noradrenalina, adrenalina, triptamina e tiramina são oxidadas por ambas as isoformas da enzima na maioria das espécies (YOU DIM *et al.*, 2006).

Além disso, a MAO-B é também responsável pela biotransformação do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), uma neurotoxina capaz de produzir sintomas semelhantes à doença de Parkinson em humanos (YOU DIM & BAKHLE, 2006). Contudo, existem diversas exceções, pois a especificidade da MAO por seu substrato depende da concentração, da afinidade e da taxa de renovação do substrato e da concentração da enzima, assim como da espécie analisada (SHIH *et al.*, 1999). Por exemplo, apenas a MAO-A está envolvida no metabolismo da dopamina em cérebro de rato, enquanto que ambas MAO-A e MAO-B podem contribuir para o metabolismo da dopamina no cérebro humano (YOU DIM *et al.*, 2006). Já no estriado de camundongo, a dopamina é metabolizada apenas pela MAO-A em condições basais, mas por ambas as isoformas quando em altas concentrações (FORNAI *et al.*, 1999).

As isoformas da MAO são codificadas por dois genes distintos localizados no cromossomo X (Xp11.23 e Xp22.1), cada um compreendendo 15 éxons com idêntica organização íntrons-éxons (GRIMSBY *et al.*, 1991), sugerindo que ambas as isoformas são derivadas de uma duplicação de um mesmo gene ancestral. A MAO-A e a MAO-B humanas são bastante semelhantes estruturalmente, apresentando uma homologia de 70% em sua sequência de aminoácidos (BACH *et al.*, 1988).

A MAO é expressa na maioria dos tecidos de mamíferos, contudo a proporção das duas isoformas varia entre os tecidos. Além disso, a distribuição da MAO-A e da MAO-B no SNC exhibe pouca variação entre as espécies (SHIH *et al.*, 1999). Em tecidos neuronais, a MAO-A é encontrada predominantemente em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como *locus coeruleus*, *substantia nigra* e regiões periventriculares do hipotálamo. Em contraste, a MAO-B é preferencialmente expressa em neurônios serotoninérgicos (células do núcleo dorsal da *rafe*) e em astrócitos (JAHNG *et al.*, 1997; SAURA *et al.*, 1996; WESTLUND *et al.*, 1985). Tem sido sugerido que a MAO-A e a MAO-B neuronais possuem um papel importante em proteger os neurônios de aminas exógenas, em terminar as ações das aminas neurotransmissoras, assim como em regular os estoques de aminas intracelulares. Em tecidos periféricos, como intestino, fígado, pulmão e placenta, a MAO protege o organismo oxidando aminas provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea. Em microvasos da barreira hemato-encefálica, por exemplo, a MAO possui função protetora agindo como uma barreira metabólica (YOU DIM *et al.*, 2006).

Devido à sua função no metabolismo dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina, a MAO parece exercer um papel importante na patofisiologia de diversas desordens neurológicas e psiquiátricas. Logo, a diminuição da neurotransmissão monoaminérgica relacionada à depressão, faz dos inibidores da MAO-A agentes terapêuticos potenciais para serem utilizados no tratamento deste distúrbio afetivo (BERTON & NESTLER, 2006). Além disso, Meyer e colaboradores (2006) demonstraram que pacientes com depressão apresentaram uma densidade aumentada de MAO-A em diversas regiões do cérebro quando comparados a indivíduos saudáveis. Os autores sugerem que esse aumento na quantidade de MAO-A poderia ser a causa dos baixos níveis de monoaminas encontrados em pacientes deprimidos. De fato, os inibidores da MAO (IMAOs) foram

os primeiros fármacos antidepressivos descritos e continuam sendo utilizados até hoje com grande sucesso (BERTON & NESTLER, 2006).

Apesar da primeira geração de IMAOs irreversíveis e não-seletivos (por exemplo, fenelzina e tranilcipromina) apresentar atividade antidepressiva, seu uso acarretava uma série de efeitos colaterais, como as crises hipertensivas agudas quando ingeridos juntamente com alimentos ricos em tiramina. Essas limitações impulsionaram o desenvolvimento dos IMAOs de segunda geração, os quais ainda apresentavam um perfil de atividade irreversível, porém seletivo para MAO-A (clorgilina) ou MAO-B (selegilina). Contudo, as indesejáveis crises hipertensivas continuavam a limitar o uso dos inibidores seletivos da MAO-A. Nos últimos anos, inibidores seletivos da MAO-A com perfil reversível (p. ex. moclobemida) têm sido desenvolvidos na tentativa de fornecer fármacos com um melhor perfil de segurança, uma vez que a ligação reversível do inibidor com a enzima pode ser facilmente rompida na presença de altas concentrações do substrato (tiramina) (LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2007; ROBINSON, 2002).

A tiramina ingerida na dieta é metabolizada no intestino principalmente pela MAO-A (80%), de forma que os inibidores seletivos da MAO-B não causam a indesejável reação do queijo, a qual ocorre devido a uma potencialização dos efeitos cardiovasculares da tiramina ou de outras aminas simpatomiméticas não inativadas (YOU DIM & BAKHLE, 2006). De fato, o inibidor irreversível e seletivo da MAO-B selegilina é utilizado clinicamente como adjuvante juntamente com levodopa e também como monoterapia no tratamento da doença de Parkinson, a qual é caracterizada pela perda do controle de movimentos voluntários causada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta. O uso dos inibidores da MAO-B no tratamento dessa patologia foi baseado em estudos que mostraram que os níveis de MAO-B estavam aumentados no cérebro de pacientes acometidos pela doença de Parkinson (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; RIEDERER & JELLINGER, 1983); que a atividade da MAO-B era predominante em relação à da MAO-A no gânglio basal humano (COLLINS *et al.*, 1970) e que a dopamina, a qual se encontra diminuída em pacientes com a doença de Parkinson, pode ser igualmente metabolizada por ambas as isoformas da MAO em humanos (GLOVER *et al.*, 1977).

Dessa forma, os IMAOs demonstraram serem alternativas terapêuticas importantes para o tratamento de distúrbios psiquiátricos (como depressão) e

neurodegenerativas (como doença de Parkinson). Nesse contexto, vários estudos têm demonstrado que a dor é comumente encontrada entre os sintomas não motores da doença de Parkinson, sendo que 40 a 85 % dos pacientes acometidos por essa patologia apresentam algum tipo de dor (BEISKE *et al.*, 2009; GIUFFRIDA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006; LETRO *et al.*, 2009; TINAZZI *et al.*, 2006). Em um estudo recente realizado na Noruega, Beiske e colaboradores (2009) demonstraram que a prevalência da dor foi maior nos pacientes com a doença de Parkinson (83%) quando comparada à prevalência na população geral desse país (30%). Além disso, uma relação entre depressão e dor tem sido estabelecida, de forma que os antidepressivos tricíclicos são amplamente utilizados no tratamento de dores crônicas e refratárias a outros tratamentos (BAIR *et al.*, 2003; FEINMANN, 1985; LYNCH, 2001; SINDRUP *et al.*, 2005; VON KORFF & SIMON, 1996). Em vista disso, a MAO poderia estar envolvida nos mecanismos patofisiológicos da dor e assim os inibidores desta enzima poderiam apresentar potencial terapêutico no tratamento de condições dolorosas.

3.2. Dor

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Em indivíduos saudáveis, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. O primeiro propósito da dor aguda é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), tais como objetos perigosamente quentes ou cortantes (WATKINS & MAIER, 2002).

O componente sensorial da dor (nocicepção) é formado por várias vias que ligam diversos componentes do sistema nervoso de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e ao núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente

(WOOLF & MA, 2007). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (WATKINS & MAIER, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetivo-motivacionais (descontentamento) da dor (CRAIG, 2003; HUNT & MANTYH, 2001). Esta percepção supra-espinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa (CRAIG, 2003; WATKINS & MAIER, 2002).

Um segundo propósito da dor é desencadear comportamentos de recuperação, em resposta à dor originada por lesões no próprio organismo. Neste caso, a lesão tecidual já ocorreu e a área lesionada está inflamada ou infectada, e os reflexos espinhais não são tão importantes, pois não existe uma fonte externa de estímulo para ser evitada. Os estímulos provenientes da área lesionada chegam a centros cerebrais superiores (p. ex. tálamo e córtex) que organizam comportamentos apropriados de recuperação para proteger e facilitar a resolução da lesão (WATKINS & MAIER, 2002). Isso é o que acontece em dores agudas, como a dor apresentada após um procedimento cirúrgico, conhecida como dor pós-operatória. Diferentemente do que ocorre em outras dores agudas, neste tipo de dor podem ser utilizadas estratégias terapêuticas capazes de prevenir o aparecimento da dor após uma cirurgia (analgesia preventiva), assim como tratamentos que visem aliviar a dor já instalada no período pós-operatório. Contudo, pesquisas recentes demonstram que aproximadamente 50 a 70% dos pacientes apresentam dor moderada a severa após uma cirurgia, indicando que apesar do desenvolvimento de novos fármacos e técnicas analgésicas melhoradas, a dor pós-operatória continua subavaliada e pobremente tratada (POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2007).

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir a resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa (neuropatias). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes

dolorosas centrais (ASHBURN & STAATS, 1999). Durante estas síndromes, o processamento sensorial é anormal. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente, sem a necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou em choque. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (COSTIGAN *et al.*, 2009; WOOLF & MA, 2007; WOOLF & SALTER, 2000).

A transferência das informações nociceptivas entre a medula espinhal e os níveis supra-segmentares sofre alterações intensas devido à participação de mecanismos modulatórios supra-espinhais. A modulação da dor feita pelas vias descendentes ocorre a partir de diversas estruturas, como por exemplo a substância cinzenta periaquedutal, o tálamo, o hipotálamo, o núcleo caudato, o núcleo magno da rafe e o núcleo gigantocelular. Dentre os mediadores envolvidos nesse sistema de modulação descendente, encontram-se as monoaminas, como a noradrenalina, a serotonina e a dopamina, e os opióides endógenos, como as encefalinas, os quais podem exercer efeitos inibitórios na transmissão da informação dolorosa (MILLAN, 2002). Além disso, evidências crescentes têm demonstrado que os níveis de dopamina no SNC parecem exercer um papel importante nos mecanismos de dor e analgesia (WOOD, 2008). Em vista disso, fármacos capazes de promover alterações nos níveis dessas monoaminas podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento de síndromes dolorosas irresponsivas a outros fármacos.

3.3. Relação entre monoamina oxidase e dor

Diversos estudos têm fornecido evidências de que a dor é um sintoma comumente encontrado em pacientes com desordens depressivas (BAIR *et al.*, 2003; MONGINI *et al.*, 2007; NICHOLSON & VERMA, 2004; VACCARINO *et al.*, 2009). De fato, os fármacos antidepressivos têm sido utilizados no tratamento de diversos tipos de dores crônicas há vários anos (FEINMANN, 1985). A maioria dos estudos demonstra que os antidepressivos da classe dos tricíclicos, os quais promovem um aumento na disponibilidade de noradrenalina e serotonina no SNC através da inibição dos transportadores dessas monoaminas, são úteis para o tratamento da dor (LYNCH, 2001) e apresentam uma boa eficácia em síndromes dolorosas de difícil tratamento, como as dores neuropáticas (SINDRUP *et al.*, 2005).

As monoaminas parecem exercer um papel importante na modulação da transmissão nociceptiva, assim como no efeito analgésico de fármacos utilizados no tratamento da dor (MILLAN, 2002; WOOD, 2008). Da mesma forma que os antidepressivos tricíclicos, os IMAOs também levam a um aumento dos níveis de monoaminas no SNC, podendo assim vir a ter alguma utilidade no tratamento de sintomas dolorosos. Com relação a isso, o inibidor reversível e seletivo da MAO-A moclobemida tem sido avaliado para o tratamento da dor tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos. Schreiber e colaboradores (1998) demonstraram que a moclobemida apresentou efeito antinociceptivo em um teste de sensibilidade térmica (teste de retirada da cauda) em camundongos, o qual foi prevenido pela administração de um antagonista α_2 -adrenérgico, mas não pela administração de antagonistas opióide ou serotoninérgico. Além disso, a moclobemida também se mostrou eficaz em reduzir a nocicepção produzida por estímulo mecânico em um modelo de mononeuropatia unilateral em ratos (APAYDIN *et al.*, 2001). Os estudos clínicos, contudo, mostram resultados contraditórios quanto ao uso desse fármaco no tratamento da dor. Menkes e colaboradores (1995) relataram sete casos clínicos sendo que apenas um paciente obteve um efeito analgésico parcial após dois meses de tratamento com moclobemida, sugerindo que o fármaco possui eficácia limitada no tratamento da dor neuropática. Por outro lado, Pirildar e colaboradores (2003) realizaram um estudo clínico aberto e não randomizado envolvendo 14 pacientes e demonstraram que a moclobemida foi eficaz em diminuir a dor percebida pelos mesmos (PIRILDAR *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, a reação catalisada pela MAO gera como metabólitos peróxido de hidrogênio e aldeídos tóxicos (YOUJIM *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a administração do inibidor irreversível e seletivo da MAO-A clorgilina foi capaz de atenuar a nocicepção em um modelo de neuropatia alcoólica em ratos (DINA *et al.*, 2008). Os autores sugerem que a neuropatia possa estar relacionada à formação do aldeído neurotóxico 3,4-diidroxifenilglicolaldeído (DOPEGAL), o qual é originado a partir da metabolização da noradrenalina pela MAO-A dentro de neurônios catecolaminérgicos.

Por outro lado, alguns estudos têm provido evidências para um possível envolvimento da MAO-B em diferentes condições dolorosas. Almay e colaboradores (1987) relataram uma diminuição na atividade da MAO-B em plaquetas de pacientes com dor neuropática. Além disso, a inibição da MAO-B causada pela administração de selegilina foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo promovido pela inibição da enzima encefalinase em ratos (UKPONMWAN *et al.*, 1986). Os autores observaram também um efeito semelhante quando foi administrado aos animais o substrato da MAO-B PEA. Sánchez-Blázquez e colaboradores (2000) demonstraram que o inibidor seletivo da MAO-B, selegilina, foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo da morfina em camundongos. Recentemente, foi demonstrado que a intensidade de dor pós-cirúrgica está associada a um polimorfismo funcional no gene da MAO-B humana, sugerindo um possível envolvimento dessa enzima no mecanismo de percepção da dor (SERÝ *et al.*, 2006). Em conjunto, esses estudos sugerem que a MAO-B possa desempenhar um papel importante nos mecanismos nociceptivos, de forma que os inibidores dessa enzima poderiam ser úteis para o tratamento de síndromes dolorosas.

Apesar destes dados indicarem um possível envolvimento da MAO-B em diferentes condições dolorosas, não existem trabalhos na literatura investigando um potencial efeito antinociceptivo dos inibidores dessa enzima em modelos de dor pós-operatória e neuropática em camundongos, assim como avaliando a atividade da MAO-B em diferentes estruturas do SNC envolvidas nos mecanismos de transmissão e modulação da dor.

4. ARTIGO

Artigo submetido à revista Pharmacology, Biochemistry and Behavior

**Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative
and neuropathic pain in mice**

Villarinho, J. G.^a, Oliveira, S. M.^a, Silva, C. R.^a, Cabreira, T. N.^a, Ferreira, J.^{a,*}

^a Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Tel: + 55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8756

E-mail address: ferreiraj99@gmail.com

Abstract

In this study we assessed the involvement of monoamine oxidase B (MAO-B), a key enzyme implicated in monoamine metabolism, on postoperative (plantar incision) and neuropathic (partial sciatic nerve ligation, PSNL) pain models in mice. Paw incision submitted mice showed a significant decrease in mechanical threshold when compared with sham-operated mice, characterizing the development of mechanical allodynia. The selective and irreversible MAO-B inhibitor selegiline, at a dose sufficient to selectively inhibit MAO-B activity (10 mg/kg), showed an anti-allodynic effect from 0.5 to 6 h after incision. Likewise, PSNL submitted mice also developed mechanical allodynia, which was reversed by selegiline (10 mg/kg) from 2 to 6 h after treatment. In addition, a significant increase on striatal MAO-B activity was observed in mice subjected to PSNL when compared with sham-operated animals, which was reversed by selegiline treatment. Taken together, our results showed that MAO-B seems to exert a critical role in the development of postoperative and neuropathic pain.

Key words: selegiline, deprenyl, neuropathy, postsurgical, incision, nociception, PSNL, MAO-B, mouse

4.1. Introduction

Monoamine oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) catalyses the oxidative deamination of biogenic amines, such as serotonin, norepinephrine and dopamine. It is a flavin adenine dinucleotide (FAD) -dependent enzyme located at the outer mitochondrial membrane of neuronal, glial, and other cells. On the basis of pharmacological, biochemical and genetics studies, two isoforms of MAO were proposed, namely MAO-A and MAO-B (Bach *et al.*, 1988; Johnston, 1968). MAO-A preferentially deaminates serotonin and it is irreversibly inhibited by low concentrations of clorgyline, whereas MAO-B oxidizes β -phenylethylamine (PEA) and benzylamine, and it is irreversibly inactivated by low concentrations of selegiline (L-deprenyl). Dopamine, norepinephrine, epinephrine, tryptamine, and tyramine are oxidized by both isoforms of the enzyme in most species (Youdim *et al.*, 2006).

Monoamines appear to play an important role on specific central nervous system (CNS) structures implicated in pain modulation such as spinal cord, cerebral cortex, and striatum, and are involved in the antinociceptive mechanism of several drugs commonly used for the management of pain (Girard *et al.*, 2006; Millan, 2002; Thor *et al.*, 2007; Wood, 2008). Because of the key role played by the two MAO isoforms in the metabolism of monoamine neurotransmitters, MAO inhibitors represent a useful tool for the treatment of several neurological disorders, including depression and Parkinson's disease (PD) (Youdim *et al.*, 2006). Interestingly, pain is a common symptom presented by some patients with depression or PD pathologies (Bair *et al.*, 2003; Beiske *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2006; Mongini *et al.*, 2007; Nicholson and Verma, 2004; Tinazzi *et al.*, 2006).

In this context, there are increasing evidences supporting an important role for MAO in nociception, as indicated by several studies showing the antinociceptive action of MAO-A inhibitors (Apaydin *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 1992; Dina *et al.*, 2008; Pirildar *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 1998). Nonetheless, there are few studies investigating a possible involvement of MAO-B on pain and analgesia. For instance, Almay *et al.* (1987) reported that patients with neuropathic pain presented low platelet MAO-B activity, suggesting a possible relationship between this enzyme and pain sensation. Moreover, it was demonstrated recently an association of a functional polymorphism of MAO-B with postoperative pain intensity in humans, indicating a

potential role of MAO-B in the perception of pain (Serý *et al.*, 2006). In this regard, it is well known that postoperative and neuropathic painful disorders are conditions with debilitating symptoms such as allodynia (pain responses to non-noxious stimuli) and of difficult treatment, constituting still one of the most important health problems in the world (Gilran, 2006; Woolf and Mannion, 1999). Besides, studies towards mechanisms underlying these pain syndromes are decisive to the development of more efficacious analgesic drugs (Scholz and Woolf, 2002).

In the present study we evaluated the involvement of MAO-B on postsurgical and neuropathic pain. For this purpose, we examined the effects of the selective and irreversible MAO-B inhibitor selegiline on nociception as well as the MAO activity in different CNS regions of mice submitted to postoperative (plantar incision) or neuropathic (partial sciatic nerve ligation, PSNL) pain models.

4.2. Materials and Methods

4.2.1 Animals

Experiments were conducted using male and female Swiss mice (25-30 g) from our own colony. Mice were maintained in polycarbonate cages, with free access to food and water, on a 12-h alternating light-dark schedule in a temperature-controlled (22 ± 3 °C) room. Animals were allowed to adapt to the test environment for 2 h before testing. Mice were kept and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals (Publication No. 85-23, revised 1985). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments.

4.2.2 Drugs

Selegiline hydrochloride (R(-)-Deprenyl hydrochloride or R(-)-N- α -dimethyl-N-2-propynyl-benzeneethanamine hydrochloride; Sigma Chemical Co., St. Louis,

USA) was dissolved in saline (vehicle) and administered orally (10 mL/kg) in all *in vivo* experiments. Clorgyline hydrochloride, kynuramine dihydrobromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and selegiline hydrochloride were dissolved in incubation buffer when used for *in vitro* experiments. All the other reagents used were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

4.2.3 Measurement of mechanical allodynia

In this study we used mechanical allodynia as a parameter of nociception, which was characterized by a significant decrease in the mechanical paw withdrawal threshold (PWT). The measurement of mechanical PWT was carried out using the up-and-down paradigm as described previously by Chaplan *et al.* (1994). Briefly, mice were first acclimatized in individual clear Plexiglas boxes (9 x 7 x 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow the access to the plantar surface of the right hind paw. Filaments of von Frey of increasing stiffness (0.02-10 g) were applied to the mice hind paw plantar surface with a pressure causing the filament to bend. Absence of a paw lifting after 5 s led to the use of the next filament with increasing weight, whereas paw lifting indicated a positive response and led to the use of next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements or until four consecutive positive or four consecutive negative responses occurred. All measurements were carried out in the paw ipsilateral to the surgical or sham procedure. The 50% mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon (1980). The 50% PWT was expressed in grams (g) and was evaluated before (basal) and several times after treatments or surgical procedures.

4.2.4 Postoperative pain model

The postoperative pain model was carried out according to the procedure previously described (Milano *et al.*, 2008; Pogatzki and Raja, 2003). Mice were anesthetized with 2% halothane using a nose cone. After anti-septic preparation of the right hind paw with 10% povidone-iodine solution, a 5-mm longitudinal incision was made with a number 11 blade through the skin and fascia of the plantar foot.

The incision was started 2 mm from the proximal edge of the heel and extended towards the toes. The underlying muscle was elevated with a curved forceps, leaving the muscle origin and insertion intact. The skin was apposed with a single mattress suture of 6-0 nylon.

Mice were pretreated with selegiline (10 mg/kg) or vehicle 1 h before surgical procedure and mechanical sensitivity was measured 0.5, 1, 2, 4, 6, and 24 h after incision (pretreatment protocol). In the post-treatment protocol, animals were submitted to the incisional procedure and mechanical sensitivity was determined 30 min after incision. Afterwards, animals were treated with selegiline (10 mg/kg) or vehicle and responses to mechanical stimuli were verified 0.5, 1, 2, 4, 6, and 24 h after treatment. For the dose-response curve, mice were submitted to a pretreatment with selegiline (1, 3 or 10 mg/kg) or vehicle 1 h before incision and mechanical sensitivity measures were carried out 4 h after incision (5 h after treatment).

4.2.5 Neuropathic pain model

For induction of chronic mononeuropathy, mice were first anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride. Then, a partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one-half of the dorsal portion of the sciatic nerve, using a similar procedure to that previously described (Ferreira *et al.*, 2005; Malmberg and Basbaum, 1998). In sham-operated mice, the nerve was exposed without ligation. Seven days after the surgical procedure, the mechanical sensitivity was measured to confirm the development of allodynia. Then, mice were treated with selegiline (10 mg/kg) or vehicle and mechanical sensitivity was measured 1, 2, 4, 6, and 24 h after treatment (time-course curve). For the dose-response curve, animals received a single injection of selegiline (1, 3 or 10 mg/kg) or vehicle 4 h before the nociceptive test.

4.2.6 Rota-rod test

The motor coordination was evaluated using the rota-rod test (Dunham and Miya, 1957). The animals were submitted to a training session 24 h before testing until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the test day, mice

received a single injection of selegiline (10 mg/kg) or vehicle 4 or 5 h before testing. In the test session, the total fall number during a 4 min period was observed.

4.2.7 Determination of MAO activity

For the postoperative pain model experiment, mice were pretreated with selegiline (10 mg/kg) or saline 1 h before incision or sham procedure. Then, they were killed and samples were collected 4 h after surgical procedure. For the neuropathic pain model experiment, mice were treated with selegiline (10 mg/kg) or saline 7 days after sham or PSNL procedure, and structures were collected 4 h after treatment. Spinal cord, cerebral cortex, and striatum were immediately separated and homogenized in assay buffer (16.8 mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, 3.6 mM KCl). MAO-A and MAO-B activities were measured in brain homogenates by a fluorometric method detecting the formation of the fluorescent product 4-hydroxyquinoline (4-HQ) from kynuramine substrate, as previously described (Matsumoto *et al.*, 1985; Sant'Anna *et al.*, 2009). Briefly, assays were performed in duplicate in a final volume of 500 µL containing 0.25 mg of protein and incubated at 37 °C for 30 min. Activities of the A and B isoforms were isolated pharmacologically by incorporating 250 nM selegiline (selective MAO-B inhibitor) or 250 nM clorgyline (selective MAO-A inhibitor) into the reaction mix. The reaction mixture was preincubated at 37 °C for 5 min and the reaction was started by the addition of 60 µM kynuramine. Results were expressed as nmol of 4-HQ/min/mg of protein.

4.2.8 Statistical analyses

Results were expressed as means ± SEM. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 4.0 software. Significance of differences among groups was evaluated with unpaired t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls' test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's test when appropriate. F values demonstrated in the text were obtained from two-way ANOVA analyze and indicate the interaction between time and treatment factors. Significance was considered when P<0.05.

4.3. Results

4.3.1 Effects of selegiline on postoperative pain model

The incisional procedure caused a significant decrease in PWT at all time points measured (0.5-24 h) in saline treated mice when compared with basal PWT, characterizing the development of allodynia. The pretreatment of mice with selegiline (10 mg/kg) prevented allodynia development, showing an antinociceptive effect from 0.5 to 6 h after incision (Fig. 1B; $F(1,72)=7.63$, $P<0.001$). Besides, PWT of sham-operated animals pretreated with selegiline (10 mg/kg) did not differ significantly from saline pretreated mice (Fig. 1A; $F(1,40)=0.41$, $P=0.838$). Selegiline also presented an anti-allodynic effect at 3 mg/kg, but not at 1 mg/kg when administered 1 h before incision (Fig. 1C; $F(1,24)=12.40$, $P<0.001$).

Furthermore, selegiline (10 mg/kg) was able to reverse mechanical allodynia induced by incision when administered after the incisional procedure. This antinociceptive effect was observed from 0.5 to 6 h after treatment (Fig. 2; $F(1,133)=4.01$, $P<0.001$).

As expected, the pretreatment of mice with selegiline (10 mg/kg) did not alter the MAO-A activity in striatum, cerebral cortex or spinal cord when compared to saline pretreated animals in both sham and incision groups (Fig. 3A). Moreover, selegiline (10 mg/kg) caused a pronounced inhibition of the MAO-B activity in both sham and incision groups when compared with the respective saline pretreated mice in any analyzed structure (Fig. 3B). However, there was no difference in MAO-A and MAO-B activities between sham and incision groups in animals pretreated with saline (Fig. 3A and 3B).

4.3.2 Effects of selegiline on neuropathic pain model

Mechanical nociceptive thresholds were stable before and after the sham procedure in both saline and selegiline treated mice (Fig. 4A; $F(1,30)=1.02$, $P=0.424$). Partial ligation of sciatic nerve produced a profound decrease in the mean PWT 7 days after surgery when compared with the mean basal PWT (Fig. 4B). The mechanical allodynia produced by nerve injury was maintained throughout the

experiment period in saline treated mice, but it was reversed by selegiline (10 mg/kg) from 2 to 6 h after treatment (Fig. 4B; $F(1,60)=13.02$, $P<0.001$). An anti-allodynic effect was also observed 4 h after treatment with the dose of 3 mg/kg, but not with 1 mg/kg of selegiline (Fig. 4C; $F(1,32)=7.41$, $P<0.001$).

As in the postoperative pain model, no difference was observed between groups on the MAO-A activity in striatum, cerebral cortex or spinal cord (Fig. 5A). PSNL caused an increase in the MAO-B activity in striatum, but not in cerebral cortex or spinal cord of saline pretreated mice when compared with sham-operated animals (Fig. 5B). Likewise, selegiline (10 mg/kg) caused a pronounced inhibition of the MAO-B activity in both sham and PSNL groups when compared with respective saline pretreated mice in all examined structures (Fig. 5B).

4.3.3 Effects of selegiline in the rota-rod test

Treatment of mice with selegiline (10 mg/kg, 4 or 5 h before testing) caused no change in the motor coordination activity when compared with vehicle treated animals, as evaluated by both the latency (s) for the first fall and the total fall number in the rota-rod test (Table 1).

4.4. Discussion

Postsurgical pain is a unique and common form of acute pain and several evidences indicate that an effective postoperative analgesia reduces morbidity following surgery, improves patient outcome, and reduces clinical expenses. However, recent surveys demonstrated that about 50-70% of patients experience moderate to severe pain after surgery indicating that, despite the development of new drugs and improved analgesic techniques, postsurgical pain remains still underevaluated and poorly treated (Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007). This occurs because few studies are driven toward the mechanisms of acute postoperative pain (Zahn *et al.*, 2002). In the present study, we evaluated the possible involvement of MAO-B inhibition in a mouse model of postsurgical pain. The selective and irreversible MAO-B inhibitor selegiline (10 mg/kg) prevented the development of mechanical allodynia

induced by plantar incision, showing an anti-allodynic effect from 0.5 to 6 hours after incision. Selegiline was also able to reverse the decrease in PWT produced by incision, showing a similar time-course profile as observed in the pretreatment experiments. These results showed that selegiline presented an antinociceptive effect, suggesting a possible involvement of MAO-B on postsurgical pain.

In accordance with our results, Serý *et al.* (2006) reported a relationship between a functional polymorphism of MAO-B and average intensity of postoperative pain in male subjects. The authors observed that patients presenting the G genotype in intron 13 of MAO-B gene reported higher average intensity of postoperative pain than patients with the A genotype, suggesting that MAO-B could be involved in the perception of pain intensity. In this study, we determined the *ex vivo* MAO activity in mice pretreated with saline or selegiline (10 mg/kg) and submitted to incision or sham procedure. The plantar incision caused no alterations in the MAO-A or MAO-B activities when compared with sham submitted animals. As expected, selegiline pretreatment was able to cause a pronounced inhibition of the MAO-B activity, without affecting the MAO-A activity in sham and incision groups. Unlike the results observed in human polymorphism studies, we did not find difference in the pain intensity or in the antinociceptive effect of selegiline when male or female mice were used (data not shown). In accordance with this result, Kroin *et al.* (2003) also demonstrated that there are no gender differences in both postoperative pain perception and response to analgesic drugs in rats.

Moreover, in order to eliminate a possible false positive antinociceptive effect of selegiline owing to a motor impairment (Negus *et al.*, 2006), the mice were evaluated in the rota-rod test. Selegiline (10 mg/kg) caused no alterations on the latency for the first fall or the total fall number, indicating that the antinociceptive effect was not mediated by an unspecific alteration on motor coordination activity.

The effects of selegiline on a neuropathic pain model in mice were also evaluated. Neuropathic pain is a debilitating condition that frequently results from partial injury to a peripheral nerve and is often resistant to common therapeutic interventions (Woolf and Mannion, 1999). Here, we observed that the animals submitted to PSNL presented a significant decrease in mechanical threshold seven days after surgery, which was reversed by selegiline (10 mg/kg) from 2 to 6 h after treatment. Selegiline decreased the MAO-B activity in sham and PSNL submitted mice in all analyzed structures. As expected, the MAO-A activity was not altered by

selegiline treatment. Differently from what occurred on postoperative acute pain model, PSNL submitted mice presented an enhanced MAO-B activity in striatum when compared with sham operated mice, which was abolished by the selegiline treatment. In this context, brain imaging studies frequently show increased regional cerebral blood flow in the striatum during various types of painful stimulation (Coghill *et al.*, 1999; Iadarola *et al.*, 1998). Furthermore, it has been proposed that striatal dopamine may have an important role in pain regulation (Hagelberg *et al.*, 2004). Because neural plasticity clearly underlies the pain hypersensitivity characteristic of chronic pain (Woolf and Salter, 2000), it is possible that this increase on striatal MAO-B activity could be due to an augment in the enzyme expression and may be relevant to the production of neuropathic pain.

MAO-B is an important enzyme for the metabolism of biogenic and trace amines, such as dopamine and PEA, respectively. Several studies indicate that dopamine plays an important role on pain and analgesia and dopaminergic agonists have antinociceptive effect in different animal models of pain (Altier and Stewart, 1999; Wood, 2008). Moreover, it has been demonstrated that PEA and its derivatives possess antinociceptive action in mice (Giardina, 1974; Matsuoka *et al.*, 1988; Matsuoka *et al.*, 1993). For instance, Ukponmwan *et al.* (1986) demonstrated that the antinociceptive action of an enkephalinase inhibitor was potentiated by both the MAO-B inhibitor selegiline and the MAO-B substrate PEA in rats, suggesting that this amine could mediate the analgesic activity of endogenously released enkephalins. Therefore, the antinociceptive action of selegiline could be mediated by an increase in the levels of dopamine and PEA in the CNS. Nevertheless, further studies are required to investigate the participation of specific monoamines in the antinociceptive mechanism of selegiline.

With the purpose of investigate if a dose of selegiline without antinociceptive action could inhibit the MAO-B activity, we tested the effect of 1mg/kg of selegiline on this enzyme activity. We observed that this dose, which was ineffective in producing antinociception, caused no inhibition on the MAO-B activity (data not shown), suggesting that the MAO-B inhibition appears to be required for the antinociceptive action of selegiline. However, besides MAO-B inhibitory properties, selegiline is known to have other effects such as antioxidant and neuroprotective activities (Le *et al.*, 1997; Maruyama and Naoi, 1999; Youdim and Bakhle, 2006; Zhu *et al.*, 2008). Despite our results suggest that the antinociceptive effect of selegiline is related to its

MAO-B inhibitory property, we cannot exclude the possibility that selegiline could be acting via MAO-B independent mechanism.

Taken together, our results showed that selegiline presented antinociceptive effect on mice models of acute postoperative pain and chronic neuropathic pain, suggesting a possible involvement of MAO-B in the mechanism of these pain conditions and a potential utility of its inhibitors for the development of new therapeutic approaches.

4.5. Acknowledgements

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil). The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

4.6. References

- Almay BG, von Knorring L, Oreland L. Platelet MAO in patients with idiopathic pain disorders. *J Neural Transm* 1987; 69:243-53.
- Altier N, Stewart J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci* 1999; 65:2269-87.
- Apaydin S, Goldeli E, Uyar M, Erhan E, Yegul I, Tuglular I. The antinociceptive effect of moclobemide on the vocalization threshold to paw pressure in a rat model of unilateral mononeuropathy. *Pharmacol Res* 2001; 44:503-7.
- Bach AWJ, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan S-W, *et al.* cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:4934-8.

- Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* 2003; 163:2433-45.
- Beiske AG, Loge JH, Rønningen A, Svensson E. Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *Pain* 2009; 141:173-7.
- Bianchi M, Mantegazza P, Panerai AE. Effects of two different reversible monoamine oxidase-A inhibitors on nociceptive thresholds in the rat. *Eur J Pharmacol* 1992; 219:113-6.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53:55-63.
- Coghill RC, Sang CN, Maisog JM, Iadarola MJ. Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J Neurophysiol* 1999; 82:1934-43.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32:1-32.
- Dina OA, Khasar SG, Alessandri-Haber N, Bogen O, Chen X, Green PG, *et al.* Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2008; 28:1180-90.
- Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20:441-62.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 1957; 46:208-9.
- Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araújo RC, Bader M, Pesquero JB, *et al.* Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2005; 25:2405-12.
- Giardina WJ. Analgesic properties of phenylethylamine and phenylethanolamine in mice. *Pharmacology* 1974; 12:1-6.
- Girard P, Coppé MC, Verniers D, Pansart Y, Gillardin JM. Role of catecholamines and serotonin receptor subtypes in nefopam-induced antinociception. *Pharmacol Res* 2006; 54:195-202.

- Hagelberg N, Jääskeläinen SK, Martikainen IK, Mansikka H, Forssell H, Scheinin H, *et al.* Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. *Eur J Pharmacol* 2004; 500:187-92.
- Harden N, Cohen M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25:S12-7.
- Iadarola MJ, Berman KF, Zeffiro TA, Byas-Smith MG, Gracely RH, Max MB, *et al.* Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET. *Brain* 1998; 121:931-47.
- Johnston JP. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 1968; 17:1286-97.
- Kroin JS, Buvanendran A, Nagalla SK, Tuman KJ. Postoperative pain and analgesic responses are similar in male and female Sprague-Dawley rats. *Can J Anaesth* 2003; 50:904-8.
- Le W, Jankovic J, Xie W, Kong R, Appel SH. (-)-Deprenyl protection of 1-methyl-4-phenylpyridium ion (MPP⁺)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition. *Neurosci Lett* 1997; 224:197-200.
- Lee MA, Walker RW, Hildreth TJ, Prentice WM. A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease. *J Pain Symptom Manage* 2006; 32:462-9.
- Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998; 76:215-22.
- Maruyama W, Naoi M. Neuroprotection by (-)-deprenyl and related compounds. *Mech Ageing Dev* 1999; 111:189-200.
- Matsumoto T, Suzuki O, Furuta T, Asai M, Kurokawa Y, Rimura Y, *et al.* A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clin Biochem* 1985; 18:126-9.
- Matsuoka Y, Sakuma M, Sugioka T, Terawaki Y, Uruno T, Kubota K. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the relation of endogenous norepinephrine to phenylethylamine analog-induced antinociception. *Jpn J Pharmacol* 1988; 48:263-72.
- Matsuoka Y, Sugioka T, Terawaki Y, Uruno T, Kubota K. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the involvement of alpha-2-adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* 1993; 63:101-8.

- Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P, *et al.* Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci* 2008; 83:739-46.
- Millan, MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66:355-474.
- Mongini F, Ciccone G, Ceccarelli M, Baldi I, Ferrero L. Muscle tenderness in different types of facial pain and its relation to anxiety and depression: A cross-sectional study on 649 patients. *Pain* 2007;131:106-11.
- Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319:507-14.
- Nicholson B, Verma S. Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* 2004; 5:S9-27.
- Pirildar S, Sezgin U, Elbi H, Uyar M, Zileli B. A preliminary open-label study of moclobemide treatment of pain disorder. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37:127-34.
- Pogatzki EM, Raja, SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 2003; 99:1023-7.
- Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain--clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007; 21:3-13.
- Sant'Anna GS, Machado P, Sauzem PD, Rosa FA, Rubin MA, Ferreira J, *et al.* Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19:546-9.
- Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain?. *Nat neurosci* 2002; 5:1062-7.
- Schreiber S, Getslev V, Weizman A, Pick CG. The antinociceptive effect of moclobemide in mice is mediated by noradrenergic pathways. *Neurosci Lett* 1998; 253:183-6.
- Serý O, Hrazdilová O, Didden W, Klenerová V, Staif R, Znojil V, *et al.* The association of monoamine oxidase B functional polymorphism with postoperative pain intensity. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27:333-7.
- Swarm RA, Karanikolas M, Kalauokalani D. Pain treatment in the perioperative period. *Curr Probl Surg* 2001; 38:835-920.
- Thor KB, Kirby M, Viktrup L. Serotonin and noradrenaline involvement in urinary incontinence, depression and pain: scientific basis for overlapping clinical efficacy from a single drug, duloxetine. *Int J Clin Pract* 2007; 61:1349-55.

- Tinazzi M, Del Vesco C, Fincati E, Ottaviani S, Smania N, Moretto G, *et al.*, Pain and motor complications in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77:822-5.
- Ukponmwan OE, Ruprecht J, Dzoljic M. An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 332:376-9.
- Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother* 2008; 8:781-97.
- Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999; 353:1959-64.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288:1765-9.
- Youdim MB, Bakhle YS. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br J Pharmacol* 2006; 147:S287-96.
- Youdim MBH, Edmondson D, Tripton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:295-309.
- Zahn PK, Pogatzki EM, Brennan TJ. Mechanisms for pain caused by incisions. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27:514-6.
- Zhu W, Xie W, Pan T, Jankovic J, Li J, Youdim MB, *et al.* Comparison of neuroprotective and neurorestorative capabilities of rasagiline and selegiline against lactacystin-induced nigrostriatal dopaminergic degeneration. *J Neurochem* 2008; 105:1970-8.

4.7. Figures and Table

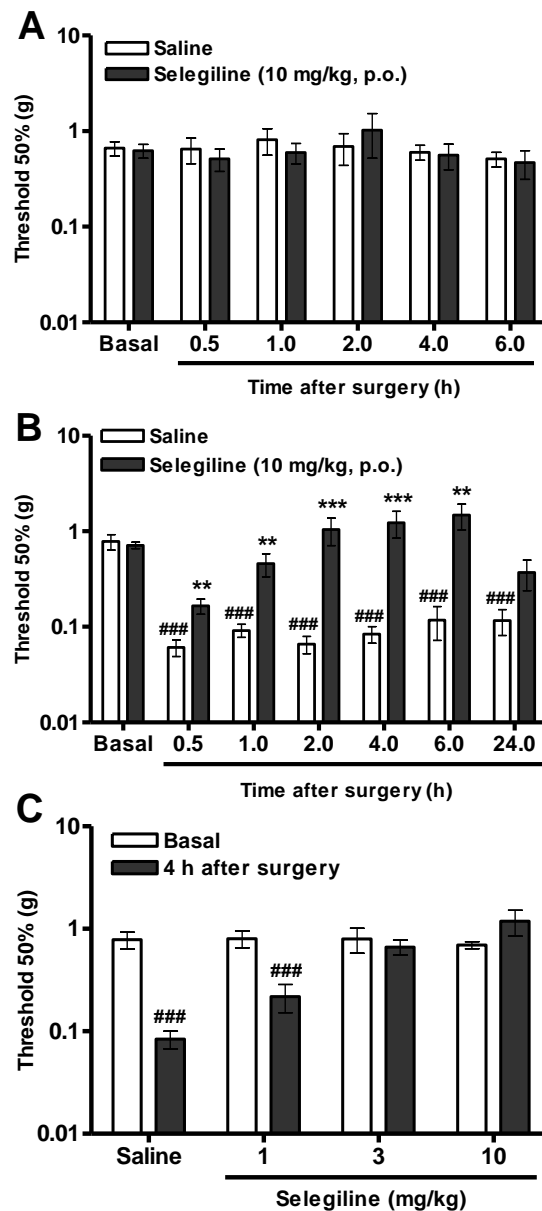


Fig. 1. Effect of selegiline pretreatment on mechanical nociceptive threshold in a mice postoperative pain model. (A) Time-course curve of paw withdrawal threshold (PWT) in sham-operated mice pretreated with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline (n=5 per group). (B) Time-course curve of PWT in plantar incision submitted mice pretreated with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline (n=7 per group). ###P<0.001 as compared with basal PWT (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test); **P<0.01 and ***P<0.001 as compared with respective control group (unpaired t test for each time point). (C) Dose-response curve of PWT in plantar incision submitted mice pretreated with selegiline (1, 3 or 10 mg/kg, p.o.) or saline (n=6-8 per group). ###P<0.001 as compared with respective basal PWT (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). Data are expressed as means \pm SEM.

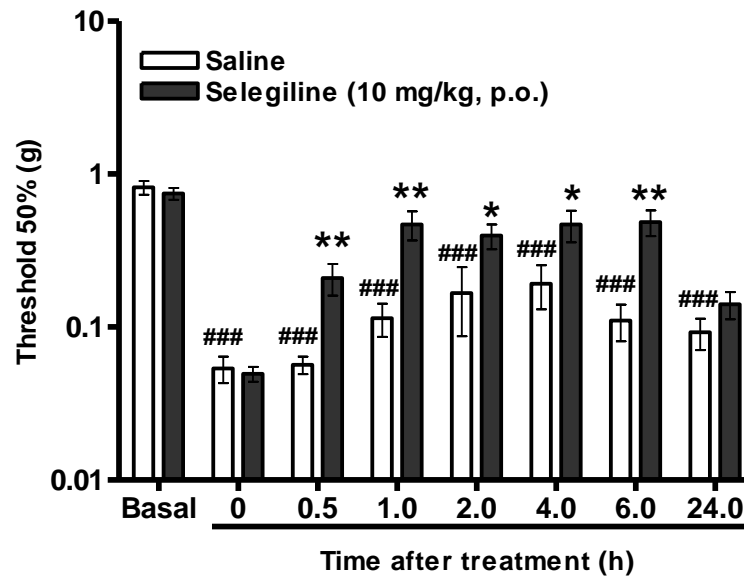


Fig. 2. Effect of post-treatment with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline on time-course curve of mechanical nociceptive threshold in a mice postoperative pain model. Data are expressed as means \pm SEM of 10 to 11 animals per group. ### $P < 0.001$ as compared with the respective basal paw withdrawal threshold (PWT) (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test); * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared with respective control group (unpaired t test for each time point or dose). The point 0 on the x-axis represents the PWT measured immediately before drug treatment.

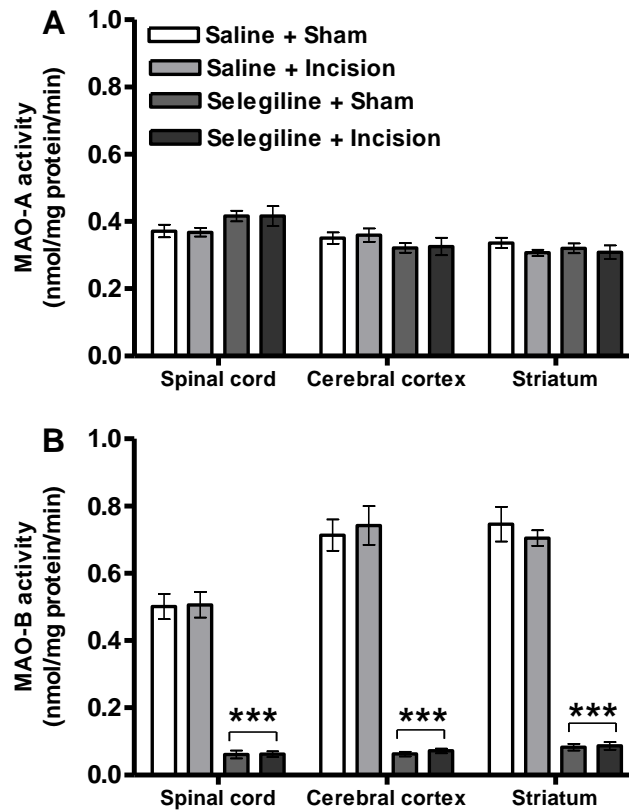


Fig. 3. Effect of pretreatment with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline on monoamine oxidase (MAO) activity in spinal cord, cerebral cortex and striatum of sham-operated or plantar incision submitted mice. (A) MAO-A activity. (B) MAO-B activity. Data are expressed as means \pm SEM of 6 to 7 animals per group. *** $P < 0.001$ as compared with Saline + Sham or Saline + Incision group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test).

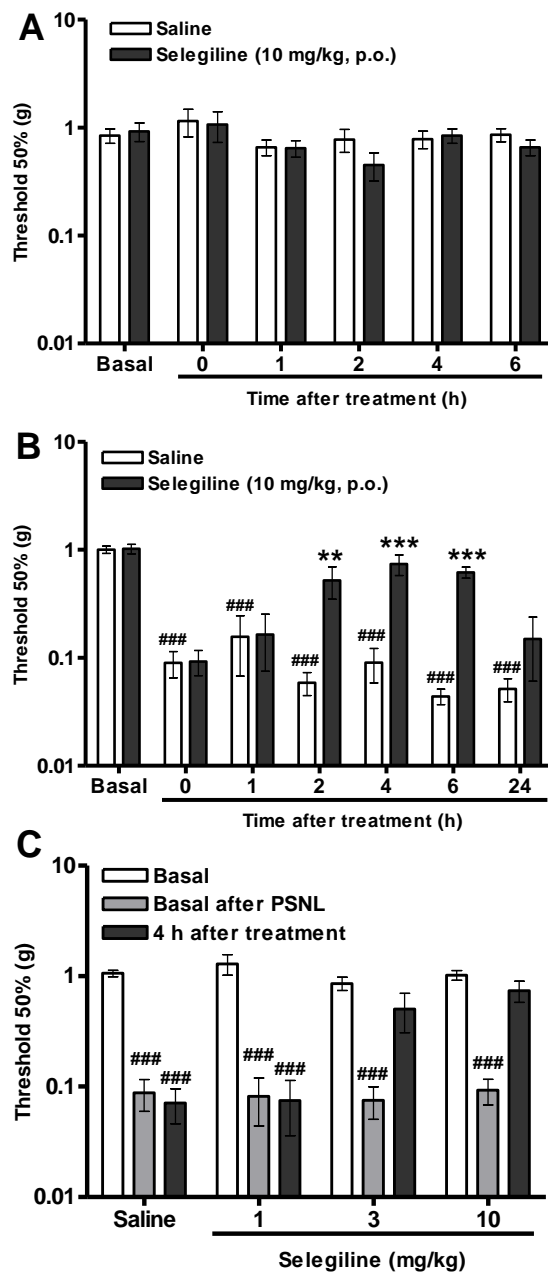


Fig. 4. Effect of selegiline treatment on mechanical nociceptive threshold in a mice neuropathic pain model. (A) Time-course curve of paw withdrawal threshold (PWT) in sham-operated mice treated with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline (n= 4 per group). (B) Time-course curve of PWT in partial sciatic nerve ligation (PSNL) submitted mice treated with selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline (n= 4-6 per group). $###P<0.001$ as compared with basal PWT (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test); $**P<0.01$ and $***P<0.001$ as compared with respective control group (unpaired t test for each time point). (C) Dose-response curve of PWT in PSNL submitted mice treated with selegiline (1, 3 or 10 mg/kg, p.o.) or saline (n= 4-6 per group). $###P<0.001$ as compared with respective PWT before PSNL (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). Data are expressed as means \pm SEM.

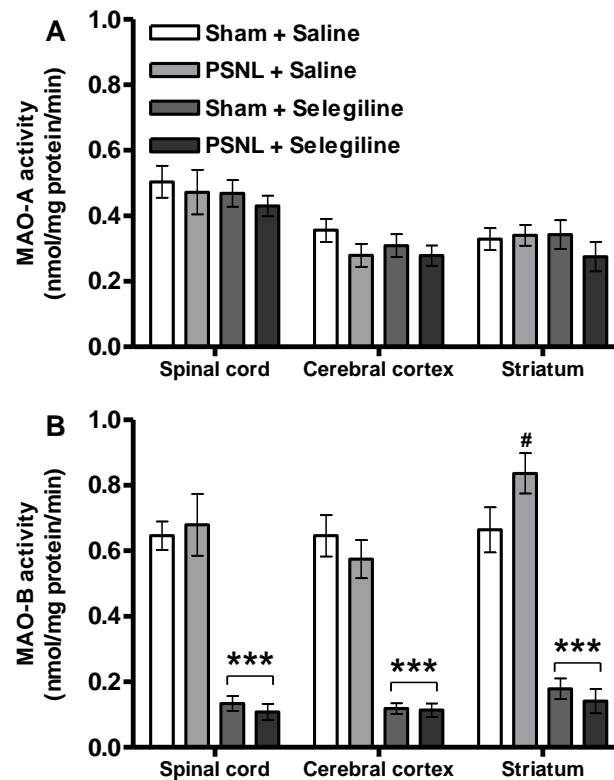


Fig. 5. Effect of selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline treatment on monoamine oxidase (MAO) activity in spinal cord, cerebral cortex and striatum of sham-operated or partial sciatic nerve ligation (PSNL) submitted mice. (A) MAO-A activity. (B) MAO-B activity. Data are expressed as means \pm SEM of 7 to 8 animals per group. [#]P < 0.05 as compared with Sham + Saline; ***P < 0.001 as compared with Sham + Saline or PSNL + saline group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test).

Table 1. Effects of selegiline (10 mg/kg, p.o.) or saline treatment on latency for the first fall (s) and total fall number in the rota-rod test in mice.

	4 h before test		5 h before test	
	Saline	Selegiline	Saline	Selegiline
Latency (s)	148.8 \pm 45.0	118.5 \pm 41.3	100.6 \pm 37.7	132.2 \pm 40.6
Fall number	0.8 \pm 0.5	1.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.6	1.5 \pm 0.8

Data are expressed as means \pm SEM of 5 to 6 animals per group.

Carta referente à submissão do artigo

Title: Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice
 Corresponding Author: Professor Juliano Ferreira
 Authors: Jardel G Villarinho; Sara M Oliveira; Cassia R Silva; Taissa N Cabreira;

Dear Professor Juliano Ferreira,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Pharmacology, Biochemistry and Behavior as an author:

<http://ees.elsevier.com/pbb/>

Your username is: JFerreirae-572

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PBB/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Pharmacology, Biochemistry and Behavior. Should you have any questions, please feel free to contact us.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
 Pharmacology, Biochemistry and Behavior

PHARMACOLOGY
 BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

Contact us Help ?

» Scopus maintenance this weekend ... [more](#)
 » EES maintenance on Sunday 14 March 8-14 GMT: site down ... [more](#)
 » New fraudulent email in circulation ... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: JFerreirae-572
 Role: Author ▼

Version: EES 2009.1

Submissions Being Processed for Author Juliano Ferreira

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

Action ▲▼	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
Action Links		Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice	Mar 10, 2010	Mar 10, 2010	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

5. DISCUSSÃO

A dor pós-operatória é um fenômeno complexo que inclui fatores sensoriais, emocionais e comportamentais. A incidência e a severidade dessa forma de dor aguda são dependentes de diversos fatores, incluindo o tipo de procedimento cirúrgico, e são muito variáveis de paciente a paciente. Apesar dos avanços recentes no entendimento da dor pós-operatória, estudos clínicos indicam que o tratamento dessa forma de dor continua bastante insatisfatório (SWARM *et al.*, 2001). Isso ocorre em parte porque poucos estudos têm sido direcionados aos mecanismos responsáveis pela dor aguda manifestada após uma cirurgia (ZAHN *et al.*, 2002). No presente estudo, foi avaliado um possível envolvimento da MAO-B em um modelo de dor pós-operatória em camundongos. O inibidor seletivo e irreversível da MAO-B, selegilina (10 mg/kg), foi capaz de reverter a alodínia mecânica induzida pela incisão plantar, mostrando um efeito antinociceptivo de 0,5 até 6 h após o tratamento. Uma vez que a administração de analgésicos antes de uma cirurgia pode prevenir ou ao menos diminuir a dor pós-operatória, nós avaliamos também o efeito da selegilina em um protocolo de pré-tratamento. Foi observado que a selegilina preveniu o desenvolvimento de alodínia mecânica induzida pela incisão plantar, mostrando um efeito anti-alodínico até 7 h após o tratamento (6 h após a incisão). Esses resultados mostram que a selegilina apresentou um efeito antinociceptivo, sugerindo, assim, um possível envolvimento da MAO-B na dor pós-operatória.

Em concordância com nossos resultados, Serý e colaboradores (2006) demonstraram a existência de uma relação entre um polimorfismo funcional da MAO-B e a intensidade de dor pós-operatória em sujeitos do sexo masculino. Os autores observaram que os pacientes que possuíam o genótipo G no íntron 13 do gene da MAO-B apresentaram maior intensidade de dor pós-operatória do que os pacientes com o genótipo A, sugerindo que a MAO-B poderia estar envolvida na percepção da intensidade da dor. Nesse estudo, nós determinamos a atividade *ex vivo* da MAO em camundongos submetidos à incisão plantar ou falso-operados pré-tratados com salina ou selegilina (10 mg/kg). A incisão plantar não alterou ambas as atividades da MAO-A e da MAO-B quando comparadas às atividades dos animais falso-operados. Como esperado, a selegilina foi capaz de causar uma inibição pronunciada na atividade da MAO-B, sem afetar a atividade da MAO-A em ambos os grupos incisão e falso-operado. Diferentemente dos resultados observados no estudo de polimorfismo em humanos, nós não encontramos nenhuma diferença

tanto na intensidade da dor quanto no efeito antinociceptivo da selegilina quando foram utilizados camundongos machos ou fêmeas. Em acordo com esse resultado, Kroin e colaboradores (2003) também não encontraram diferença entre os gêneros na percepção da dor pós-operatória, assim como na resposta a fármacos analgésicos em ratos.

Uma vez que fármacos que alteram a função motora podem afetar os resultados obtidos em testes comportamentais que avaliam respostas reflexivas, podendo produzir um falso efeito antinociceptivo (NEGUS *et al.*, 2006), os camundongos foram avaliados no teste do cilindro giratório. A selegilina (10 mg/kg) não causou alterações em ambos a latência para a primeira queda e o número total de quedas, indicando que o efeito antinociceptivo da selegilina não foi mediado por uma alteração da coordenação motora dos animais.

Foi avaliado também o efeito da selegilina em um modelo de dor crônica em camundongos. Dentre as síndromes dolorosas crônicas encontra-se a dor neuropática, uma condição debilitante que frequentemente resulta de uma lesão parcial de um nervo periférico e é comumente resistente às intervenções terapêuticas comuns (WOOLF & MANNION, 1999). O modelo de dor neuropática utilizado nesse estudo foi o de ligação parcial do nervo ciático (PSNL). Nós observamos que os animais submetidos à PSNL apresentaram uma diminuição significativa no limiar mecânico sete dias após a cirurgia, a qual foi revertida pela selegilina (10 mg/kg) de 2 até 6 h após o tratamento. A selegilina também inibiu a atividade da MAO-B em todas as estruturas analisadas tanto nos camundongos falso-operados quanto nos submetidos à PSNL. Como esperado, a atividade da MAO-A não foi alterada pelo tratamento com selegilina. Diferentemente do que foi observado no modelo de dor pós-operatória, os camundongos submetidos à PSNL exibiram um aumento na atividade da MAO-B no estriado quando comparados aos animais falso-operados, o qual foi abolido pelo tratamento com selegilina. Nesse contexto, estudos de imagens do SNC frequentemente mostram fluxo sanguíneo cerebral aumentado no estriado durante vários tipos de dor (COGHILL *et al.*, 1999; IADAROLA *et al.*, 1998). Além disso, tem sido proposto que os níveis de dopamina no estriado possuem um papel importante na regulação da dor, o qual parece ser mediado pelos receptores D₂ (HAGELBERG *et al.*, 2004). Uma vez que mecanismos de plasticidade neuronal estão claramente relacionados com a hipersensibilidade à dor característica de distúrbios dolorosos crônicos (COSTIGAN *et al.*, 2009;

WOOLF & SALTER, 2000), esse aumento na atividade da MAO-B poderia refletir uma expressão aumentada desta enzima, a qual poderia ser importante para o desenvolvimento da dor neuropática.

A MAO-B é uma enzima importante para o metabolismo de monoaminas e aminas traço, como dopamina e PEA, respectivamente. Diversos estudos indicam que a dopamina desempenha um papel importante na dor e na analgesia e que agonistas dopaminérgicos possuem efeito antinociceptivo em diferentes modelos animais de dor (ALTIER & STEWART, 1999; WOOD, 2008). Além disso, tem sido mostrado que a PEA e seus derivados também apresentam ação antinociceptiva em camundongos (GIARDINA, 1974; MATSUOKA *et al.*, 1988; MATSUOKA *et al.*, 1993). Por exemplo, Ukponmwan e colaboradores (1986) demonstraram que o efeito antinociceptivo de um inibidor da enzima encefalinase foi potencializado tanto pelo inibidor da MAO-B, selegilina, quanto pelo substrato da MAO-B, PEA em ratos, sugerindo que esta amina poderia mediar a atividade analgésica de encefalinas endogenamente liberadas. Tem sido postulado que a PEA pode agir como um neuromodulador no SNC (BERRY *et al.*, 2004). Esta amina pode ainda alterar a função dos transportadores de monoaminas devido à sua ação no receptor associado à amina traço (TAAR1), potencializando, assim, a neurotransmissão monoaminérgica (XIE & MILLER, 2008). Logo, o efeito antinociceptivo da selegilina poderia ser mediado, ao menos em parte, por um aumento nos níveis de dopamina e PEA no SNC. Por outro lado, a inibição da MAO-B pode diminuir as concentrações de metabólitos formados na reação de desaminação oxidativa, como peróxido de hidrogênio e aldeídos, os quais poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento da nocicepção (KEEBLE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2004; TREVISANI *et al.*, 2007). Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a participação de monoaminas específicas e seus metabólitos no efeito antinociceptivo da selegilina.

Com o propósito de investigar se uma dose de selegilina sem efeito antinociceptivo seria efetiva em inibir a atividade da MAO-B, foram avaliados os efeitos da dose de 1mg/kg de selegilina na atividade dessa enzima. Nós observamos que essa dose, que não apresentou efeito antinociceptivo em nenhum dos modelos de dor utilizados, não foi capaz de inibir a atividade da MAO-B, sugerindo que a inibição da MAO-B parece estar relacionada ao efeito antinociceptivo da selegilina. Todavia, tem sido descrito que a selegilina apresenta outras propriedades, independentes de seu efeito inibitório sobre a MAO-B, como atividades antioxidante

e neuroprotetora (LE *et al.*, 1997; MARUYAMA & NAOI, 1999; YODIM & BAKHLE, 2006; ZHU *et al.*, 2008). Em vista disso, embora nossos resultados sugiram que a ação antinociceptiva da selegilina esteja relacionada com sua propriedade inibitória da MAO-B, nós não podemos excluir a possibilidade de que a selegilina possa estar agindo por um mecanismo independente da MAO-B.

Devido ao papel importante da MAO-B na regulação dos níveis de dopamina no SNC humano, os inibidores dessa enzima são úteis para o tratamento de patologias relacionados com a diminuição nos níveis desse neurotransmissor, como a doença de Parkinson (YODIM *et al.*, 2006). Além dos distúrbios motores, os pacientes acometidos por essa doença apresentam também sintomas não motores, dentre os quais se encontra a dor (BEISKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2006; TINAZZI *et al.*, 2006). Além disso, camundongos tratados com MPTP, uma neurotoxina utilizada em modelos animais de Parkinson, exibem um comportamento nociceptivo aumentado, o qual parece estar relacionado com lesões nas vias dopaminérgicas causadas pelo MPTP (ROSLAND *et al.*, 1992). Em vista disso, seria interessante investigar um possível envolvimento da MAO-B em modelos de dor induzidos por agentes parkinsonianos, como o MPTP. Dessa forma, a selegilina, além de seu efeito no tratamento da doença de Parkinson, poderia também ser útil no alívio da dor apresentada pelos pacientes acometidos por essa patologia.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a selegilina apresentou efeito antinociceptivo em modelos de dor pós-operatória aguda e neuropática crônica, sugerindo um potencial envolvimento da MAO-B nos mecanismos dessas condições dolorosas e uma possível utilidade de seus inibidores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A selegilina apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de dor pós-operatória nos protocolos de pré e pós-tratamento;
- A incisão plantar não causou alteração na atividade de ambas as isoformas MAO e o tratamento com selegilina foi eficaz em inibir seletivamente a atividade da MAO-B em todas as estruturas analisadas;
- O tratamento com selegilina também exibiu efeito antinociceptivo em um modelo de dor neuropática;
- A ligação parcial do nervo ciático induziu um aumento na atividade da MAO-B no estriado, o qual foi revertido pelo tratamento com selegilina.

7. PERSPECTIVAS

Nossos resultados sugerem uma possível participação da MAO-B nos mecanismos das dores pós-operatória e neuropática, contudo novos estudos são necessários para elucidar os mediadores envolvidos no efeito antinociceptivo da selegilina. Desta forma, pretendemos:

- Avaliar a participação do sistema monoaminérgico no efeito antinociceptivo da selegilina, por meio da utilização de antagonistas específicos, assim como determinação dos níveis de monoaminas em diferentes regiões cerebrais de animais submetidos aos modelos de dor pós-operatória e neuropática;
- Determinar a expressão da MAO-B em estruturas específicas (como estriado), por meio da utilização de técnicas de Western blot e imunohistoquímica em animais submetidos aos modelos de dor pós-operatória e neuropática;
- Investigar um possível efeito antinociceptivo da selegilina em um modelo de dor relacionada à doença de Parkinson.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAY, B. G.; VON KNORRING, L.; ORELAND, L. **Platelet MAO in patients with idiopathic pain disorders.** J Neural Transm 69:243-53, 1987.
- ALTIER, N.; STEWART, J. **The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia.** Life Sci 65:2269-87, 1999.
- APAYDIN, S. *et al.* **The antinociceptive effect of moclobemide on the vocalization threshold to paw pressure in a rat model of unilateral mononeuropathy.** Pharmacol Res 44:503-7, 2001.
- ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. **Management of chronic pain.** Lancet 353:1865-9, 1999.
- BACH, A. W. J. *et al.* **cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties.** Proc Natl Acad Sci 85:4934-8, 1988.
- BAIR, M. J. *et al.* **Depression and pain comorbidity: a literature review.** Arch Intern Med 163:2433-45, 2003.
- BEISKE, A. G. *et al.* **Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics.** Pain 141:173-7, 2009.
- BERRY, M. D. **Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators.** J Neurochem 90:257-71, 2004.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. **New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines.** Nat Rev Neurosci 7:137-51, 2006.
- BIANCHI, M.; MANTEGAZZA, P.; PANERAI, A. E. **Effects of two different reversible monoamine oxidase-A inhibitors on nociceptive thresholds in the rat.** Eur J Pharmacol 219:113-6, 1992.
- COGHILL, R. C. *et al.* **Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism.** J Neurophysiol 82:1934-43, 1999.
- COLLINS, G. G. *et al.* **Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase.** Nature 225:817-20, 1970.

COSTIGAN, M. et al. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. Annu Rev Neurosci 32:1-32, 2009.

CRAIG, A. D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. Curr Opin Neurobiol 13: 500-505, 2003.

DINA, O. A. et al. Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. Eur J Neurosci 28:1180-90, 2008.

FEINMANN, C. Pain relief by antidepressants: possible modes of action. Pain 23:1-8, 1985.

FORNAI, F. et al. Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: a brain dialysis study. J Neurochem 73:2434-40, 1999.

GIARDINA, W. J. Analgesic properties of phenylethylamine and phenylethanolamine in mice. Pharmacology 12:1-6, 1974.

GIUFFRIDA, R. Pain in Parkinson's disease. Rev Neurol (Paris) 161:407-18, 2005.

GLOVER, V. et al. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. Nature 265:80-1, 1977.

GRIMSBY, J. et al. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. Proc Natl Acad Sci 88:3637-41, 1991.

HAGELBERG, N. et al. Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. Eur J Pharmacol 500:187-92, 2004.

HARDEN, N.; COHEN, M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. J Pain Symptom Manage 25:S12-7, 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Hereditary variations in monoamine oxidase as a risk factor for Parkinson's disease. Mov Disord 9:305-10, 1994.

- HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. **The molecular dynamics of pain control.** Nat Rev Neurosci 2: 83-91, 2001.
- IADAROLA, M. J. *et al.* **Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET.** Brain 121:931-47, 1998.
- JAHNG, J. W. *et al.* **Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization.** Synapse 25:30-6, 1997.
- JOHNSTON, J. P. **Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue.** Biochem Pharmacol 17:1286-97, 1968.
- KALSO, E. **Pharmacological Management of Pain: Anticonvulsants, Antidepressants, and Adjuvant Analgesics.** In: Justins, D. C. (ed). Pain 2005 – An updated review: refresher course syllabus. Seattle: IASP Press, pp. 19-29, 2005.
- KEEBLE, J. E. *et al.* **Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms.** Pain 141:135-42, 2009.
- KIM, H. K. *et al.* **Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain.** Pain 111:116-24, 2004.
- KROIN, J. S. *et al.* **Postoperative pain and analgesic responses are similar in male and female Sprague-Dawley rats.** Can J Anaesth 50:904-8, 2003.
- LE, W. *et al.* **(-)-Deprenyl protection of 1-methyl-4 phenylpyridium ion (MPP⁺)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition.** Neurosci Lett 224:197-200, 1997.
- LEE, M. A. *et al.* **A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease.** J Pain Symptom Manage 32:462-9, 2006.
- LETRO, G. H.; QUAGLIATO, E. M.; VIANA, M. A. **Pain in Parkinson's disease.** Arq Neuropsiquiatr 67:591-4, 2009.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F. *et al.* **Half a century of antidepressant drugs – On the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics.**

- Part I: Monoamine oxidase inhibitors.** J Clin Psychopharmacol 27:555-9, 2007.
- LYNCH, M. E. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials.** J Psychiatry Neurosci 26:30-6, 2001.
- MAGYAR, K.; KNOLL, J. Selective inhibition of the "B form" of monoamine oxidase.** Pol J Pharmacol Pharm 29:233-46, 1977.
- MARUYAMA, W.; NAOI, M. Neuroprotection by (-)-deprenyl and related compounds.** Mech Ageing Dev 111:189-200, 1999.
- MATSUOKA, Y. et al. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the relation of endogenous norepinephrine to phenylethylamine analog-induced antinociception.** Jpn J Pharmacol 48:263-72, 1988.
- MATSUOKA, Y. et al. Characteristics of antinociception induced by noncatecholic phenylethylamine derivatives: the involvement of alpha-2-adrenoceptors.** Jpn J Pharmacol 63:101-8, 1993.
- MENKES, D. B. et al. Moclobemide in chronic neuropathic pain: preliminary case reports.** Clin J Pain 11:134-8, 1995.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain.** 2 ed. Seattle: IASP Press, pp. 209-14, 1994.
- MEYER, J. H. et al. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression.** Arch Gen Psychiatry 63:1209-16, 2006.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain.** Prog Neurobiol 66:355-474, 2002.
- MONGINI, F. et al. Muscle tenderness in different types of facial pain and its relation to anxiety and depression: A cross-sectional study on 649 patients.** Pain 131:106-11, 2007.
- NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges.** J Pharmacol Exp Ther 319:507-14, 2006.

- NICHOLSON, B.; VERMA, S. **Comorbidities in chronic neuropathic pain.** Pain Med 5:S9-27, 2004.
- PIRILDAR, S. *et al.* **A preliminary open-label study of moclobemide treatment of pain disorder.** Psychopharmacol Bull 37:127-34, 2003.
- POGATZKI-ZAHN, E. M.; ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. **Postoperative pain--clinical implications of basic research.** Best Pract Res Clin Anaesthesiol 21:3-13, 2007.
- RIEDERER, P.; JELLINGER, K. **Neurochemical insights into monoamine oxidase inhibitors, with special reference to deprenyl (selegiline).** Acta Neurol Scand Suppl 95:43-55, 1983.
- ROBINSON, D. S. **Monoamine oxidase inhibitors: a new generation.** Psychopharmacol Bull 36:124-38, 2002.
- ROSLAND, J. H. **Acute and long term effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in tests of nociception in mice.** Pharmacol Toxicol 70:31-7, 1992.
- SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P. **Activation of I(2)-imidazoline receptors enhances supraspinal morphine analgesia in mice: a model to detect agonist and antagonist activities at these receptors.** Br J Pharmacol 130:146-52, 2000.
- SAURA, J. *et al.* **Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidase A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization.** Neuroscience 70:755-74, 1996.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. **Can we conquer pain?.** Nat neurosci 5:1062-7, 2002.
- SCHREIBER, S. *et al.* **The antinociceptive effect of moclobemide in mice is mediated by noradrenergic pathways.** Neurosci Lett 253:183-6, 1998.
- SERÝ, O. *et al.* **The association of monoamine oxidase B functional polymorphism with postoperative pain intensity.** Neuro Endocrinol Lett 27:333-7, 2006.

- SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. **Monoamine oxidase: from genes to behavior.** *Annu Rev Neurosci* 22:197–217, 1999.
- SINDRUP, S. H. *et al.* **Antidepressants in the treatment of neuropathic pain.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96:399-409, 2005.
- SWARM, R. A.; KARANIKOLAS, M.; KALAUOKALANI, D. **Pain treatment in the perioperative period.** *Curr Probl Surg* 38:835-920, 2001.
- TINAZZI, M. *et al.* **Pain and motor complications in Parkinson's disease.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:822-5, 2006.
- TREVISANI, M. *et al.* **4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13519-24, 2007.
- UKPONMWAN, O. E.; RUPREHT, J.; DZOLJIC, M. **An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 332:376-9, 1986.
- VACCARINO, A. L. *et al.* **Multiple pain complaints in patients with major depressive disorder.** *Psychosom Med* 71:159-62, 2009.
- VON KORFF, M.; SIMON, G. **The relationship between pain and depression.** *Br J Psychiatry Suppl* 30:101-8, 1996.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. **Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states.** *Physiol Rev* 82:981-1011, 2002.
- WESTLUND, K. N. *et al.* **Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain.** *Science* 250:181-3, 1985.
- WOOD, P. B. **Role of central dopamine in pain and analgesia.** *Expert Rev Neurother* 8:781-97, 2008.
- WOOLF, C. J.; MA, Q. **Nociceptors--noxious stimulus detectors.** *Neuron* 55:353-64, 2007.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** Lancet 353:1959-64, 1999.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. **Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.** Science 288:1765-9, 2000.

XIE, Z.; MILLER, G. M. **Beta-phenylethylamine alters monoamine transporter function via trace amine-associated receptor 1: implication for modulatory roles of trace amines in brain.** J Pharmacol Exp Ther 325:617-28, 2008.

YOU DIM, M. B.; BAKHLE, Y. S. **Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness.** Br J Pharmacol 147:S287-96, 2006.

YOU DIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TRIPTON, K. F. **The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors.** Nat Rev Neurosci 7:295-309, 2006.

ZAHN, P.K.; POGATZKI, E. M.; BRENNAN, T. J. **Mechanisms for pain caused by incisions.** Reg Anesth Pain Med 27:514-6, 2002.

ZHU, W. *et al.* **Comparison of neuroprotective and neurorestorative capabilities of rasagiline and selegiline against lactacystin-induced nigrostriatal dopaminergic degeneration.** J Neurochem 105:1970-8, 2008.