

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

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS
ADENOSINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NO
EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UM DERIVADO DO
SELENOESTEROL EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO
AGUDA EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcel Henrique Marcondes Sari

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS ADENOSINÉRGICO E
DOPAMINÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UM
DERIVADO DO SELENOESTEROL EM MODELOS DE
NOCICEPÇÃO AGUDA EM CAMUNDONGOS**

Marcel Henrique Marcondes Sari

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para
obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Wayne Nogueira

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sari, Marcel Henrique Marcondes
Envolvimentos dos Sistemas Adenosinérgico e
Dopaminérgico no Efeito Antinociceptivo de um Derivado
do Selenoesterol em Modelos de Nocicepção Aguda em
Camundongos / Marcel Henrique Marcondes Sari.-2014.
66 p.; 30cm

Orientadora: Cristina Wayne Nogueira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2014

1. Nocicepção 2. Selênio 3. Camundongos 4. Sistema
Adenosinérgico 5. Sistema Dopaminérgico I. Nogueira,
Cristina Wayne II. Título.

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

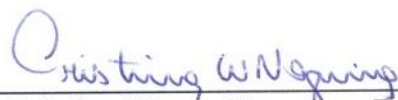
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS ADENOSINÉRGICO E
DOPAMINÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UM
DERIVADO DO SELENOESTEROL EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO
AGUDA EM CAMUNDONGOS**

elaborada por
Marcel Henrique Marcondes Sari

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:



Cristina Wayne Nogueira, Dr.^a
(Presidente, Orientadora)



Marina Prigol, Dr.^a (UNIPAMPA)



Eluza Curte Stangherlin, Dr.^a (UFSM)

Santa Maria, 1º de agosto de 2014.

“Filho, o que é teu tá guardado...confie na sabedoria da VIDA, sempre!”

Dedico esta dissertação à minha família, especialmente aos meus pais, Gilmar e Angelita, ao meu irmão, Marlon, e aos meus avós, Neri e Sebastião, pelo amor e dedicação incondicionais.

Gostaria de dedicar também às pessoas que, além deles, foram essenciais ao longo desses anos todos:

À Luana Mota Ferreira;

À Natássia da Rocha e Souza;

À minha mãe científica, Ana Cristina Guerra de Souza;

À minha orientadora, Cristina Wayne Nogueira.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus e todas as demais entidades por me guiar no decorrer de toda a vida até então, por me auxiliarem diariamente, promovendo minha evolução e crescimento, e acima de tudo pela magnífica oportunidade de estar vivo.

Aos meus pais, Angelita e Gilmar, que são uma dádiva na minha vida. Por tudo que me proporcionam, pelo amor, dedicação e apoio incondicionais. Pelo incentivo e preocupação diários. Nesses anos todos que se passaram, o mais difícil não foram os constantes desafios da faculdade, muito menos as situações complicadas que precisei enfrentar, mas sim a distância física que nos separa. Eu amo muito vocês! Não menos importante, agradeço ao meu irmão, meu parceiro querido que me orgulha muito, e aos meus avós amados, Neri e Sebastião, pela oportunidade fornecida, por sempre estarem presentes e apoiarem as minhas escolhas...sou sem sombra de dúvidas abençoado por ter vocês na minha vida! Agradeço aos demais familiares, que apesar de distantes fazem parte disso tudo!

Agradeço à Toebe, Eminha, toda a família Rocha, em especial ao Mateus, que também fazem parte da minha família. Aos amigos das antigas, por todos os momentos e recordações.

Ao grupo “Estrela de Saint Germain”, pelos incansáveis pensamentos positivos e orações!

À Cris, minha orientadora, pela oportunidade de estar trabalhando neste grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e valores transmitidos. Levo a tua conduta como um exemplo de profissionalismo e dedicação e como prova de que quando se ama o que faz, se desperta o melhor nas pessoas. Acima de tudo, te agradeço por me acolher e criar, permitindo que eu chegasse onde estou hoje! Agradeço de igual proporção ao GZ, pela parceria, consideração e incentivo diários, orientando sempre que preciso!

À Aninha, minha mãe científica, pelo carinho e atenção dedicados. Por ter acreditado no meu potencial e jamais permitir que eu desistisse. Gostaria que tu soubesses que tua contribuição foi essencial para que esse momento se concretizasse!

À Luana e à Natássia, por tudo o que já passamos juntos. Pela amizade magnífica que construímos, da qual tenho muito orgulho. Carrego vocês comigo, no meu coração, sempre!

Agradeço também à grande família LASRAFTO, pela imensidade de conhecimento e inúmeros momentos de parceria compartilhados. Gostaria de dedicar um espaço particular para a Suzan, minha parceria desde a Farmácia/2008, e para a Váva, minha IC querida, obrigado por estarem sempre presentes!

Aos que a faculdade me trouxe, tornando meus dias muito melhores. Em especial à “TLJCM” e à turma 13!

Ao professor Oscar e ao Diego, pela síntese do selenoesterol!

À Marina e à Eluza, que gentilmente aceitaram o convite para compor minha banca de dissertação e avaliar este trabalho.

Ao Rinaldo e à tia Teresa, por facilitarem muito nosso trabalho.

Aos órgãos de fomento, à UFSM, ao PPGBTOX e seus professores.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS ADENOSINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE UM DERIVADO DO SELENOESTEROL EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA EM CAMUNDONGOS

AUTOR: MARCEL HENRIQUE MARCONDES SARI
ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 1º de agosto de 2014.

A dor é uma sensação complexa, multifatorial e de caráter protetor, mas quando prolongada traz desconforto e reduz consideravelmente a qualidade de vida, requerendo controle imediato. O tratamento farmacológico disponível para essas condições apesar de eficiente é, muitas vezes, também limitado e insuficiente. Tendo isso em vista e considerando o potencial farmacológico já reportado de compostos orgânicos sintéticos de selênio, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo do *p*-cloro-selenoesterol (PCS), um derivado de selenoesterol, em modelos de nocicepção aguda em camundongos, assim como propor mecanismos de ação para este efeito e concomitante a avaliação de possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração. Os resultados demonstraram que o tratamento com PCS (10 mg/kg, pela via intragástrica [i.g.]) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo tanto nos modelos de nocicepção química, teste das contorções induzidas pelo ácido acético, teste do glutamato e teste da formalina, como no de nocicepção térmica, imersão da cauda. O pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, intraperitoneal [i.p.], antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos), SCH58261 (3 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A_{2A}), SCH23390 (0,05 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores dopaminérgicos do subtipo D₁) e sulpirida (5 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores dopaminérgicos do subtipo D₂ e D₃), reduziu a ação antinociceptiva do PCS. O pré-tratamento com os antagonistas do sistema serotoninérgico (WAY100625, 0,7 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores do subtipo 5-HT₁, Ketanserina, 0,3 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores do subtipo 5-HT_{2A/2C}, e Ondasentrona, 0,5 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores do subtipo 5-HT₃) e opioide (naloxona, 1 mg/kg, subcutâneo, antagonista não-seletivo de receptores opioides) e a via do

óxido nítrico (L-Arginina, 600 mg/kg, i.p., substrato da enzima óxido nítrico sintase) não alteraram o efeito antinociceptivo exercido pela administração do PCS. Além disso, o tratamento com o PCS (10 mg/kg, i.g.) não causou alteração na atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT, respectivamente), nem nos níveis plasmáticos de ureia, colesterol e triglicérides, e na atividade locomotora e exploratória dos animais. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que a administração do PCS apresentou efeito antinociceptivo em distintos modelos animais de dor aguda, com possível participação dos sistemas adenosinérgico e dopaminérgico nesta ação, sem desencadear efeitos tóxicos.

Palavras-chave: nocicepção, selênio, camundongos, sistema adenosinérgico, sistema dopaminérgico.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Postgraduate Programme in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria

CONTRIBUTION OF ADENOSINERGIC AND DOPAMINERGIC SYSTEMS IN THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF A SELENOSTEROID DERIVED IN ACUTE MODELS OF NOCICEPTION IN MICE

AUTHOR: MARCEL HENRIQUE MARCONDES SARI

ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Date and Place of the Defense: Santa Maria, august 1st, 2014.

Pain is a complex, multifactorial and protective process essential to the preservation of the integrity of the organisms, but when it becomes persistent its presence is devastating, which considerably reduces the well-being and requires immediate interventions. However, even the drug available therapy exerts relative efficacy, there are some limitations about its use. Taking it into account and the potential pharmacological effects already been described to synthetic organoselenium compounds, the aims of this study were to evaluate the antinociceptive effect of a selenosteroid devirated, p-chloro-selenosteroid (PCS), in acute animal models of nociception as well as to propose the mechanisms by which PCS elicits antinociception and if treatment with PCS triggers any toxic effect. The results showed that the administration of PCS (10 mg/kg, intragastrically, i.g.) significantly reduced nociception behaviours in chemical nociception tests, writhing test induced by acetic acid, glutamate test and formalin test, and thermal nociception test, tail-immersion test. Pre-treatment with caffeine (3 mg/kg, intraperitoneally [i.p.], a non-selective antagonist at adenosinergic receptors), SCH58261 (3 mg/kg, i.p., a selective antagonist at A_{2A} adenosinergic receptors), SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p., a selective antagonist at D₁ dopaminergic receptors) and sulpiride (5 mg/kg, i.p., a selective antagonist at D₂ and e D₃ dopaminergic receptors) caused a reduction in the antinociceptive action of PCS. By contrast, pretreatment with WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT₁ dopaminergic receptors), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} dopaminergic receptors), ondansetron (0.5 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT₃ dopaminergic receptors), L-arginine (600 mg/kg, i.p.) and naloxone (1 mg/kg, subcutaneous [s.c.], a non-selective antagonist at opiod receptors) did not abolish the antinociceptive effect caused by PCS administration. Besides, PCS administration did not caused any alteration neither in plasma aspartate and alanine

aminotransferase activities (AST and ALT, respectively), nor in plasma levels of urea, cholesterol and triglycerides, as well as in locomotor and exploratory activities in the animals. In conclusion, the results showed that PCS had antinociceptive action in different models of pain without causing acute toxic effects in mice. The contribution of adenosinergic and dopaminergic systems was demonstrated in PCS action.

Keywords: nociception, selenium, mice, adenosinergic system, dopaminergic system.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Representação da Via Aferente de Transmissão Nociceptiva	17
Figura 2. Representação das Diferentes Fibras de Condução e seu Tempo de Resposta.....	19
Figura 3. Representação da Via Aferente Primária e sua Ligação com a Medula Espinhal ...	20
Figura 4. Relação entre a intensidade do estímulo e a resposta nociceptiva do organismo em condições fisiológicas e em condições patológicas	23
Figura 5. Estrutura Molecular de Alguns Compostos Orgânicos Sintéticos de Selênio cuja Atividade Antinociceptiva já foi Reportada	34
Figura 6. Esquema Representativo da Síntese de Selenoesteróis.....	35

Artigo

Figura 1. Chemical Structure of p-chloro-selenosteroid (PCS)	39
Figura 2. Effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) on acetic acid-induced writhing movements.....	41
Figura 3. Effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) on licking behavior induced by glutamate in mice. .	41
Figura 4. Effect of PCS on licking behavior induced by formalin in mice.....	41
Figura 5. Effect of PCS in tail-immersion test.....	42
Figura 6. Effect of pretreatment of animals with caffeine (3 mg/kg, i.p.) and SCH5860 (3 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive profiles of PCS(10mg/kg,i.g.) in glutamate- induced licking behavior.	42
Figura 6. Effect of pretreatment of animals with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) and sulpiride (5mg/kg, i.p.) on the antinociceptive profiles of PCS (10 mg/kg, i.g.) against glutamate-induced licking behavior.	43
Tabela 1. Effect of pretreatment with PCS (mg/kg, i.g.) against formalin test in mice.	42

*Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.*
Autor Desconhecido.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatório não Esteroidal

AE – Anti-inflamatório Esteroidal

COX – Ciclo-oxigenase

COX 1 – Ciclo-oxigenase isoforma 1

COX 2 – Ciclo-oxigenase isoforma 2

GABA - ácido- γ -aminobutírico

GABA_A – Receptor Ionotrópico do subtipo A para o ácido- γ -aminobutírico

IASP – International Association of the Study of Pain

IDR – Ingesta Diária Recomendada

OMS – Organização Mundial de Saúde

SCH23390 - R-(+)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepine-7-ol

SCH58261 - 5-Amino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)-pirazol(4,3-e)-1,2,4-triazol(1,5-c)pirimidina

SNC – Sistema Nervoso Central

WAY100625 -[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]- N-(2- piridil)ciclohexanocarboxamida

(PhSe)₂ – Disseleneto de difenila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Dor	15
1.1.1. Definição	17
1.1.2. Dor Fisiológica.....	17
1.1.3. Dor Patológica.....	22
1.1.3.1. Dor Inflamatória.....	23
1.1.3.2. Dor Neuropática	25
1.1.4. Estratégias Terapêuticas	26
1.1.4.1. Terapia Farmacológica.....	26
1.1.4.1.1. Anti-inflamatórios não esteroidais	27
1.1.4.1.2. Opioides	28
1.1.4.1.3. Anti-inflamatórios Esteroidais	28
1.1.4.1.1. Terapia Farmacológica Adjuvante	29
1.1.4.2. Terapia não Farmacológica	30
1.2. Selênio	31
1.2.1. Características Gerais.....	31
1.2.2. Propriedades Biológicas.....	31
1.2.3. Compostos Orgânicos Sintéticos de Selênio.....	32
1.2.3.1. Selenoesteróis.....	34
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. RESULTADOS	37
4. CONCLUSÃO	46
5. PERSPECTIVAS	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

A dor faz parte da vida, estando presente ao longo de todas as etapas de desenvolvimento do organismo, do nascimento à morte, dessa forma, tanto seres humanos como demais seres vivos estão sujeitos à mesma em algum momento de sua existência (ROCHA et al., 2007). A palavra dor é derivada do latim *dolore* e do grego *poine*, as quais significam penalidade ou punição (KERN, 1987), uma associação coerente, porém incompleta, com a complexidade do estado da dor. Muito além disso, a dor é um processo essencial para a sobrevivência, tanto que a insensibilidade parcial ou absoluta a esta, levando-se em conta apenas condições fisiológicas, está relacionada com graves problemas, em menor escala, como queimaduras e arranhões, a estados mais intensos, como auto-mutilação ou amputação. Reforçando sua importância, desde 2000, considera-se a dor como o quinto sinal vital, devendo ser analisada com a mesma relevância das funções cardiorrespiratória e térmica (PEDROSO e CELICH, 2006).

Nos primórdios da raça humana, a visão clássica e aceita para a dor era meramente de uma sensação que, por sua vez, conduziria à percepção de estímulos nocivos. Ao longo da história, até o início do século passado, surgiram diferentes explicações para o fenômeno álgico, bem como controvérsias a respeito de a dor ser uma sensação ou uma emoção (KERN, 1987). Atualmente atribui-se a este fenômeno uma complexidade que não se esgota na consciência de um estímulo, mas que se prolonga numa vertente de emoções, atitudes e comportamentos que traduzem a extensão do sofrimento. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, IASP - International Association for the Study of Pain) a definição mais completa para dor é:

“Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma real ou potencial lesão do tecido ou descrita em termos desta lesão.”

1.1.1. Definição

A dor é um fenômeno biológico complexo, de caráter essencialmente protetor, resultante da modulação de diversos mecanismos periféricos e centrais, da superfície da pele até os neurônios do córtex cerebral, não se limitando apenas à mera transdução de estímulos pelo organismo (OLESEN et al., 2012). Juntamente com esta, está a percepção dolorosa, processo relacionado a eventos cognitivos e emocionais (JULIUS e BASBAUM, 2001). Baseado nisso, se concebe a experiência dolorosa como multidimensional, privada e particular, em outras palavras, subjetiva. Portanto, não somente aspectos neurofisiológicos como afetivos, emocionais e cognitivos devem ser considerados na sensação final (ALMEIDA et al., 2004).

Uma vez esclarecida essa associação, de que a dor além de uma sensação, atribuído ao componente sensorial, também é uma experiência, ou seja, de influência conjunta com o fator psicológico, faz-se necessário diferenciar a mesma de nocicepção. Definida como componente sensorial da dor, a nocicepção diz respeito mais precisamente às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo (TJØLSEN e HOLE, 1997). Sabe-se que o processo nociceptivo engloba desde eventos como a detecção do estímulo, que pode ser de diferentes origens, até a sua condução ao nível do sistema nervoso central (SNC), onde esse estímulo será processado e devidamente respondido (BASBAUM et al., 2009). Essa definição torna-se importante pois, embora estejam relacionadas, dor e nocicepção não são sinônimos. A resposta à dor é cruzada, isto é, o estímulo físico desencadeia um estado fisiológico, referente à transmissão nociceptiva, e o significado da dor uma resposta psicológica (BARBOSA e NETO, 2006).

Baseado nestes conceitos, embora controverso, o termo dor se aplicaria apenas para humanos, enquanto que para os demais animais se atribui nocicepção, em decorrência do envolvimento de componentes subjetivos na sensação final desta. Hellyer e colaboradores (2007) afirmam que os aspectos cognitivos e emocionais encontram-se insuficientemente desenvolvidos na maioria dos animais, e isso associado aos procedimentos pouco confiáveis para identificação destes e à inabilidade de comunicação verbal reforçam o uso do termo nocicepção para animais (LE BARS et al., 2000). Apesar disso, a percepção sensorial da dor é considerada igual para seres humanos e animais mais evoluídos, uma vez que ambos apresentam estruturas anatômicas e mecanismos neurofisiológicos bastante semelhantes (de GRAZIA e ANDREW, 1991).

1.1.2. Dor Fisiológica

Há aproximadamente um século atrás, Sherrington, um notável pesquisador da área neurológica, propôs a existência dos nociceptores, um tipo de neurônio sensorial primário ativado por determinados estímulos (SHERRINGTON, 1906). De acordo com este modelo, os nociceptores seriam dotados de características que os diferenciavam dos demais neurônios sensoriais, e, de fato, estudos eletrofisiológicos confirmaram a existência desse tipo de estrutura, que seria ativada por certos estímulos nocivos, como extremos de temperatura, pressão intensa ou agentes químicos, e incapazes de detectar os estímulos inócuos (BURGESS e PERL, 1967). São nessas estruturas periféricas, amplamente distribuídas pelo corpo, que se inicia todo o fenômeno da dor. Dessa forma, o componente fisiológico desta, a nocicepção, expressa a percepção sensorial no SNC. De maneira simplificada, todo o processo pode ser considerado como uma cadeia de três neurônios (Figura 1), o neurônio de primeira ordem, originado na periferia e que se projeta para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem, que ascende pela medula espinhal, e o neurônio de terceira ordem, que se projeta para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997).

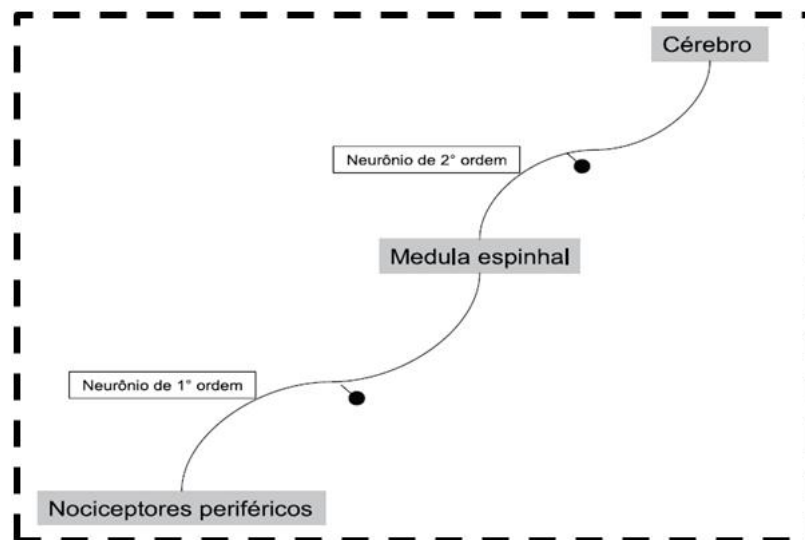


Figura 1. Representação da via aferente de transmissão nociceptiva. Adaptado de KLAUMANN et al., 2008.

A percepção de estímulos nocivos inicia-se através dos nociceptores, também conhecidos como terminações nervosas livres dos neurônios primários, os quais apresentam

limiares mais elevados do que os demais receptores e respondem de forma proporcional à intensidade do estímulo, tendo como função a preservação da homeostasia tecidual (ALMEIDA et al., 2004). De fato, reforçando essas ideias, a ativação destes neurônios limita-se à existência de estímulos intensos, potencialmente prejudiciais ao organismo. Essas estruturas estão amplamente distribuídas por todo o corpo, desde na pele e mucosas até no tecido conjuntivo de órgãos viscerais e periósteo (ALMEIDA et al., 2004).

Os nociceptores se diferenciam entre si pela distinta sensibilidade a cada tipo de estímulo e pelo diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução da fibra aos quais estão associados (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001) (Figura 2). Dos tipos existentes de fibras, dois estão principalmente relacionados com o processo nociceptivo, as fibras do tipo A δ e do tipo C. As primeiras são de diâmetro médio (2 a 6 μ m), dotadas de mielinização intermediária, velocidade de condução entre 12 e 30m/s e estão relacionadas com a percepção de estímulos nociceptivos de origem térmica e mecânica. Enquanto que as do tipo C são fibras mais finas (0,4 a 1,2 μ m), não mielinizadas, de condução lenta (0,5 a 2 m/s) e caráter polimodal, ou seja, ativadas por estímulos nocivos de diferentes origens, térmico, mecânico ou químico (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Essas características refletem diretamente na sensação nociceptiva, uma vez que as fibras do tipo A δ são as responsáveis pela dor imediata e as do tipo C encarregam-se da sensação prolongada e difusa desencadeada pelo estímulo.

Uma vez ativados, os nociceptores transduzem o estímulo nocivo. As informações nociceptivas são detectadas pelas terminações nervosas que transformam este estímulo externo em sinais elétricos, ou seja, em potenciais de ação. Esse processo é acompanhado pela liberação local de diversos mediadores químicos que facilitam a transmissão da informação, através de impulsos conduzidos pela fibra aferente, até a medula espinhal (HILL, 2001). Em condições fisiológicas, tais mediadores podem ser provenientes de diferentes células neuronais, como é o caso de neurônios sensoriais ou simpáticos, ou não neuronais, tais como células sanguíneas, teciduais ou endoteliais. Em estados patológicos os mediadores podem ter ainda outras origens, como é o caso de quadros inflamatórios ou infecciosos (BESSON, 1999).

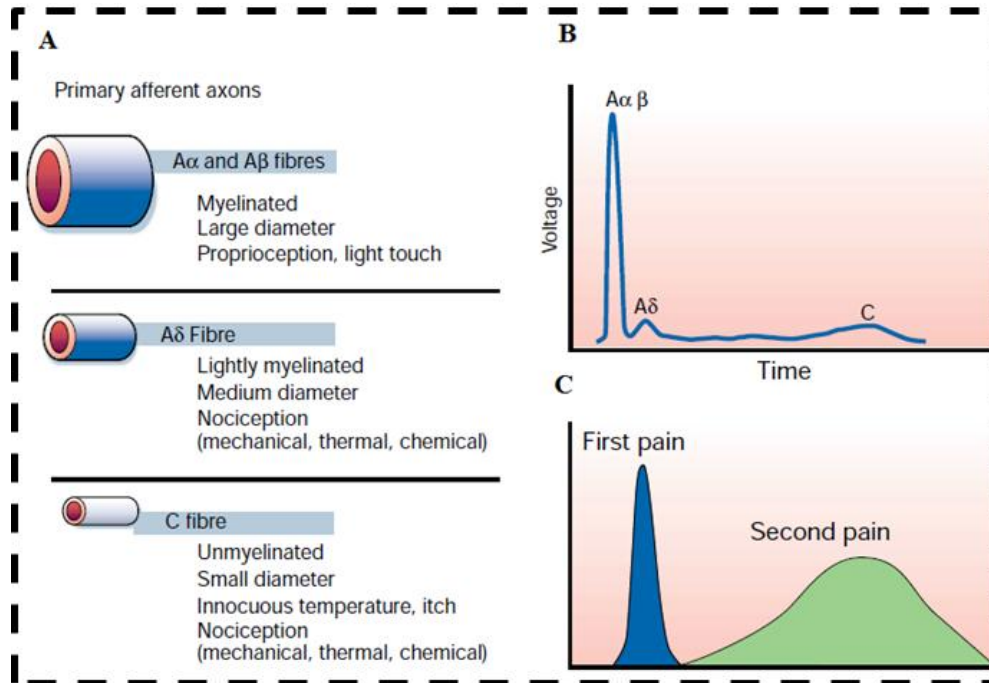


Figura 2. Representação das diferentes fibras de condução e seu tempo de resposta. (A) Mielinização das fibras, tipo de estímulo ao qual respondem; (B) Representação gráfica da velocidade de condução dos estímulos; (C) Distinção temporal da dor entre as fibras A δ e C. Adaptado de JULIUS e BASBAUM, 2001.

Diversos mediadores estão associados com a gênese e a transmissão do estímulo nociceptivo, entre os quais se destacam os neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato (JULIUS e BASBAUM, 2001), óxido nítrico, apesar de sua dualidade na sensação nociceptiva, que varia conforme a situação (CURY et al., 2011), peptídeos, como a substância P (CUELLO et al., 1973; HARRISON e GEPPETTI, 2001) e as cininas (bradicinina e calidina) (CALIXTO et al., 2000; CAMPOS et al., 2007), prótons e derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) (FERREIRA, 1972). Além disso, alguns mediadores podem desencadear a ativação direta ou indireta de canais iônicos voltagem-dependentes e cascatas de proteínas quinase, culminando na alteração da permeabilidade da membrana a íons, favorecendo a transmissão dos impulsos elétricos ao longo das fibras (MILLAN, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; PARADA et al., 2003). Dessa forma, o somatório da ação desses mediadores é responsável pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto a nível periférico quanto central (WOLLEMAN, 2011).

Após a transdução do estímulo nocivo pelos nociceptores, os impulsos elétricos são conduzidos pelas fibras aferentes primárias à medula espinhal (Figura 3). É no corno dorsal

desta, considerada área primária de recebimento da maioria das informações somato-sensoriais, onde ocorre a integração inicial e a modulação da entrada do estímulo nociceptivo ao SNC (COGGESHALL e CARLTON, 1997; ALMEIDA et al., 2004). As sinapses nociceptivas, que ocorrem entre neurônios de primeira ordem com neurônios de segunda ordem em regiões específicas do corno dorsal, são mediadas principalmente por aminoácidos e neuropeptídeos excitatórios, como é o caso do glutamato, aspartato e substância P (SORKIN e CARLTON, 1997). A partir da integração dos impulsos, as vias nociceptivas aferentes dão origem a diversos modelos distintos de projeções ascendentes, as quais se direcionam, direta ou indiretamente, para estruturas corticais e supra-corticais (MILLAN, 1999, 2002; ALMEIDA et al., 2004). Neste estágio, os componentes discriminativos, afetivos e cognitivos são atribuídos ao impulso nociceptivo (RUSSO e BROSE, 1998).

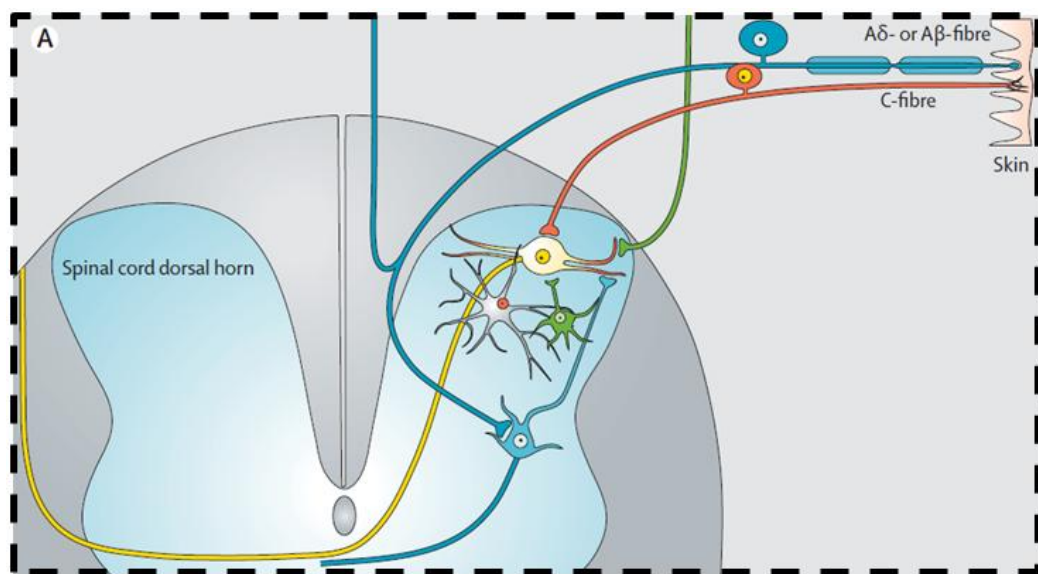


Figura 3. Representação da via aferente primária e sua ligação com a medula espinal. Adaptado de BARON et al., 2010.

Este complexo sistema de vias ascendentes inerva o tálamo, o mesencéfalo, o sistema límbico e a formação reticular, as quais realizam sinapses com neurônios do córtex cerebral, principal estrutura de percepção e integração da dor. Estes centros nervosos são responsáveis pela identificação do foco da dor, atribuição de intensidade à mesma, bem como modular os aspectos afetivos e cognitivos envolvidos no processo (ALMEIDA et al., 2004). Sendo assim, após a estimulação de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas

estruturas cerebrais, onde a informação do presente contexto é integrada com experiências posteriores e interpretada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada, que é enviada para a medula espinhal através dos neurônios descendentes, os quais conduzem o estímulo até a área de onde se originou o estímulo inicial (MILLAN, 1999).

O sistema de nocicepção envolve diferentes estruturas e é o resultado da interação de várias vias anatômicas e neurofisiológicas distintas. Atualmente se sabe que concomitante com esse processo existem mecanismos intrínsecos que modulam negativamente a intensidade do estímulo nociceptivo, conhecidos como sistema de analgesia endógeno (MILLAN, 2002; DREWES, 2006). Desde a descoberta, por Wall (1967), de que os neurônios presentes em regiões específicas da medula espinhal estão sujeitos à modulação por estruturas supra-espinhais, o entendimento do circuito modulatório descendente da dor tem progredido consideravelmente (FIELDS e BASBAUM, 1999). Este sistema é composto por um conjunto de diferentes interneurônios que geram um tipo de *feed-back* inibitório, seja pela diminuição dos processos excitatórios e/ou pela estimulação de interneurônios inibitórios, exercendo efeito supressor sobre o estímulo nociceptivo. Diversos mediadores, como os neuropeptídeos opioides (STEIN et al., 2003; FOORD et al., 2005), sistemas de neurotransmissão noradrenérgica (JONES, 1991), principalmente através de receptores α -2, serotoninérgica (MILLAN, 2002), glicinérgica (LYNCH, 2004), GABAérgica (ENNA e MCCARSON, 2006), além de outros, estão relacionados com este mecanismo modulatório, podendo o mesmo ocorrer tanto a nível medular como a nível de estruturas supra-medulares (LAMONT, 2000).

No que diz respeito à sua classificação, pode se distingui-la pelo estímulo de origem e ainda pela sua duração temporal. A dor pode ter diferentes origens, classicamente distintas em quatro tipos principais: a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e demais órgãos; a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”); a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e a “dor psicogênica”, de caráter puramente emocional, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Em termos de duração temporal, podemos classificar a dor como transitória, aguda ou crônica, estando cada uma delas relacionadas com o tipo e a intensidade do estímulo desencadeante. A ativação dos nociceptores na ausência de qualquer lesão tecidual caracteriza a dor transitória, de caráter protetor e limitado, que cessa assim que o estímulo desencadeante se encerra (LOESER e MELZACK, 1999). Em contrapartida, a dor aguda, a qual tem duração

de dias a semanas, está presente em situações de dano tecidual, que geralmente vem acompanhado por um processo inflamatório, e pode ser considerada uma condição biológica adaptativa para acelerar e favorecer o reparo tecidual e a cicatrização, como, por exemplo, em casos de pós-operatório (LOESER, 2000; SCHAIBLE, 2006). Tanto na dor transitória quanto na dor aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas é limitado, podendo as mesmas se extinguir em até antes da remoção da causa ou do reparo do dano tecidual. Já a dor crônica é, do ponto de vista clínico, caracterizada como uma patologia, onde eventos neuroplásticos possivelmente tenham sido desencadeados em diferentes níveis do sistema nervoso, causando modificações variadas no processo nociceptivo (LOESER, 2000; DRIESSEN, 2007) e, dessa forma, alterando a relação entre estímulo e resposta.

1.1.3. Dor Patológica

Em condições fisiológicas, todo processo descrito até então ocorreria única e exclusivamente com a finalidade de proteger o organismo de situações potencialmente prejudiciais à homeostasia corporal ou para fornecer condições ao reestabelecimento desta. Contudo, a dor fisiológica como uma entidade isolada é um evento raro. Na maioria das vezes, o estímulo nocivo não é transitório, podendo ainda apresentar caráter mais severo, como é o caso da dor inflamatória e neuropática, circunstâncias sob as quais ocorrem alterações dinâmicas no processamento do estímulo nociceptivo, tanto a nível periférico quanto a nível central.

Como consequência da lesão tecidual e da inflamação ocorre a liberação mais intensa de inúmeros mediadores químicos, que além de ativar, dependendo da situação, também sensibilizam os nociceptores, promovendo a diminuição do limiar nociceptivo (DRAY, 1997; VERRI Jr. et al., 2006) e facilitando a transmissão do impulso. Nestes casos a dor é mais persistente, e é o resultado da ação sinérgica de diversas moléculas, que acabam desencadeando o desenvolvimento de hiperalgesia, definida como resposta exacerbada a determinado estímulo, e alodinia, dor resultante de um estímulo normalmente inócua (MILLAN, 1999), ambos decorrentes das modificações funcionais nos nociceptores e demais estruturas estimuladas pelos mediadores (Figura 4). Além disso, juntamente com a sensibilização dos nociceptores, ocorre a ativação de uma subpopulação de outros terminais nervosos aferentes, conhecidos como “nociceptores silenciosos”. Esses nociceptores

pertencem a uma classe de fibras C, que apresentam pequena ou nenhuma atividade excitatória, até que sejam submetidos à estimulação extrema, como o caso de reações inflamatórias. Dessa forma, uma vez ativados, tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais e disparam espontaneamente, contribuindo de forma considerável na sensação nociceptiva em quadros de dor patológica (JULIUS e BASBAUM, 2001). Ao contrário da dor aguda, a dor crônica não tem qualquer função biológica de proteção e é caracterizada por alterações funcionais e estruturais das vias sensitivas periféricas e centrais (GALLUZZI, 2007).

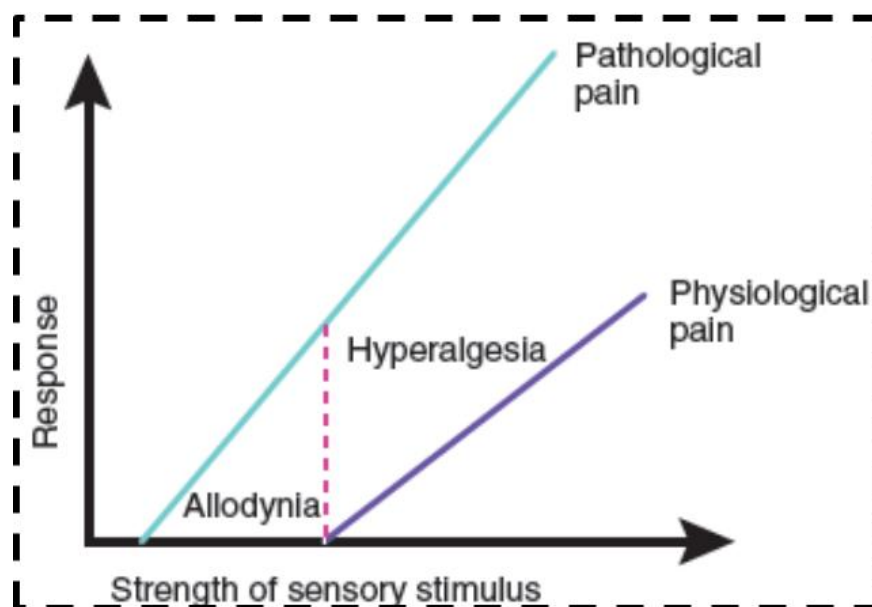


Figura 4. Relação entre a intensidade do estímulo e a resposta nociceptiva do organismo em condições fisiológicas e em condições patológicas. Adaptado de KUNER, 2010.

1.1.3.1. Dor Inflamatória

A inflamação é uma reação fisiológica complexa e multimediada, invariavelmente caracterizada por diversos eventos moleculares e celulares. O processo inflamatório consiste na resposta biológica diante de quaisquer estímulos possivelmente danosos ao organismo, como lesões ou infecções, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido afetado (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Apesar do caráter essencialmente protetor, o que torna possível a eliminação do agente agressor e, por consequência, o reestabelecimento da homeostase, em alguns casos o inverso pode ocorrer; o

processo inflamatório tornar-se tão intenso que acaba por prejudicar o próprio organismo (MOALEN e TRACEY, 2006; LIBBY, 2007).

O estímulo inflamatório desencadeia a síntese e a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, as quais são capazes de mediar alterações morfológicas e bioquímicas no local da lesão e nos tecidos adjacentes. Essas modificações instalam-se de forma gradual, moduladas por fatores celulares específicos e que também caracterizam a fase do processo inflamatório (PAUL, 1998). É interessante ressaltar que, na maioria das situações, o processo inflamatório pode estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção (KIDD e URBAN, 2001), tanto que muitos dos mediadores inflamatórios podem estimular, direta ou indiretamente, os neurônios sensoriais locais, contribuindo para o aparecimento da dor (RANG et al., 1991; MOALEN e TRACEY, 2006). De fato, os mediadores causam modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos, culminando não somente na sua sensibilização, caracterizando um quadro de hiperalgesia inflamatória, como também desencadeando estimulação constante destes (HARDY et al., 1950; COUTAUX et al., 2005).

No que diz respeito à duração, as reações inflamatórias podem ser classificadas como aguda, a qual dura alguns dias e cessa assim que o fator prejudicial é eliminado, ou crônica, fase de concomitante reparo e destruição tecidual, decorrente da intensa e descontrolada amplificação dos eventos no processo de defesa (ESCH e STEFANO, 2002). Dessa forma, enquanto a inflamação aguda é parte da resposta de defesa, a inflamação de caráter crônico pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias (BALKWILL e COUSSENS, 2004; AGGARWAL et al., 2006), isso devido às constantes lesões às biomoléculas celulares. De fato, do ponto de vista clínico, um dos aspectos mais problemáticos da dor de origem inflamatória é a possibilidade da progressão de um estado agudo para um estado prolongado, aumentando, dessa forma, a susceptibilidade de instalação de um quadro de dor inflamatória crônica (WOOLF e MANNION, 1999; MENDELL e SAHENK, 2003) e sua conseqüente evolução para situações ainda mais severas, como é o caso das neuropatias (JI e STRICHARTZ, 2004; GARCIA, 2005; GLASS et al., 2005).

Nestas condições, a inflamação perde sua característica protetora e se torna uma patologia, normalmente associada a alterações no sistema nervoso (WOOLF e SALTER, 2000). Ocorre a progressiva centralização da ação nociceptiva, desenvolvimento de hipersensibilidade central e ativação anormal do sistema nociceptivo, o que é devido à neuroplasticidade adaptativa (WOOLF e SALTER, 2000; SALTER, 2005). No decorrer do tempo, a dor não guarda mais relação com a causa periférica, mas sim com mecanismos

centrais como a sensibilização espontânea e ectópica, reverberação de sinal, perda do controle e redução dos mecanismos inibitórios e facilitação excitatória (BESSON, 1999; WOOLF e SALTER, 2000), eventos estes, que somados levam à amplificação e prolongamento do processo de dor (MILLAN, 1999; KIDD e URBAN, 2001).

1.1.3.2. Dor Neuropática

A dor neuropática, segundo o Comitê de Taxonomia da IASP, é definida como “uma consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial” (LOESER e TREEDE, 2008). Apresenta etiologia heterogênea e pode ser ocasionada devido a um insulto primário ao sistema nervoso periférico ou central (ZIMMERMANN, 2001). Sugere-se que diferentes fatores estejam relacionados com seu desenvolvimento, desde traumas mecânicos intensos, amputação ou compressão de nervos, a efeitos tóxicos de drogas além de doenças metabólicas, como diabetes e síndrome metabólica (MENDELL e SAHENK, 2003). Dados estimam que a dor neuropática afeta milhões de pessoas no mundo (DWORKIN et al., 2007) e que sua incidência aumenta tipicamente com a idade e gravidade da doença de base (GUSTORFF et al., 2008). Sugere-se ainda, que a interação entre fatores genéticos e ambientais possam contribuir no risco de desenvolver esta patologia (COSTIGAN et al., 2009).

Os mecanismos exatos do desenvolvimento do quadro de dor neuropática não estão inteiramente compreendidos (DWORKIN et al., 2007; THACKER et al., 2007). Acredita-se que sua gênese esteja nas alterações ocorridas no limiar dos nociceptores, aumentando de forma considerável a sensibilidade destes e, conseqüentemente, reforçando os impulsos transmitidos à medula espinha (COUTAUX, 2005; BOYCE-RUSTAY e JARVIS, 2009). Por ser um evento crônico, a principal característica desta patologia são as alterações neuroplásticas, como modificações na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores e mediadores de sinalização extracelular, que somados resultam em quadro de dor de caráter patológico, prolongado e desgastante. (WOOLF e MANNION, 1999; JI e STRICHARTZ, 2004; ROWBOTHAM, 2005).

1.1.4. Estratégias Terapêuticas

A dor é um dos principais motivos de consulta nos serviços de saúde em todo o mundo (KANTZ, 2002; WOOLF, 2004). Apesar de ser uma sensação extremamente importante e essencial para a sobrevivência, pode, por outro lado, trazer consigo consequências desagradáveis como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas, devendo, portanto, ser rápida e efetivamente controlada e tratada (LOESER e MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007; OLESEN et al., 2012).

1.1.4.1. Terapia Farmacológica

Os principais agentes farmacológicos utilizados para o controle da dor são os analgésicos não-opioides (incluindo-se neste, principalmente o grupo dos anti-inflamatórios não-esteroidais [AINEs], os analgésicos antipiréticos, como o acetaminofeno, e os anti-inflamatórios esteroidais [AE]) e os opioides (BLONDELL et al., 2013). A escolha do mesmo deve levar em consideração o tipo de dor, o início da dor, a potência do analgésico, além de sua duração de ação, contra-indicações, via de administração e facilidade de acesso do paciente .

Os recursos terapêuticos atuais nos permitem controlar com eficiência a dor aguda, porém o mesmo não é possível se dizer da dor crônica, contra a qual nem sempre se dispõe de métodos analgésicos eficientes (O'CONNOR e DWORKIN, 2009; DWORKIN et al., 2010). Apesar da vasta gama de medicamentos disponíveis e aprovados para este fim, a ocorrência de eventos paralelos indesejados decorrentes do seu uso e a baixa eficácia terapêutica são fatores determinantes na limitação do benefício dessa terapia (PAYNE, 2000) culminando na descontinuidade do tratamento, o que, dependendo da situação, pode trazer sérias consequências (MAO, 2009).

1.1.4.1.1. Anti-inflamatórios não esteroidais

Pertencentes ao grupo de medicamentos mais prescritos, os AINES são fármacos que apresentam atividades analgésica e anti-inflamatória, sendo indicados principalmente nos quadros agudos de inflamação (VANDE e BOTTING, 1998). O mecanismo de ação desta classe é através na inibição da atividade da enzima ciclo-oxigenase (COX), culminando na diminuição de endoperóxidos cíclicos, tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que além de função fisiológica, dependendo da situação, também atuam como mediadores inflamatórios (PAYNE, 2000). Os precursores da classe inibem a atividade dessa enzima de maneira não seletiva, tanto a isoforma COX 1, que é constitutiva e exerce papel protetor no organismo, quanto a COX 2, isoforma induzível, cuja atividade e expressão se tornam bastante aumentadas em quadros inflamatórios (BOTTING, 2006; YEDGAR et al., 2007). É justamente à falta de seletividade que se atribuem os efeitos adversos decorrentes do uso dessa classe de fármacos (PAYNE, 2000). Já os AINES de última geração, atuam de forma mais seletiva, com maior especificidade para a COX 2 (VANE e BOTTING, 1998). Contudo, sua ação é dose/resposta limitada, existindo um efeito teto, isto é, atingindo certo nível de analgesia, o aumento da dose não traz alívio adicional, bem pelo contrário, aumenta a incidência de efeitos colaterais. O efeito teto pode ser tradicionalmente explicado pela natureza do mecanismo de ação dos fármacos dessa classe, através da inibição da síntese de mediadores que causariam a sensibilização dos nociceptores (VANE e BOTTING, 1998; BROOKS et al., 1999), e não através da supressão destes. Associado a esse fato, além de apresentar efeito analgésico dependente de seu efeito anti-inflamatório, que por sinal é inferior ao exercido pela classe dos AE (BUSILLO e CIDLOWSKI, 2013), seu uso frequentemente está relacionado a danos na mucosa gástrica (HENRY et al., 1996; LANZA, 1999), alterações na homeostase sanguínea e renal (BERTOLONI et al., 2002).

1.1.4.1.2. Opioides

Os opioides, uma classe composta por fármacos de origem natural ou sintética, constituem a base do tratamento farmacológico para dor de intensidade moderada a intensa, refratária aos anti-inflamatórios (NICHOLSON, 2003). Sua ação é mediada pela ligação e ativação dos receptores para neuropeptídeos opioides endógenos, os quais exercem diversas funções fisiológicas, incluindo a modulação inibitória no processo nociceptivo a nível periférico, medular e supra-medular (STEIN, 1995; JENSEN, 1997; PRICE, 1999), dessa forma, são considerados agonistas de receptores opioides. Sabe-se que dos três subtipos de receptores endógenos já identificados, é através da interação com o subtipo μ que a maioria das drogas opioides utilizadas clinicamente agem (BOVILL, 1997). Essa é a classe de fármacos à qual se atribui a maior efetividade analgésica, tanto que a morfina, alcaloide precursor de outras moléculas opiáceas sintéticas, é utilizada como padrão de comparação para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas (CHRISTRUP, 1997). Entretanto, no manejo do tratamento da dor, o uso de opioides deve ser conduzido com muita cautela, uma vez que seus efeitos colaterais são intensos e afetam o organismo tanto a nível de sistema periférico, como é o caso da constipação intestinal e retenção urinária (BENYAMIN et al., 2008), como a nível de SNC, desencadeando alterações no humor, na concentração e no ciclo sono-vigília (ZACNY, 1995), alucinações (BRUERA et al., 1992), déficit cognitivo (LAWLOR, 2002) e até mesmo dependência física e tolerância (SAVAGE, 1999; ADRIAENSEN et al., 2003; BENYAMIN et al., 2008).

1.1.4.1.3. Anti-inflamatórios Esteroidais

Os fármacos caracterizados como AE sintéticos, também conhecidos como glicocorticoides, são moléculas análogas aos esteroides endógenos, com os quais compartilham não somente o núcleo esteroidal, mas também muitas de suas ações biológicas (STREETEN, 1975; SCHIMMER e PARKER, 1996). No organismo, os esteroides exercem amplo espectro de ação, atuando desde a nível de regulação metabólica à modulação da expressão de determinadas proteínas (NEWTON, 2000). Além disso, é interessante ressaltar que para essa classe de moléculas a existência da estreita relação estrutura-atividade é a

característica à qual se atribui a vasta gama de efeitos, assim como a variação da intensidade dos mesmo (JONES e TIPTAFT, 1977; PHILLIPS, 1990).

O uso dessa classe de fármacos está principalmente relacionada ao tratamento de patologias de cunho inflamatório intenso, como é o caso das doenças auto-ímmunes, reações de hipersensibilidade e dor inflamatória e neuropática (MIENKE et al., 2013). No geral, o início de ação destes fármacos pode ser demorado, uma vez que seus principais efeitos estão relacionados à modulação da transcrição de determinados genes, os quais estariam envolvidos com a resposta inflamatória (BLOOM et al., 1980; ADCOCK, 2000). Porém, atualmente também se propõe a existência de efeitos imediatos (GROENEWEG et al., 2011), possivelmente decorrentes da interação direta com o alvo, como é o caso da membrana plasmática (HALLER et al., 2008), podendo exercer influência na permeabilidade iônica desta, a nível de receptor GABA_A, favorecendo a ligação do ácido- γ -aminobutírico (GABA) (MOORE e EVANS, 1999), a nível de proteínas citoplasmáticas, e ainda atua inibindo vias relacionadas com o processo inflamatório (RHEN, 2005; EVANSON et al., 2010). Contudo, a longo prazo, o uso de AE está associado com efeitos adversos como retenção hídrica, alteração no metabolismo, principalmente hiperglicemia, imunossupressão severa e osteoporose (LANE e LUKERT, 1998; NEWTON, 2000). Justamente por isso, o regime de administração deve ser cuidadosamente monitorado, levando-se em conta sempre as limitações do paciente e as contra-indicações descritas para o fármaco.

1.1.4.1.1. Terapia Farmacológica Adjuvante

Principalmente para o tratamento de quadros crônicos de dor, em especial para a dor neuropática, diversos outros tipos de fármacos são indicados, cujos mecanismos de ação nem sempre correspondem diretamente com a patologia, reforçando a compreensão incompleta do processo fisiopatológico que se instala no organismo acometido (BARON et al., 2010). Desde antidepressivos, inibidores da recaptção de serotonina ou norepinefrina (MAX, 1987; FINNERUP et al., 2005), anestésicos de uso tópico (WASNER et al., 2005) e inibidores de canais iônicos (VINIK, 2005; VRANKEN et al., 2008) são utilizados para o alívio de quadros de dor neuropática remissiva aos fármacos das classes normalmente prescritas.

1.1.4.2. Terapia não Farmacológica

Como recurso paralelo aos medicamentos, o tratamento não farmacológico vem timidamente conquistando espaço. Essas intervenções de cunho não medicamentoso são ferramentas que utilizam técnicas não invasivas e compreendem um conjunto de medidas de ordem educacional, física, emocional, comportamental e espiritual, de baixo custo, fácil aplicação, praticidade e com efeitos adversos mínimos (DEMIR, 2012), a exemplo da acupuntura (AHN et al., 2007), exercícios físicos (LI e MANOR, 2010; LI e HONDZINSKI, 2012) , reiki (OLSON et al., 2003), musicoterapia (CHASE, 2003), yoga (DILLARD e KNAPP, 2005), oração e meditação (MEISENHELDER e CHANDLER, 2000), reflexologia (LETT, 2002), fototerapia com infravermelho monocromático (HARKLESS et al., 2006), terapia a laser de baixa intensidade, neuroestimulação elétrica trans e percutânea (CONTI et al., 2009).

Apesar das inúmeras pesquisas já realizadas e do crescente avanço a respeito do mundo da dor, muitos são os pontos ainda apenas parcialmente compreendidos (BASBAUM et al., 2009). A dor em si é um processo multifatorial e interligado e além de tudo é uma experiência única e individual. Essencial porém muitas vezes prejudicial e desgastante, a dor apresenta diferentes faces e em alguns casos torna-se necessário, e até mesmo urgente, controlá-la (LOESER e MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007; OLESEN et al., 2012). Estima-se que em torno de 2 ~ 55% da população mundial adulta apresente algum quadro de dor crônica (VERHAKK et al., 1998; OSPINA e HASTALL, 2002; BREIVIK et al., 2006; COSTIGAN et al., 2009), para a qual o tratamento farmacológico atualmente disponível, na maioria dos casos, não é aplicável ou ainda insuficiente. Essa imprevisibilidade é decorrente do desconhecimento da fisiopatologia, na qual múltiplos mecanismos e mediadores estão envolvidos, o que torna muito complicada a resolução do quadro (O'CONNOR e DWORKIN, 2009; DWORKIN et al., 2010). Justamente por isso, o desenvolvimento de novas moléculas que atuem em múltiplos alvos, além de contemplar boa eficácia terapêutica, baixo índice de efeitos adversos e contra-indicações, teria o perfil adequado para o tratamento destas enfermidades (KENNEDY, 2007).

1.2. Selênio

1.2.1. Características Gerais

O selênio (Se), descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, é um elemento químico não metálico da família dos calcogênios da tabela periódica (COMASSETO, 2010). É sólido à temperatura ambiente e pode ser encontrado na forma inorgânica, sob diferentes estados de oxidação, compondo rochas e solos ou acumulado em organismos, e também na forma orgânica, presente na molécula de diferentes aminoácidos (SCHWARTZ e FOLTZ, 1957; YOUNG et al., 1982; KRYUKOV et al., 2003).

Os estudos pioneiros a respeito do Se destacavam o elemento por sua toxicidade, o que atualmente se sabe ser devido à proximidade entre as concentrações biológicas consideradas adequadas ou não, tanto insuficientes (GE e YANG, 1983; LI et al., 1985) quanto excessivas (SPALLHOLZ, 1993). Apesar deste início trágico, anos de estudo e experimentação trouxeram à tona o papel essencial do elemento Se no organismo (RAYMAN et al., 2000;), tanto que, devido à isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza uma ingestão diária recomendada (IDR) de 34-35 µg para adultos (FAO/OMS, 2002). A dieta, seja através da ingestão de alimentos comuns, tanto de origem animal quanto vegetal, ou pela suplementação, constitui a maior fonte para obtenção deste micronutriente essencial (DUMONT et al., 2006; RAYMAN, 2008). Acredita-se que parte do efeito biológico exercido pelo Se seja devido à sua semelhança química e física com o elemento enxofre, o que permite a interação entre os mesmos. Contudo é interessante ressaltar que é justamente às diferenças que se atribui a base dos efeitos biológicos específicos relacionados ao Se (STADTMAN, 1980; NOGUEIRA e ROCHA, 2011).

1.2.2. Propriedades Biológicas

Uma vez definido seu envolvimento em diversos processos biológicos, atribuiu-se ao Se um caráter de cunho essencial à manutenção da homeostase fisiológica. Entre seus efeitos, destacam-se o envolvimento no metabolismo de hormônios tireoideanos (SCHMUTZLER et al., 2007; STAZI e TRINTI, 2008), modulação imunológica (BECK et al., 2003; HURWITZ

et al., 2007), modulação do humor (SHER, 2002; BENTON, 2002; SHER, 2007), e, principalmente, na regulação do sistema de defesas antioxidantes (TAPIERO et al., 2003; TINGGI, 2008). Enzimas como a glutathiona peroxidase (FLOHÉ et al., 1973), tioredoxina redutase (HOLMGREN, 1985) e 5'-deiodinase (BEHNE e KYRIAKOPOULOS, 1990) que participam ativamente no controle dos níveis de espécies reativas, apresentam o Se em seu sítio ativo, cuja função redox exercida por este é de extrema importância para a atividade das enzimas (BURK e HILL, 1993). Além disso, estudos demonstraram que o SNC parece ter uma necessidade especial de Se. Em quadros de depleção deste elemento, o SNC recebe oferta prioritária de Se em relação aos demais órgãos (BEHNE et al., 1988; BUCKMAN et al., 1993), e, confirmando isso, a carência deste já foi associada com alteração na taxa de *turnover* dos neurotransmissores (CASTANO et al., 1997), doenças neurodegenerativas, como a doença do mal de Alzheimer (CORRIGAN et al., 1991), e déficits cognitivos (GAO et al., 2007).

Dessa forma, devido às inúmeras descobertas relacionadas ao Se, o interesse da comunidade científica por desvendar completamente o papel biológico que este exerce em organismos vivos tem se intensificado, assim como a possibilidade de desenvolver propostas para seu uso terapêutico (PAPP et al., 2007; TINGGI, 2008; NOGUEIRA e ROCHA, 2011), uma vez que alguns de seus já conhecidos efeitos estão relacionados com a fisiopatologia de inúmeras doenças (KAUSHAL et al., 2012; RAYMAN, 2012).

1.2.3. Compostos Orgânicos Sintéticos de Selênio

Nas últimas décadas, os compostos orgânicos de selênio vêm sendo amplamente estudados, tanto em síntese orgânica quanto em sistemas biológicos, devido às propriedades farmacológicas e toxicológicas já atribuídas a essa classe de moléculas (PARNHAM e GRA, 1991; NOGUEIRA et al., 2004; NOGUEIRA e ROCHA, 2011), assim como por apresentar maior biodisponibilidade e, geralmente, menor toxicidade em relação à sua forma inorgânica (YOUNG et al., 1982; KIM e MAHAN, 2001). A literatura trás inúmeras evidências dos efeitos destas moléculas nos mais diversos modelos animais (NOGUEIRA e ROCHA, 2010; NOGUEIRA e ROCHA, 2011) e também em estudos clínicos realizados em humanos (YAMAGUCHI et al., 1998; OGAWA et al., 1999).

Uma das classes mais estudadas dos compostos orgânicos de selênio são os disselenetos de diorganoila (Figura 5A-D), os quais se destacam em vista da síntese química de simples condução e das diversas atividades biológicas, tanto farmacológicas quanto toxicológicas, já reportadas (NOGUEIRA e ROCHA, 2010, 2011). E entre suas ações, a antinociceptiva já foi demonstrada experimentalmente em diferentes modelos animais de nocicepção, tanto para os disselenetos de diorganoila (**5.A** NOGUEIRA et al., 2003; **5.C** PINTO et al., 2008; **5.B** BRUNING et al., 2010) quanto para outros compostos orgânicos de selênio (**5.E** WILHELM et al., 2009; **5.F** LUCHESE et al., 2010; **5.G** SARTORI et al., 2012; **5.H** CHAGAS et al., 2013; **5.J** CHAGAS et al., 2014; **5.I** GAI et al., 2014). Além disso, o efeito antinociceptivo destas moléculas não se limita apenas a modelos animais de dor aguda, mas também a modelos experimentais de dor crônica. Recentemente, Gai e col (2014) demonstraram reversão da alodinia mecânica pela administração do composto 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno (Figura **5.I**) em um modelo de dor neuropática, da Rocha e col (2013) reportaram redução da nocicepção térmica e mecânica pela administração do composto disseleneto de difenila [(PhSe)₂] (Figura **5.A**) em modelo animal de parkinson induzido por 6-hidroxidopamina. Reforçando esses estudos, Savegnago e col (2007) relataram diminuição da resposta nociceptiva em modelos de dor inflamatória e crônica pelo tratamento com (PhSe)₂.

Levando em conta a multiplicidade de efeitos já reportados para os compostos orgânicos de selênio, é possível sugerir que os mesmos possuam variados sítios de ação, podendo agir direta ou indiretamente sobre diferentes cascatas de sinalização, sistemas de neurotransmissão, enzimas e outras proteínas (NOGUEIRA e ROCHA, 2011), o que reforça o potencial desse grupo de moléculas.

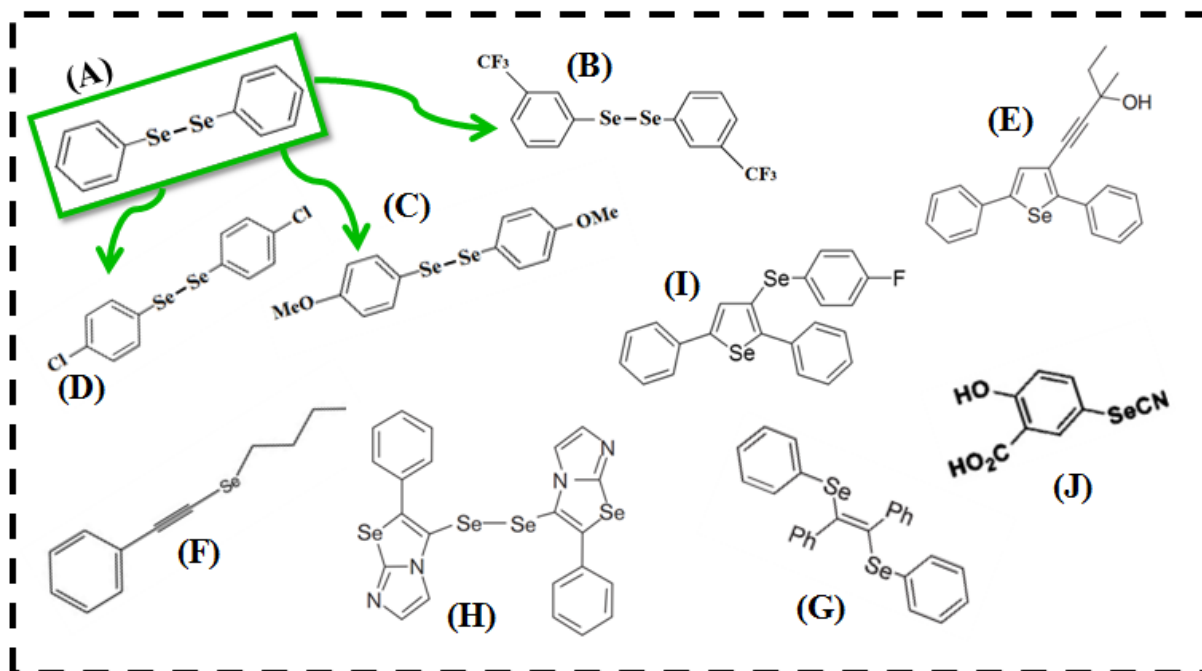


Figura 5: Estrutura molecular de alguns compostos orgânicos sintéticos de selênio cuja atividade antinociceptiva já foi reportada: **(A)** Disseleneto de Difênila; **(B)** Disseleneto de m-trifluormetil-fênila; **(C)** Disseleneto de p-metóxi-fênila; **(D)** Disseleneto de p-cloro-fênila; **(E)** 3-Alquinil-selenofeno; **(F)** 2-Feniletíl butil seleneto; **(G)** Difênil-1,2-bis(selenilfenil)etano; **(H)** Disseleneto de Bis(fenilimidazol-selenozolila); **(I)** 3-(4-fluorofenil-selenil)-2,5-difênil-selenofeno; **(J)** Ácido 2-hidroxi-4-selenocianatobenzóico.

1.2.3.1. Selenoesteróis

Em um trabalho pioneiro desenvolvido por Rodrigues e col (2010), a síntese de moléculas contendo núcleo esteroidal com diferentes substituintes foi conduzida, entre elas, os selenoesteróis (Figura 6), que são compostos esteroidais com o átomo de Se inserido na estrutura. Visando um maior potencial de bioassimilação, compostos com estruturas semelhantes a moléculas endógenas tem sido alvo de modificações estruturais, como por exemplo, o colesterol (IBRAHIM-OUALI, 2008). Este lipídeo está envolvido em diversas vias biossintéticas, entre elas a dos hormônios esteroidais, moléculas biologicamente muito ativas, às quais se atribui relação estrutura-atividade estreita. Dessa forma, a síntese de estruturas análogas ao colesterol, busca desenvolver drogas mais ativas, seletivas e bem toleradas, que possam ser usadas como alternativa terapêutica.

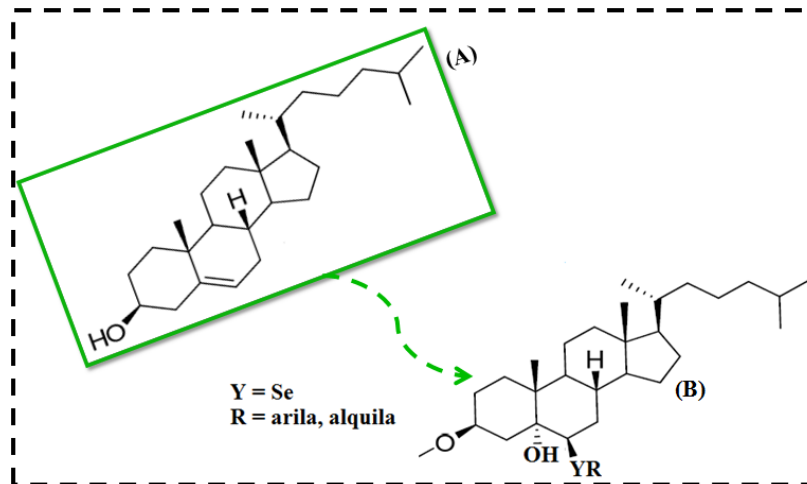


Figura 6. Esquema representativo da síntese de selenoesteróis. (A) Molécula do colesterol; (B) Selenoesterol. Adaptado de RODRIGUES et al., 2010.

Levando-se em conta as propriedades do Se, tanto na forma inorgânica, mas especialmente na forma orgânica, e as propriedades das moléculas esteroidais, descritas anteriormente, compostos que contemplem ambos em suas estruturas parecem ser candidatos promissores no que diz respeito aos efeitos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tendo em vista o referencial teórico abordado, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o possível efeito antinociceptivo de um derivado do selenoesterol, o *p*-cloro-selenoesterol (PCS), em modelos de nocicepção aguda em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

Considerando os aspectos mencionados, os objetivos específicos deste trabalho foram avaliar:

- ✓ Se o tratamento com o PCS apresenta efeito antinociceptivo em modelos agudos de nocicepção química, como o teste das contorções induzidas pelo ácido acético, teste do glutamato e teste da formalina, e de nocicepção térmica, teste da imersão da cauda, em camundongos;
- ✓ Investigar o possível envolvimento dos sistemas adenosinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, opioide e via do óxido nítrico sobre o efeito antinociceptivo do PCS;
- ✓ O efeito da administração repetida do PCS, durante sete dias, em parâmetros bioquímicos, como marcadores de funcionalidade hepática (atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferase [AST e ALT]), funcionalidade renal (ureia) e perfil lipídico (colesterol total e triglicérides) em camundongos, que possam estar relacionados a eventos de toxicidade.

3. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo, o qual está disposto da mesma forma em que foi publicado na Revista *European Journal of Pharmacology*.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Neuropharmacology and analgesia

Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of *p*-chloro-selenosteroid



Marcel Henrique Marcondes Sari^{a,b}, Ana Cristina Guerra Souza^{a,b},
Suzan Gonçalves Rosa^{a,b}, Diego Souza^{a,b}, Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues^{a,b},
Cristina Wayne Nogueira^{a,b,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

^b Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2013
Received in revised form
20 December 2013
Accepted 7 January 2014
Available online 15 January 2014

Keywords:

Organoselenium
Selenium
Antinociceptive
Adenosinergic system
Dopaminergic system
Mice

ABSTRACT

This study investigated the antinociceptive action of *p*-chloro-selenosteroid (PCS), administered by intragastric route (i.g.) to mice against acute models. The contribution of adenosinergic, dopaminergic, serotonergic, nitric oxide and opioid systems was investigated. It was evaluated if the administration of PCS triggers toxic effect. Treatment with PCS (10 mg/kg) reduced writhing induced by acetic acid and its effect lasts up to 48 h after treatment. The compound caused an inhibition in neurogenic and inflammatory phases of nociception and in paw edema induced by formalin. The licking behavior triggered by glutamate was reduced by PCS. In the tail-immersion test, PCS elicited an increase in delta latency response. Pretreatment with caffeine (3 mg/kg, intraperitoneally [i.p.]) and SCH58261 (3 mg/kg, i.p.), antagonist at adenosinergic receptors, SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) and sulpiride (5 mg/kg, i.p.), antagonist at dopaminergic receptors, caused a reduction in the antinociceptive action of PCS in the glutamate test. By contrast, pretreatment with WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.), ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.), L-arginine (600 mg/kg, i.p.) and naloxone (1 mg/kg, subcutaneous [s.c.]) did not abolish the antinociceptive effect caused by PCS (10 mg/kg, i.g.) administration. The animals treated with PCS did not show alterations in locomotor and exploratory activities, in biochemical parameters evaluated, food and water consumption, as well as in the body weight. These results clearly showed the antinociceptive action of PCS in different animal models without causing acute toxic effects in mice. Adenosinergic and dopaminergic systems seem to be related to the mechanisms by which PCS elicits antinociception.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Essentially, in physiological conditions, pain is a complex phenomenon resultant of the modulation of several peripheral and central mechanisms (Olesen et al., 2012). In such context, it constitutes an alarm that has the assisting role of preserving the organism, decreasing whatever is triggering the pain and, as a result, limiting the damaging consequences (Julius and Basbaum, 2001; Le Bars et al., 2001). Despite the great importance of pain, in some cases, its presence is enduring, devastating and debilitating, which limits productivity and substantially diminishes the well-being (Millan, 1999; Olesen et al., 2012).

The existing therapeutic treatments consist in the usage of several drugs. Such treatments are, in most cases, efficient; however, there are some concerns about their safety and the unpleasant side effects (Jage, 2005; Mitchell and Warner, 2006). These facts explain the enhanced interest in the development of new drugs with improved therapeutic index, which could be applied to control and relief of pain (Kennedy, 2007; Mao, 2009).

In such context, organoselenium compounds have excelled as an interesting resource of new synthetic substances with potential therapeutic applications due to their useful pharmacological activities (Nogueira and Rocha, 2011). Among them, the antinociceptive and anti-inflammatory properties have been studied by us and others (Bruning et al., 2010; Chagas et al., 2013; Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007), suggesting that these organoselenium compounds could be relevant drugs for the management of pain.

In addition, the synthesis and studies of steroids continue to be a topic of widespread interest (Ibrahim-Ouali, 2008). Oxygenated derivatives of cholesterol, also known as oxysterols, represent a

* Corresponding author at: Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, RS, Brasil. Tel.: + 55 55 32208140; fax: + 55 55 3220 8978.

E-mail address: criswn@quimica.ufsm.br (C. Wayne Nogueira).

group of biomolecules that has received more attention due to their relevant bioactivities, such as a possible regulation of cholesterol homeostasis (Gill et al., 2008), cytotoxicity (Vejuj et al., 2008), and even antitumoral and antileukemic activities for inducing apoptosis (Ayala-Torres et al., 1999). The combination of oxysterols and selenium is rare, and the designed synthesis of these compounds has a great potential for the creation of a new array of molecules with biological applications (Rodrigues et al., 2010).

By virtue of the aforementioned considerations, the objectives of this study were to investigate: (a) the antinociceptive effect of *p*-chloro-selenosteroid (PCS), a selenium-oxysterol, in chemical and thermal models of acute pain in mice; (b) the contribution of adenosinergic, dopaminergic, nitric oxide, serotonergic and opioid mechanisms in the antinociceptive effect elicited by PCS; and (c) the potential acute toxicity and possible nonspecific disruptions in locomotor and exploratory behaviors caused by PCS administration in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female adult Swiss mice (25–35 g) were used without monitoring the estrous cycle (Gomes et al., 2005), and kept in plastic boxes at controlled room temperature (22 ± 2 °C) with free access to food and water, under a 12 h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The animals were acclimatized at the laboratory before testing and used only once throughout the experiments. Mice were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, of the Federal University of Santa Maria, Brazil, and the ethical guidelines for investigations of experimental nociception in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. At the end of the experimental procedure, mice were killed by cervical displacement.

2.2. Drugs and reagents

PCS ($C_{34}H_{53}ClO_2Se$; Fig. 1) was prepared and characterized as previously described (Rodrigues et al., 2010). Analysis of the 1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. Naloxone, ondansetron, WAY100635, ketanserin, sulpiride, SCH23390, *L*-arginine hydrochloride (*L*-arginine), ω -nitro-*L*-arginine (*L*-NOArg), caffeine, and SCH58261 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals were obtained of the highest available commercial grade.

2.3. Experimental protocol

Animals were randomly assigned into different groups, each consisting of six to eight mice for the tests. The drugs were

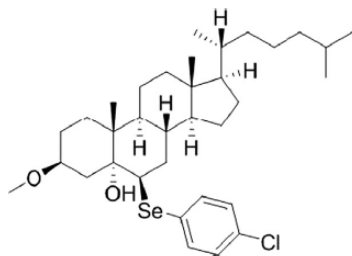


Fig. 1. Chemical structure of *p*-chloro-selenosteroid (PCS).

administered in a constant volume of 10 ml/kg of body weight. PCS was dissolved in canola oil (vehicle) and administered by intragastric route (i.g.) in a single administration for the behavioral tests. Appropriate vehicle-treated groups were simultaneously assessed to discard any effect of vehicle. For each test, dose- and time-response curves were performed.

In order to assess the dose-response curve, animals were treated with PCS at dose range of 1–10 mg/kg (i.g.), and treatment time was chosen taking into account the time-response curve for each test with PCS at a dose of 10 mg/kg. Treatment time used was chosen based on the best effect obtained in each test. Morphine (2.5 mg/kg, subcutaneous, 15 min earlier) (Savegnago et al., 2007) was used as the standard drug in nociceptive models. Moreover, before the tests, the animals were submitted to an evaluation of locomotor and exploratory activities, assessed by the open field task to discard any alteration that could be misinterpreted as nociception.

2.4. Nociceptive tests

2.4.1. Acetic acid-induced abdominal constriction

The abdominal constrictions were induced by an intraperitoneal injection (i.p.) of acetic acid (1.6%) according to the procedures described previously (Correa et al., 1996) with some modifications (Nogueira et al., 2003). After the acetic acid injection, mice ($n=92$) were individually placed in separate boxes, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min.

2.4.2. Nociception induced by glutamate

This test was carried out to investigate if PCS has antinociceptive effect on glutamate-induced nociception. The procedure used was similar to that of described previously (Beirith et al., 2002). A volume of 20 μ l of glutamate (20 μ mol/paw prepared in saline solution) was injected intraplantarly (i.pl.) into the ventral surface of the right hindpaw and the mice were observed individually for 15 min. The amount of time that animals ($n=67$) spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception.

2.4.3. Nociception and paw edema induced by formalin

The procedure was essentially the same as that prior described (Hunnskaar and Hole, 1987). The mice ($n=85$) received 20 μ l of a 2.5% formalin solution (0.92% of formaldehyde) i.pl. under the ventral surface of the right hindpaw and then individually placed in separate boxes and observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and 15 to 30 min (inflammatory phase). The time spent licking or biting the injected paw was recorded with a chronometer and considered as indicative of nociception.

The paw edema was measured by comparing the difference between the weight of the formalin-treated paw and the weight of the contralateral paw (vehicle-treated paw). After the test, animals were killed by cervical displacement, and both paws were cut at the ankle joint and immediately weighed on an analytical balance.

2.4.4. Tail-immersion induced nociception

The tail-immersion test was conducted as described previously (Janssen et al., 1963). Briefly, a 3.5 cm portion of the animals' tail ($n=68$) was marked and immersed into a cup freshly filled with water from a large constant temperature (52 °C) bath until the typical tail withdrawal response was observed (pre-drug latency) and later, after the treatment time, the same procedure was performed (pos-drug latency). A 10-s cut-off was used. Changes in tail-flick latency, Δt (seconds) latency, were calculated for each

subject according to the formula: $\Delta t(s) = \text{post-drug latency} - \text{pre-drug latency}$ (Pinardi et al., 2003).

2.5. Analysis of possible mechanisms of action of PCS

To address some of the mechanisms involved in the PCS antinociceptive action, distinct groups of animals were pretreated with different classes of drugs. For this purpose, the glutamate test was used to all tested mechanisms, because its rapid onset, short duration and the involvement of peripheral, spinal and supraspinal sites of action (Beirith et al., 2002). The only exception was for the investigation of the opioid system, in which the tail-immersion test was used (Minami et al., 2009).

The subeffective dosages, pre-treatment times and vehicles, that were used to dissolve drugs, did not have any effects and were selected in accordance with previous studies (Luiz et al., 2007; Santos et al., 1999, 2005; Savegnago et al., 2007). The antagonists were dissolved in isotonic saline solution (vehicle) and administered by the i.p. route in a single dose. The only exception was SCH58261 that was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (10 ml/kg), which was further diluted in isotonic saline to give a final concentration of 10% of DMSO in the drug injection solution. In both cases, the pH was adjusted to 7.0. Fifteen minutes after drug or vehicle administration, the animals were treated with PCS (10 mg/kg, i.g.) or its respective vehicle. Thirty minutes later, mice performed the open field task (see Section 2.7), to evaluate if the interaction between drug and PCS could cause any alterations in the locomotor and exploratory behaviors. Immediately after the open field task the nociception test was carried out.

2.5.1. Involvement of adenosinergic system

In an attempt to assess the possible involvement of the adenosinergic system to the antinociceptive action of PCS, the animals were pretreated with caffeine (3 mg/kg, i.p., $n=23$), a non-selective antagonist at adenosinergic receptors, SCH58261 (3 mg/kg, i.p., $n=24$), a selective antagonist at A2A receptor, or drug's vehicle (isotonic saline and isotonic saline plus 10% DMSO, respectively).

2.5.2. Involvement of dopaminergic system

In order to evaluate the participation of the dopaminergic system in the antinociceptive action of PCS, animals were treated with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p., $n=26$), a selective antagonist at dopamine D₁ receptor, sulpiride (5 mg/kg, i.p., $n=27$), an antagonist at dopamine D₂ and D₃ receptors, or drug's vehicle (isotonic saline).

2.5.3. Involvement of L-arginine-nitric oxide pathway

With the purpose of investigating the role played by L-arginine-nitric oxide pathway in the antinociception caused by PCS, mice ($n=29$) were treated with L-arginine, a nitric oxide precursor (600 mg/kg, i.p.), or vehicle and 20 min later they received PCS (10 mg/kg, i.g.), L-NOarg (75 mg/kg, i.p.), an inhibitor of nitric oxide synthase, or the respective vehicle (isotonic saline).

2.5.4. Involvement of serotonergic system

The possible contribution of the serotonergic system to the antinociceptive action of PCS was investigated using WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., $n=29$), a selective antagonist at 5-HT_{1A} receptor, ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., $n=28$), a selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} receptors, and ondansetron (0.5 mg/kg, i.p., $n=26$), a selective antagonist at 5-HT₃ receptor.

2.5.5. Involvement of opioid system

With the aim of exploring the possible participation of the opioid system in the antinociceptive action of PCS the tail-immersion test (Janssen et al., 1963) was used. According to Minami et al. (2009), this test is commonly used to evaluate the efficacy of many drugs, including opioid ones. For this end, the animals ($n=22$) were pretreated with naloxone, a non-selective antagonist at opioid receptors (1 mg/kg, s.c.), or vehicle. After 15 min, mice received PCS, morphine (2.5 mg/kg, s.c.) or respective vehicles.

2.6. Acute toxicity

In order to investigate any possible toxic effect caused by PCS, mice ($n=16$) received the compound (10 mg/kg, i.g.) or vehicle during seven days, once a day. The weight gain, water and food consumption and any signal of toxicity were monitored throughout the experiment. After 24 h of the last treatment, the animals were evaluated in the open field test. Immediately thereafter mice were slightly anesthetized prior to blood collection by heart puncture; the blood was collected into heparin sodium containing tubes following its centrifugation at 2000g for 10 min and used for the biochemical assays.

2.6.1. Open field task

Spontaneous locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activity (number of times reared on the hind limbs) behaviors were assessed using the open-field test (Walsh and Cummins, 1976). The open-field was made of plywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open-field, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). In this experiment, each animal was placed individually in the center of the apparatus to counting crosses and rearing, in a four-min session.

2.6.2. Biochemical analyses

The plasma enzymes aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, biochemical markers of acute hepatic damage, were measured. The renal function was analyzed by determining plasma urea levels. Because of the steroid structure of PCS, any interference in the plasma cholesterol and triglycerides levels was also investigated. All these parameters were determined by enzymatic colorimetric methods using commercial kits (Labtest Diagnostica, MG, Brazil). AST and ALT were expressed as UI/l, and urea, cholesterol and triglycerides levels were expressed as mg/dl.

2.7. Statistical analysis

All values in the figures and text are presented as the mean (s) \pm standard error of the means (S.E.M.) of n observation, representing the number of animals used in the experimental group. Probability values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as statically significant and able to be submitted to post hoc tests.

The acute toxicity, biochemical analyses, and open field task, were statistically evaluated using unpaired Student's t test. The only exception was the weight gain, which was submitted to repeated measure analysis of variance (ANOVA/MANOVA) with treatment (Vehicle or PCS) as the between variable and time as the within variable, post hoc Newman Keul's multiple range test was run when indicated.

The results obtained in the behavior nociceptive tests were statistically analyzed by one-way ANOVA and, when appropriate, subjected to the consecutive application of post hoc Newman Keul's test. The informations related to the involvement of different systems in the antinociceptive action caused by PCS (antagonists \times PCS) were

evaluated by two-way ANOVA and, if proper, followed by the post hoc Newman Keul's test.

3. Results

3.1. Effect of PCS on animal models of nociception

3.1.1. Acetic acid-induced abdominal constriction

The effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) on abdominal constrictions induced by acetic acid is depicted in Fig. 2. The antinociceptive action started in 5 min and remained significant for up to 48 h after administration of PCS [$F(8,54)=14.68$; $P<0.001$]. The PCS antinociceptive effect reached its peak in 120 min (Fig. 2A). Morphine (2.5 mg/kg, s.c.), used as positive control, also produced a significant antinociceptive effect (Fig. 2A). Moreover, PCS, administered 120 min earlier the test, at a dose of 5 mg/kg reduced significantly the number of writhes [$F(3,25)=62.28$; $P<0.001$] (Fig. 2B), but not at a dose of 1 mg/kg.

3.1.2. Nociception induced by glutamate

The results presented in Fig. 3 show that PCS (10 mg/kg, i.g.) and morphine (2.5 mg/kg, s.c.) produced a significant reduction of the licking behavior induced by glutamate i.pl. injected. The PCS effect began in 5 min of treatment and remained significant until 60 min [$F(5,38)=11.25$; $P<0.001$] (Fig. 3A). The dose–response curve shows that a dose of 5 mg/kg of PCS, given by i.g. route 30 min before test, was not an antinociceptive dose in the glutamate test [$F(2,20)=13.96$; $P<0.001$] (Fig. 3B).

3.1.3. Nociception and paw edema induced by formalin

The time–response curve shows the effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) in both phases, neurogenic and inflammatory, and in the paw edema induced by formalin (Fig. 4). The neurogenic nociception was blocked by PCS (10 mg/kg, i.g.) from 30 min of treatment and remained significant until 120 min [$F(6,49)=8.15$; $P<0.001$] (Fig. 4A). In the inflammatory phase, it was observed a significant

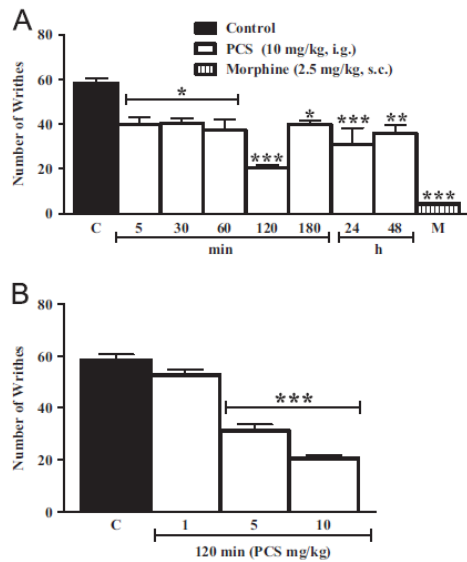


Fig. 2. Effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) on acetic acid-induced writhing movements. (A) Time-course response of PCS and (B) dose–response curve of PCS given 120 min earlier the test. Each column represents the mean with S.E.M. of 6–8 animals in each group. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test) (*) $P<0.05$ (**) $P<0.01$ (***) $P<0.001$.

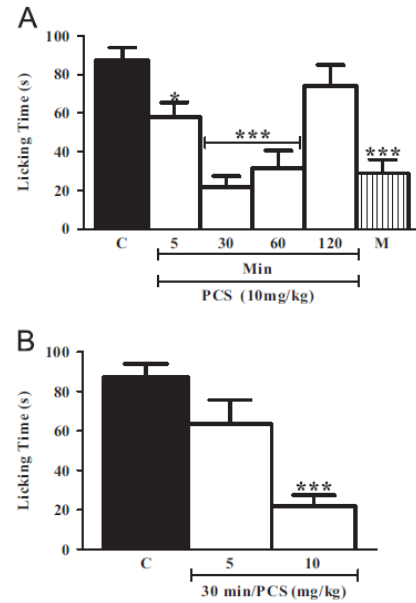


Fig. 3. Effect of PCS (10 mg/kg, i.g.) on licking behavior induced by glutamate in mice. (A) Time-course response and (B) dose–response curve of PCS given 30 min before the glutamate injection. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 6–8 mice in each group. Abbreviations: (C) Control indicates animals treated with canola oil and (M) animals treated with the control-positive morphine (2.5 mg/kg, s.c.). Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test) (*) $P<0.05$ (***) $P<0.001$.

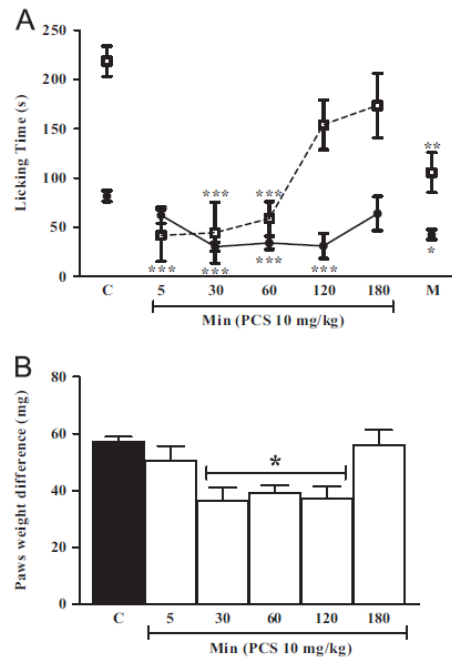


Fig. 4. Effect of PCS on licking behavior induced by formalin in mice. (A) Time-course of the antinociceptive effect of PCS, (●) neurogenic (0–5 min) and (□) inflammatory (15–30 min) phases. (B) Effect of PCS on the paw edema. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 6–8 mice in each group. Abbreviations: (C) Control indicates animals treated with canola oil and (M) animals treated with the control-positive morphine (2.5 mg/kg, s.c.). Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test) (*) $P<0.05$ (**) $P<0.01$ (***) $P<0.001$.

Table 1
Effect of pretreatment with PCS (mg/kg, i.g.) against formalin test in mice.

Groups	First phase (s)	Second phase (s)	Edema (mg)
Control	81.63 ± 5.51	218.5 ± 15.47	57.44 ± 2.10
1	72.67 ± 6.23	228.0 ± 17.50	54.17 ± 6.67
5	50.29 ± 10.7 ^a	180.1 ± 26.95	52.43 ± 4.55

Dose-course of PCS, given 30 min earlier the test, on licking behavior and the paw edema induced by formalin in mice. Data are reported as means ± S.E.M. of 6–8 animals. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test).

^a $P < 0.01$.

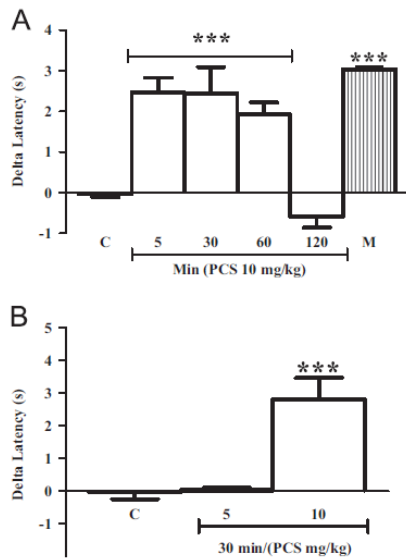


Fig. 5. Effect of PCS in tail-immersion test. (A) Time-course response and (B) dose–response curve of PCS given 30 min earlier the test. Each column represents the mean ± S.E.M. of 6–8 mice in each group. Abbreviations: (C) Control indicates animals treated with canola oil and (M) animals treated with the control-positive morphine (2.5 mg/kg, s.c.). Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test) (***) $P < 0.001$.

reduction in the nociceptive behavior from 5 min of treatment to 60 min [$F(6,49)=8.15$; $P < 0.001$] (Fig. 4A). Similarly, morphine (2.5 mg/kg, s.c.) produced a marked inhibition of both phases of the formalin test (Fig. 4A), but did not reduce edema (Data not shown). Besides, PCS (10 mg/kg, i.g.) prevented against paw edema formation [$F(5,42)=5.32$; $P < 0.001$] (Fig. 4B).

Table 1 shows the dose–response curve of PCS. Given 30 min before the test, at a dose of 5 mg/kg (i.g.), PCS significantly reduced the licking time during the neurogenic phase [$F(3,25)=11.63$; $P < 0.001$], but this effect was not observed at a dose of 1 mg/kg.

3.1.4. Tail-immersion test

The one-way ANOVA of data revealed that PCS (10 mg/kg, i.g.) caused a significant increase in Δt latency response compared to the control group. This effect started in 5 min and remained significant until 60 min of treatment. The positive control, morphine (2.5 mg/kg, s.c.), also showed higher Δt latency than that of control group [$F(5,38)=19.24$; $P < 0.0001$] (Fig. 5A). Treatment with PCS at a dose of 5 mg/kg (i.g.), 30 min prior the test, did not have any action against this thermal stimuli [$F(2,21)=17.77$; $P < 0.0057$] (Fig. 5B).

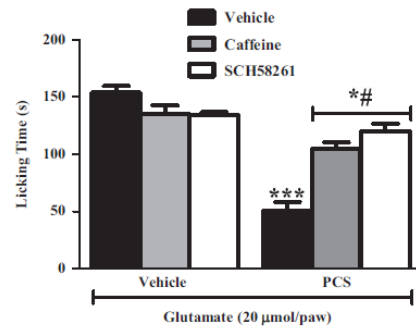


Fig. 6. Effect of pretreatment of animals with caffeine (3 mg/kg, i.p.) and SCH 5860 (3 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive profiles of PCS (10 mg/kg, i.g.) in glutamate-induced licking behavior. Abbreviations: (C) Control indicates animals treated with vehicle. Each column represents the mean ± S.E.M. of 6–8 animals for each group. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test. (***) $P < 0.001$ when compared to the control group and (**#) $P < 0.001$ when compared to the control and PCS groups.

3.2. Analyses of possible antinociceptive mechanisms of PCS action

All the antagonists used in the experiments did not cause any alterations in the locomotor and exploratory activities in the open field task, assessed by interaction between drug and PCS (Data not shown).

3.2.1. Adenosinergic system

The results depicted in Fig. 6 show the effect of caffeine (3 mg/kg, i.p.) on the antinociception caused by PCS administration in the glutamate test. The two-way ANOVA revealed significant main effects of PCS [$F(1,21)=95.62$; $P < 0.001$] and caffeine [$F(1,21)=6.80$; $P < 0.05$], and a PCS × caffeine interaction [$F(1,21)=28.20$; $P < 0.001$]. Post hoc analyses indicated that the treatment with caffeine partially reversed the antinociceptive effect caused by PCS.

Fig. 6 shows the effect of pretreatment with SCH58261 (3 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive activity of PCS. The two-way ANOVA revealed significant main effects of PCS [$F(1,23)=59.53$; $P < 0.001$] and SCH58261 [$F(1,23)=9.66$; $P < 0.05$], and a PCS × SCH58261 interaction [$F(1,23)=29.11$; $P < 0.001$]. Post hoc analyses indicated that the treatment with SCH58261 partially reversed the antinociceptive effect caused by PCS.

3.2.2. Dopaminergic system

Fig. 7 shows the effect of SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive action elicited by PCS. The two-way ANOVA of data demonstrated significant main effects caused by systemic treatment of animals with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) [$F(1,24)=77.08$; $P < 0.001$] and PCS [$F(1,24)=34.26$; $P < 0.001$], and a PCS × SCH23390 interaction [$F(1,24)=29.46$; $P < 0.001$] in the glutamate induced-licking in mice. Post hoc analyses indicated that the treatment with SCH23390 partially reversed antinociception caused by PCS administration.

Fig. 7 shows the effect of pretreatment of mice with sulpiride (5 mg/kg, i.p.) on the antinociception promoted by PCS in the glutamate test. The two-way ANOVA revealed significant main effects of sulpiride treatment [$F(1,25)=7.276$; $P < 0.05$] and PCS [$F(1,25)=58.20$; $P < 0.001$], but not of sulpiride × PCS interaction [$F(1,25)=0.403$; $P=0.530$]. Sulpiride caused a reduction in the antinociceptive effect elicited by PCS.

3.2.3. Nitric oxide pathway

The systemic pre-administration of L-arginine (600 mg/kg, i.p.) was not effective in blocking the antinociceptive effect of PCS in the glutamate test. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of PCS [$F(1,27)=99.25$; $P < 0.001$], but did not reveal L-arginine

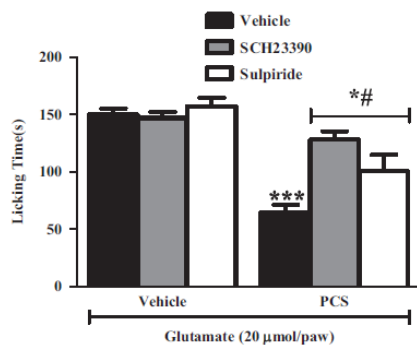


Fig. 7. Effect of pretreatment of animals with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) and sulpiride (5 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive profiles of PCS (10 mg/kg, i.g.) against glutamate-induced licking behavior. Abbreviations: (C) Control indicates animals treated with vehicle. Each column represents mean \pm S.E.M. of 6–8 animals for each group. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test. (***) $P < 0.001$ when compared to the control group and (**) $P < 0.001$ when compared to the control and PCS groups.

$[F(1,27)=0.710, P=0.406]$ and ι -arginine \times PCS interaction $[F(1,27)=2.175, P=0.151]$ (Data not shown).

Treatment with ι -arginine completely reversed antinociception caused by ι -NOARG (75 mg/kg, i.p.) in the glutamate test. The two-way ANOVA presented a significant main effect of ι -arginine $[F(1,27)=7.843, P < 0.01]$ and ι -arginine \times ι -NOARG interaction $[F(1,27)=20.98, P < 0.001]$ (Data not shown).

3.2.4. Serotonergic system

The antinociceptive effect caused by PCS in the glutamate test was not altered by the pretreatment of mice with different antagonist at serotonergic receptors. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of PCS $[F(1,27)=99.25, P < 0.001]$, but not of WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.) $[F(1,27)=0.710, P=0.406]$ and of PCS \times WAY100635 interaction $[F(1,27)=2.175, P=0.151]$. Likewise, the two-way ANOVA of data showed a significant main effect of PCS $[F(1,26)=49.03, P < 0.001]$, but did not show of ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.) $[F(1,26)=0.246; P > 0.623]$ and of PCS \times ketanserin interaction $[F(1,26)=1.256, P=0.272]$. The two-way ANOVA revealed a significant main effect of PCS $[F(1,24)=67.17, P < 0.001]$, but did not present of ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.) $[F(1,24)=0.282; P=0.600]$ and of PCS \times ondansetron interaction $[F(1,24)=0.192, P=0.664]$ (Data not shown).

3.2.5. Opioid system

The systemic pre-administration of mice with naloxone (1 mg/kg, s.c.) did not reverse the antinociceptive effect caused by PCS (10 mg/kg, i.g.) in the tail-immersion test. The two-way ANOVA showed a significant main effect of PCS $[F(1,20)=146.6, P < 0.001]$, but did not reveal naloxone $[F(1,20)=0.020, P=0.888]$ and PCS \times naloxone interaction $[F(1,20)=2.163, P=0.156]$ (Data not shown).

Treatment with naloxone completely reversed the antinociceptive effect caused by morphine (2.5 mg/kg, s.c.) $[F(1,20)=16.05; P < 0.001]$ (Data not shown).

3.3. Acute toxicity

The administration of PCS (10 mg/kg) to mice by i.g. route, during seven days, once a day, did not change neither the weight gain $[F(1,14)=0.508; P=0.896]$, food ($P=0.162; t=1.710$) and water ($P=0.186; t=1.591$) consumption, nor plasma ALT ($P=0.281; t=1.115$) and AST ($P=0.568; t=0.582$) activities as well as urea ($P=0.644; t=0.470$), cholesterol ($P=0.972; t=0.034$), and triglycerides ($P=0.063; t=1.994$)

levels when compared to those of the control group (Data not shown). This protocol of treatment did not cause any alteration in the locomotor, crossings ($P=0.946; t=0.068$), and exploratory, rearings ($P=0.517; t=0.664$), activities in the animals (Data not shown). In addition, during the execution of the experiments, no behavioral or physiological changes were observed in the subjects.

4. Discussion

This study evaluated the actions of PCS in animal models, providing evidence on the mechanisms implicated in its antinociceptive effect and if its administration might exert toxic effect in mice. The results show that PCS exerted antinociceptive action in different animal models. The contributions of adenosinergic and dopaminergic systems were demonstrated. Besides, PCS administration did not cause alterations in the weight gain, water and food consumption, biochemical parameters and in locomotor or exploratory activities.

Experimentally, there is chemical agents that can be used as nociceptive stimuli to assess pain and pre-clinically evaluate analgesic drugs (Le Bars et al., 2001). Considering such different states of pain evoke different changes (Barrot, 2012), models of pain in integrated systems are essential to better understand the antinociceptive properties observed for the compound. In the present study, chemical and thermal models of nociception were used to evaluate the effect of PCS against different algogens.

The acetic-acid model is a convenient stimulus assay for screening of substances that might have antinociceptive and/or anti-inflammatory actions. Its nociceptive effects are attributed indirectly to the production and the release of endogenous mediators (Ribeiro et al., 2000), which stimulate the nociceptive neurons, and directly by activation of non-selective cation channels located in the primary sensory pathways (Julius and Basbaum, 2001). The results reported here indicated that the i.g. administration of PCS (10 mg/kg) reduced the number of abdominal constrictions and had a fast onset and prolonged action in this test. Until now, there is no study about PCS pharmacokinetic or pharmacodynamic profile that could explain this result.

Another model applied in this study was the nociception induced by i.p.l. injection of glutamate, an agonist at glutamatergic receptors, which enables to evaluate whether the glutamatergic system is related to the antinociception caused by PCS. PCS reduced the nociceptive response in this test. It was reported that nociception induced by glutamate is primarily mediated by direct stimulation of nociceptive neurons triggering the release of neuropeptides, inflammatory mediators and nitric oxide involved in the transmission of pain (Beirith et al., 2002). Thus, the antinociceptive action observed in this model suggests a possible interaction between PCS and the glutamatergic system.

The results also indicate that PCS elicited a reduction of the formalin induced nociceptive behavior in both phases, neurogenic and inflammatory, as well as prevented the paw edema formation. This model allows evaluating two distinct phases of nociception sensitization: the first one is produced by intense stimulation of nociceptors and the release of substance P, bradykinin and glutamate (Goncalves et al., 2008). Therefore, this period reflects centrally mediated acute pain (Le Bars et al., 2001). The second phase is related to release of local pro-inflammatory mediators, such as histamine (Reeve and Dickenson, 1995), prostaglandins and leukotrienes (Santos et al., 2005) and is characterized by local edema and hypernociception (Capuano et al., 2009). Thereby, these results suggest that PCS has peripheral and central antinociceptive actions.

In order to confirm the possible central involvement in the PCS antinociceptive action, a tail-immersion test was performed. This model of thermal nociception is considered a spinally mediated

reflex even as its behavioral response could involve higher neural structures (Jensen and Yaksh, 1986). Besides the effect of PCS on chemical models of pain, PCS elicited antinociceptive action in this test. Therefore, this result suggests that the action of PCS includes a component with a central mechanism.

Taking into account these results, attempting to characterize some of the mechanisms through which PCS may exert its antinociception, pharmacological tools were used. Adenosinergic, dopaminergic, nitric oxide, serotonergic and opioid systems were tested to evaluate their involvement in the PCS antinociceptive action.

It has been acknowledged that adenosine, an endogenous substance, may play a critical role in the regulation of nociceptive transmission inputs at the spinal and periphery levels through adenosine receptors (Sawynok and Liu, 2003). Studies have shown that this effect could be due to the presynaptic inhibition release (Shen and Johnson, 2003) and postsynaptic regulation of the effects of excitatory neurotransmitters (Yang et al., 2004). Thus, adenosine has generally inhibitory effect on nervous system and its activation inhibits neural activity in many areas along the neuroaxis and consequently may modulate nociceptive inputs (Dunwiddie and Masino, 2001). In the present study, treatment with caffeine, a non selective antagonist at adenosine receptor, or SCH58261, a selective antagonist at A_{2A} receptor, partially reversed the antinociceptive effect of PCS. It suggests that the supposed action is related to a modulation of the adenosinergic system. It is important to reinforce that caffeine is a multi-target drug, exerting a number of pharmacological actions in different systems, such as blocking of $GABA_A$ receptors, inhibiting phosphodiesterase as well as promoting Ca^{2+} release, increasing the turnover of some monoamines, indirectly modulating the dopaminergic transmission (Fredholm et al., 1999; Sawynok, 2011). Considering it and the results shown in this study, it is possible to infer that there are other pathways involved in the PCS antinociceptive action.

The dopaminergic system seems to be related to nociception control in some models of pain (Hagelberg et al., 2003; Zarrindast et al., 1999). It is believed that when a harmful stimulation occurs, there is an increase in dopamine "turnover" in specific nervous system regions, suggesting an augmentation in the activity of descending dopaminergic pathways (Millan, 2002). Even though some studies confirm the involvement of this system in the antinociception, contradictory data have been reported. Whereas an activation of D2-like (D2/D3/D4) receptors (an inhibitory G-protein coupled receptor) leads to an inhibition of neuronal activity, the stimulation of D1-like (D1/D5) receptors (an excitatory G-protein coupled receptor) results in the opposite, an increasing in the neuronal activity. Both events directly influence the transmission of stimulus (Sheng et al., 2009). Additionally, some studies also indicate that both kinds of receptors are simultaneously implicated in modulation of nociceptive effects under different conditions of pain (Altier and Stewart, 1998; Lopez-Avila et al., 2004). This divergence among the studies may be due to varied experimental conditions and procedures, animal models used, as well as the brain areas investigated (Altier and Stewart, 1999). Treatment with SCH23390 (a selective antagonist at dopamine D_1 receptor) and sulpiride (an antagonist at dopamine D_2 and D_3 receptors) partially reversed the PCS antinociceptive effect, suggesting the involvement of the dopaminergic system in its action.

A number of literature reports have indicated the involvement of nitric oxide in modulating pain in the peripheral and central nervous system. It is well established that an increase in the production of nitric oxide will lead to an augmentation in the synthesis or release of pro-inflammatory mediators (Cury et al., 2011), promoting inflammatory reactions and nociceptive sensations. The results showed that the nitric oxide system is not

involved in PCS antinociception, because treatment with nitric oxide precursor, L-arginine, was not effective to reverse the antinociception elicited by PCS.

Studies have reported that the spinal serotonergic system may suppress incoming noxious input to the spinal cord and inhibit pain transmission, highlighting its role in the modulation of pain and nociception (Millan, 2002). Accordingly, it is well postulated that the activation of spinal serotonergic subtype receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ produces antinociception (Bardin et al., 2000). None of the serotonergic antagonists tested was effective to abolish the antinociceptive action of PCS, demonstrating that this system was not involved in the PCS action.

The opioid system modulates physiological processes, and among them stand out analgesia (Kieffer, 1995). The analgesic effect is mainly due to the activation of different opioid receptors, specially the subtype μ , producing notable effects against pain and nociception induced by different conditions (Jage, 2005). The present results showed that treatment with naloxone (a nonselective opioid receptor antagonist) did not reverse the PCS antinociceptive effect, suggesting that PCS action is not related to an interaction with opioid system.

Notwithstanding, even though the use of pharmacological tools contribute to better understand the effects of drugs, it is important to acknowledge their limitations. The selectivity of antagonists could vary according to dose, pretreatment time, route and animal species used in the study. The activities at multiple receptor subtypes could be interpreted as potential confounds. Thus, molecular tools would confirm and reinforce the effects demonstrated in the present study.

A major concern in experiments designed to evaluate the antinociceptive action of new agents is whether pharmacological treatment causes other behavioral alterations which could be misinterpreted as antinociception (Millan, 2002). The study showed that treatment with PCS had no effects on motor coordination. Moreover, acute treatment did not cause alteration in biochemical parameters as well as in the water and food consumption and weight gain. Therefore, these data highlight PCS relative safety in acute conditions of exposure and discards possible experimental pitfalls and/or potential artifacts.

In conclusion, the results show that PCS had antinociceptive action in different models without causing acute toxic effects in mice. The contribution of adenosinergic and dopaminergic systems was demonstrated in its action. Further studies, will enable the understanding of the exact mechanisms involved in the PCS actions and support its beneficial role in treatment of pain.

Acknowledgments

The authors declare that they have no personal and competing financial interests. The financial support by UFSM, CAPES, CNPq, FAPERGS/CNPq (PRONEX) Research Grant # 10/0005-1 and FAPERGS Research Grant # 10/0711-6 is gratefully acknowledged.

References

- Altier, N., Stewart, J., 1998. Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 208–215.
- Altier, N., Stewart, J., 1999. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci.* 65, 2269–2287.
- Ayala-Torres, S., Zhou, F., Thompson, E.B., 1999. Apoptosis induced by oxysterol in CEM cells is associated with negative regulation of c-Myc. *Exp. Cell Res.* 246, 193–202.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschaliere, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86, 11–18.

- Barrot, M., 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211, 39–50.
- Beirith, A., Santos, A.R., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924, 219–228.
- Bruning, C.A., Prigol, M., Roehrs, J.A., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2010. Evidence for the involvement of mu-opioid and delta-opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. *Behav. Pharmacol.* 21, 621–626.
- Capuano, A., De Corato, A., Treglia, M., Tringali, G., Dello Russo, C., Navarra, P., 2009. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 605, 57–62.
- Chagas, P.M., Bortolotto, C.F., Wilhelm, E.A., Roehrs, J.A., Nogueira, C.W., 2013. Bis (phenylimidazoselenazolyl) diselenide: a compound with antinociceptive properties in mice. *Behav. Pharmacol.* 24, 37–44.
- Correa, C.R., Kyle, D.J., Chakraverty, S., Calixto, J.B., 1996. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br. J. Pharmacol.* 117, 552–558.
- Cury, Y., Pico, G., Gutierrez, V.P., Ferreira, S.H., 2011. Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25, 243–254.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55.
- Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83–133.
- Gill, S., Chow, R., Brown, A.J., 2008. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* 47, 391–404.
- Gomes, P.B., Oliveira, M.M., Nogueira, C.R., Noronha, E.C., Carneiro, L.M., Bezerra, J.N., Neto, M.A., Vasconcelos, S.M., Fonteles, M.M., Viana, G.S., de Sousa, F.C., 2005. Study of antinociceptive effect of isolated fractions from *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 42–46.
- Goncalves, J.C., Oliveira Fde, S., Benedito, R.B., de Sousa, D.P., de Almeida, R.N., de Araujo, D.A., 2008. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1017–1020.
- Hagelberg, N., Forssell, H., Aalto, S., Rinne, J.O., Scheinin, H., Taiminen, T., Nagren, K., Eskola, O., Jaaskelainen, S.K., 2003. Altered dopamine D2 receptor binding in atypical facial pain. *Pain* 106, 43–48.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Ibrahim-Ouali, M., 2008. Synthesis of pentacyclic steroids. *Steroids* 73, 775–797.
- Jage, J., 2005. Opioid tolerance and dependence—do they matter? *Eur. J. Pain* 9, 157–162.
- Janssen, P.A., Niemegeers, C.J., Dony, J.G., 1963. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* 13, 502–507.
- Jensen, T.S., Yaksh, T.L., 1986. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. *Brain Res.* 363, 99–113.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
- Kennedy, J.D., 2007. Neuropathic pain: molecular complexity underlies continuing unmet medical need. *J. Med. Chem.* 50, 2547–2556.
- Kieffer, B.L., 1995. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 615–635.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Lopez-Avila, A., Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J.M., del Angel, R., Pellicer, F., 2004. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain* 111, 136–143.
- Luiz, A.P., Moura, J.D., Meotti, F.C., Guginski, G., Guimaraes, C.L., Azevedo, M.S., Rodrigues, A.L., Santos, A.R., 2007. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. *J. Ethnopharmacol.* 114, 355–363.
- Mao, J., 2009. Translational pain research: achievements and challenges. *J. Pain* 10, 1001–1011.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Minami, K., Hasegawa, M., Ito, H., Nakamura, A., Tomii, T., Matsumoto, M., Orita, S., Matsushima, S., Miyoshi, T., Masuno, K., Torii, M., Koike, K., Shimada, S., Kanemasa, T., Kihara, T., Narita, M., Suzuki, T., Kato, A., 2009. Morphine, oxycodone, and fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J. Pharmacol. Sci.* 111, 60–72.
- Mitchell, J.A., Warner, T.D., 2006. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 75–86.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A., Zeni, G., Rocha, J.B., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56–63.
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85, 1313–1359.
- Olesen, A.E., Andresen, T., Staahl, C., Drewes, A.M., 2012. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacol. Rev.* 64, 722–779.
- Pinardi, G., Sierralta, F., Miranda, H.F., 2003. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 603–608.
- Reeve, A.J., Dickenson, A.H., 1995. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2221–2228.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 111–118.
- Rodrigues, O.E.D., de Souza, D., Soares, L.C., Dornelles, L., Burrow, R.A., Appelt, H.R., Alves, C.F., Alves, D., Braga, A.L., 2010. Stereoselective synthesis of selenosteroids. *Tetrahedron Lett.* 51, 2237–2240.
- Santos, A.R., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 417–426.
- Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, H.M., Souza, M.M., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B., 2005. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology* 48, 1021–1034.
- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 555, 129–138.
- Sawynok, J., 2011. Caffeine and pain. *Pain* 152, 726–729.
- Sawynok, J., Liu, X.J., 2003. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 69, 313–340.
- Shen, K.Z., Johnson, S.W., 2003. Presynaptic inhibition of synaptic transmission by adenosine in rat subthalamic nucleus in vitro. *Neuroscience* 116, 99–106.
- Sheng, H.Y., Qu, C.L., Huo, F.Q., Du, J.Q., Tang, J.S., 2009. D-2-like but not D-1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: a GABAergic modulation mechanism. *Exp. Neurol.* 215, 128–134.
- Vejux, A., Malvitte, L., Lizard, G., 2008. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 545–556.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. Open-Field Test—critical-review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504.
- Yang, K., Fujita, T., Kumamoto, E., 2004. Adenosine inhibits GABAergic and glycinergic transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. *J. Neurophysiol.* 92, 2867–2877.
- Zarrindast, M.R., Nassiri-Rad, S., Pazouki, M., 1999. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. *Gen. Pharmacol.* 32, 517–522.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação, podemos concluir e/ou sugerir o seguinte:

O composto p-cloro-selenoesterol (PCS) apresentou efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor aguda em animais;

O mecanismo de ação antinociceptiva do PCS parece estar relacionado com os sistemas adenosinérgico e dopaminérgico;

Os sistemas serotoninérgico, opioide e a via do óxido nítrico não parecem estar relacionados com o efeito comportamental de antinocicepção do PCS;

A administração do PCS, no protocolo de tratamento proposto neste trabalho, não causou nenhum efeito tóxico nos animais.

5. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos nesta dissertação, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

Avaliar o possível efeito antialodínico e anti-hipernociceptivo do PCS em modelos de dor inflamatória persistente;

Avaliar o possível efeito do tratamento com PCS, em regime de protocolo agudo e crônico, em modelo de dor neuropática induzida pelo modelo da Constrição Parcial do Nervo Ciático;

Avaliar o possível efeito anti-inflamatório do PCS em modelos de inflamação aguda, como o modelo da pleurisia induzida por carragenina e edema auricular induzido pelo óleo de cróton, e mecanismos moleculares de ação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, I. M.; ITO, K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. **Monaldi Arch Chest Dis**, v. 55, p. 256-266, 2000.

ADCOCK, I. M.; LANE, S. J. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation. **J Endocrinol**, v. 178, p. 347 – 355, 2003.

ADRIAENSEN, H. et al. Opioid tolerance and dependence : an inevitable consequence of chronic treatment? **Acta Anaesth Belg**, v. 54, p. 37 – 47, 2003.

AGGARWAL, B. B. et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Bioch Pharmacol**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.

AHN, A. C. et al. Two styles of acupuncture for treating painful diabetic neuropathy—a pilot randomised control trial. **Acupunct Med**, v. 25, p. 11-17, 2007.

ALMEIDA, T. F. et al. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, p. 40 – 56, 2004.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 405-406, 2004.

BARBOSA, A.; NETO, I. G. Manual de Cuidados Paliativos - Núcleo de Cuidados Paliativos – Centro de Bioética - Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, p.65 – 91, 2006.

BARON, R. et al. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol**, v. 9, p. 807–819, 2010.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BECK M. A. et al. Selenium deficiency and viral infection. **J Nutr**, v. 133, p. 1463–1467, 2003.

BEHNE, D. et al. Evidence for specific selenium target tissue and new biologically important selenoproteins. **Biochimia Biophys Acta**, v. 966, p. 12 – 21, 1988.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem Biophys Res Co**, v. 173, p. 1143 – 1149, 1990.

BEIRITH, A. et al. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res**, v. 924, p. 219 - 228, 2002.

BENTON, D. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. **Nutr Neurosc**, v.5, p. 363 – 374, 2002.

BENYAMIN, R. et al. Opioid complications and side effects. **Pain Physician**, v. 11, p. 105 – 120, 2008.

BERTOLINI, A. et al. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 10, p. 1033-1043, 2002.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 610 – 1615, 1999.

BLONDELL, R. D. et al. Pharmacologic therapy for acute pain. **Am Fam Physycian**, v. 87, p. 766 – 772, 2013.

BLOOM, E. et al. Nuclear binding of glucocorticoid receptors: Relations between cytosol binding activation and the biological response. **J Steroid Biochem**, v. 12 p. 175-184, 1980.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane(1927–2004). **J Thermal Biol**, v. 31, p. 208–219, 2006.

BOVILL, J. G. Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Eur J Anaesthesiol Suppl**, v. 15, p. 9 – 15, 1997.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; JARVIS, M. F. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 1711-1716, 2009.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **Eur J Pain**, v. 10, p. 287-333, 2006.

BRENNAN, F. et al. Pain management: A fundamental human right. **Anesth Analg**, v.105, p.205-221, 2007.

BROOKS, P. et al. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II. **Rheumatol**, v.38, p. 779-788, 1999.

BRUERA, E. et al. Organic hallucinosis in patients receiving high doses of opiates for cancer pain. **Pain**, v. 48, p. 397 – 399, 1992.

BRUNING, C. A. et al. Evidence for the involvement of mu-opioid and delta-opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behav Pharmacol**, v. 21, p. 621 - 626, 2010.

BUCKMAN, T. et al. A comparison of the effect of dietary selenium on selenoprotein expression in rat brain and liver. **Biochimia Biophys Acta**, v. 1163, p. 176 – 184, 1993.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J Physiol**, v. 190, p. 541–562, 1967.

BURK, R.F.; HILL, K. E. Regulation of Selenoproteins. **Annu Rev Nutr**, v. 13, p. 65 - 81, 1993.

BUSILLO, J. M.; CIDLOWSKI, J. A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, p.109–119, 2013.

CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1 - 5, 2000.

CAMPOS, M. M. et al. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 646 – 651, 2007.

CASTANO, A. et al. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. **Neurochem Intern**, v. 30, p. 549 – 555, 1997.

CHAGAS, P. M. et al. Bis(phenylimidazoselenazoly) diselenide: a compound with antinociceptive properties in mice. **Behav Pharm**, v. 24, p. 37 – 44, 2013.

CHAGAS, P. M. et al. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 118, p. 87 – 95, 2014.

CHASE, K.M. Multicultural music therapy: A review of literature. **Music Ther Perspec**, v. 21, p. 84-88, 2003.

CHRISTRUP, L. L. Morphine metabolites. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, p. 116 – 122, 1997.

COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res Rev**, v. 24, p. 28 – 66, 1997.

COMASSETO, J. V. Selenium and tellurium chemistry: historical background. **J Braz Chem Soc**, v. 21, p. 2027–2031, 2010.

CONTI, M. et al. Frequency-modulated electromagnetic neural stimulation enhances cutaneous microvascular flow in patients with diabetic neuropathy. **J Diab Complic**, v. 23, p. 46-48, 2009.

CORRIGAN, F. M. et al. Reductions of zinc and selenium in brain in Alzheimer's disease. **J Trace Elem Exp Med**, v. 8, p. 1 - 5, 1991.

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

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359 – 371, 2005.

CUELLO, A. C. et al. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regul Pept**, v. 46, p. 155 – 164, 1993.

CURRY et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243 – 254, 2011.

da Rocha, J. T. et al. Diphenyl Diselenide Reduces Mechanical and Thermal Nociceptive Behavioral Responses After Unilateral Intrastratial Administration of 6-Hydroxydopamine in Rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 154, p. 372 – 378, 2013.

de GRAZIA, D.; ANDREW, R. Pain, suffering, and anxiety in animals and humans. **Theor Med**, v. 12, n. 3, p. 193 – 211, 1991.

DEMIR, Y. Non-Pharmacological Therapies in Pain Management, Pain Management – Current Issues and Opinions, Dr. Gabor Racz (Ed.), ISBN: 978-953-307-813-7, InTech, 2012. Disponível online em: < <http://www.intechopen.com/books/pain-management-current-issues-and-opinions/non-pharmacologicaltherapies-in-pain-management>>. Acessado em 16 de julho de 2014.

DILLARD, J. N.; KNAPP, S. Complementary and alternative pain therapy in the emergency department. **Emerg Med Clin North Am**, v. 23, p. 529 – 549, 2005.

DRAY, A. Pharmacology of peripheral afferent nerve terminals. In: YAKSH, T.L.; LYNCH, C.; ZAPOL, W.M. *Anesthesia: Biologic Foundations*. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 6, p. 543–556, 1997.

DREWES, A.M. The physiology of pain. *Ugeskr Laeger*, v.168, n. 20, p. 1941-1943, 2006.

DRIESSEN, B. **Pain: from sign to disease**. *Clin Tech Equine Pract*, v. 6, p. 120-125, 2007.

DUMONT, E. et al. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, v. 385, n. 7, p. 1304-1323, 2006.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence based recommendations. *Pain*, v. 132, p. 237 – 251, 2007.

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, v. 85, p. 3 – 14, 2010.
emergency department. *Emerg Med Clin North Am*, v. 23, p. 529-549, 2005.

ENNA, S. J.; MCCARSON, K. E. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol*, v. 54, p. 1 – 27, 2006.

ESCH, T.; STEFANO, G. B. Proinflammation: A common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. *Med Sci Monit*, v. 8, p. 1 – 9. 2002.

EVANSON, N. K. et al. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *J Neuroendocrinol*, v. 22, p. 846–861, 2010.

FAO/OMS. Report 7^a Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok. Thailand. **Human Vitamin and Mineral Requirements**, p. p. xxii + 286, 2002.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*, v. 240, p. 200 – 203, 1972.

FIELDS, H. L. et al. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci**, v. 14, p. 219-245, 1991.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: Wall, P.D.; Melzack, R.(eds). Textbook of pain. 4 th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 243 – 257, 1999.

FINNERUP, N. B. et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, p. 289 – 305, 2005.

FLOHÉ, L. et al. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. **FEBS Lett**, v. 32, p. 132 – 134, 1973.

FOORD, S. M. et al. G protein-coupled receptor list. International Union of Pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 2, p. 279-88, 2005.

GAI, B. M. et al. Depression-related behavior and mechanical allodynia are blocked by 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene in a mouse model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation. **Neuropharmacol**, v. 79, p. 580 – 589, 2014.

GALLUZZI, K. E. Managing neuropathic pain. **J Am Osteopath Assoc**, v. 107, p. 39-48, 2007.

GAO, S. et al. Selenium Level and Cognitive Function in Rural Elderly Chinese. **Am J Epidemiol**, v. 165, p. 955–965, 2007.

GARCIA, T. J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 353, p. 429 – 430, 2005.

GE, K.; YANG, G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. **Am J Clin Nutr Suppl**, v. 57, p. 259 – 263, 1993.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, v. 140, p. 918 – 934, 2010.

GROENEWEG, F. L. et al. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **J Endocrinol**, v. 209, p. 153–167, 2011.

GUSTORFF, B. et al. Prevalence of self reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 52, p. 132 – 136, 2008.

HALLER, J. et al. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. **Front Neuroendocrinol**, v, 29, p. 273–291, 2008.

HARDY, J. D. et al. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. **J Clin Invest**, v.29, n.1, p.115-140, 1950.

HARKLESS, L. B. et al. Improved foot sensitivity and pain reduction in patients with peripheral neuropathy after treatment with monochromatic infrared photo energy—MIRE. **J Diab Complic**, v. 20, p. 81 – 86, 2006.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. **Int J Biochem Cel Biol**, v. 33, p. 555 - 575, 2001.

HELLYER, P. W. et al. Pain and its management. In: TRANQUILLI, W.J.; HURMON, J.C.; GRIMM, K.A. *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing, cap. 3, p. 31-35, 2007.

HENRY, D. et al. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **Brit Med J**, v. 312, p. 1563 – 1566, 1996.

HILL, R. G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, v. 7, p. 282 - 292, 2001.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 237 – 271, 1985.

HURWITZ, B. E. et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 viral load with selenium supplementation: a randomized controlled trial. **Arch Intern Med**, v. 167, p. 148–54, 2007.

IBRAHIM-OUALI, M. Synthesis of pentacyclic steroids. **Steroids**, v. 73, p. 775 - 797, 2008.

IEWLEWA, E. O. et al. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African J Biotechnol**, v. 25, p. 2868 – 2885, 2007.

JENSEN, T. S. Opioids in the brain: supraspinal mechanisms in pain control. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, p. 123 – 132, 1997.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. **Sci STKE**, v. 252, p. 1 – 19, 2004

JONES, S. L. Descending noradrenergic influences on pain. **Prog Brain Res**, v. 88, p. 381 – 394, 1991.

JONES, M .T.; TIPTAFT, E. M. Structure-activity relationship of various corticosteroids on the feedback control of corticotrophin secretion. **Br J Pharmacol**, v. 59, p. 35 – 41, 1977.

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

KATZ, N. The Impact of Pain Management on Quality of Life. **J Pain Symptom Manage**, v. 24, p. 38 – 47, 2002.

KAUSHAL, N. et al. Selenium and Inflammation. **Selenium**, p. 443 - 456, 2012.

KENNEDY, J. D. Neuropathic pain: molecular complexity underlies continuing unmet medical need. **J Med Chem**, v. 50, p. 2547-2556, 2007.

- KERN, E. Cultural historical aspects of pain. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, v. 38, p. 165 – 181, 1987.
- KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanism of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, v. 87, p. 3 – 11, 2001.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of Pain. **Achiv Vet Sci**, v. 13, p. 1 – 12, 2008.
- KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.
- KUNER, R. Central Mechanisms of pathological pain. **Nat Med**, v. 16, p. 1258 – 1266, 2010.
- LAMONT, L.A. et al. Physiology of pain. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.
- LANE, N. E.; LUKERT, B. The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 27, p. 465- 483, 1998.
- LAWLOR, P. G. The panorama of opioid-related cognitive dysfunction in patients with cancer. **Cancer**, v. 94, p. 1836 – 1853, 2002.
- LETT, A. The Future of Reflexology. **Complem Ther Nurs Midw**, v. 8, p. 84-90, 2002.
- LI, G. S. et al. Keshan disease: an endemic cardiomyopathy in China. **Hum Pathol**, v. 16, n. 6, p. 602-9, 1985.
- LI, L.; MANOR, B. Long term Tai-Chi exercise improves physical performance among people with peripheral neuropathy. **Am J Chin Med**, v. 38, p. 449–459, 2010.
- LI, L.; HONDZINSKI, J. M. Select exercise modalities may reverse movement dysfunction because of peripheral neuropathy. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 40, p. 133–137, 2012.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutr Rev**, v. 65, p. 140 – 146, 2007.

LOESER. J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**. v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D. Pain and suffering. **Clin J Pain**, v. 16, p. 2 – 6, 2000.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D.. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, p. 473-477, 2008.

LUCHESE, C. et al. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidences for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 644, p. 49 – 54, 2010..

LYNCH, J.W. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1051–1095, 2004.

MAO, J. Translational pain research: achievements and challenges. **J Pain**, v. 10, 1001-1011, 2009.

MAX, M. B. Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. **Neurobiol**, v. 37, p. 598 – 596, 1987.

MEISENHELDER, J. B.; CHANDLER, E. N. Prayer and health outcomes in church members. **Altern Ther Health Med**, v. 6, p. 56-60, 2000.

MENDELL, J. R.; SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1243 – 1255, 2003.

MESSLINGER , K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, p. 355 – 474, 2002.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev**, v. 51, p. 240 – 264, 2006.

MOORE, F. L.; EVANS, S. J. Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence. **Brain Behav Evol**, v. 54, p. 41–50, 1999.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas. **Eur J Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, v. 55, p. 603–613, 2000.

NICHOLSON, B. Responsible prescribing of opioids for the management of chronic pain. **Drugs**, v. 63, p. 17-32, 2003.

NIRRAJJI, C. et al. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian J Pharm Sci**, v. 69, p. 344 – 351, 2007.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res**, v. 52, p. 56 - 63, 2003.

NOGUEIRA, C. W. et al. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA C.W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **J Braz Chem Soc**, v. 21, p. 2055 - 2071, 2010.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

O'CONNOR, A. B.; DWORKIN, R. H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. **Am J Med**, v. 122, p. 22 – 32, 2009.

OGAWA, A. et al. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Cerebrovasc Dis**, v. 9, p. 112–118, 1999.

OLESEN, A. E. et al. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. **Pharmacol Rev**, v. 64, p. 722-779, 2012.

OLSON, K. et al. A phase II trial of Reiki for the management of pain in advanced cancer patients. *J Pain Symptom Manage*, v. 26, p. 990 – 997, 2003.

OSPINA, M.; HARSTALL, C. Prevalence of chronic pain: an overview. Health Technology Assessment, 28th Report. Edmonton, Canada: Alberta Heritage Foundation for Medical Research, 2002.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, p. 775 - 806, 2007.

PARADA, C.A. et al. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesia state in the rat. **Neuroscience**, v. 120, p. 219 – 226, 2003.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog Drug Res**, v. 36, p. 10 – 47, 1991.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. New York: Lippincott-Raven, 1998.

PAYNE, R. Limitations of NSAIDs for Pain Management: Toxicity or Lack of Efficacy?. **J Pain**, v. 1, p. 14 – 18, 2000.

PEDROSO R. A.; CELICH K. L. S. Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em enfermagem. **Texto Contexto Enferm.**, v.15, p. 270 - 276, 2006.

PHILLIPPS, G. H. Structure-activity relationships of topically active steroids: the selection of fluticasone propionate. **Respir Med**, v. 84, p. 19 – 23, 1990.

PINTO, L. G. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 88, p. 487 – 496, 2008.

PRICE, D. Psychological mechanisms of pain and analgesia. Seattle: IASP Press, 1999.

RANG, H. P. et al. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **Br Med Bull**, v. 47, n. 3, p. 534-548, 1991.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p. 233 –241, 2000.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **Brit J Nutr**, v. 100, p. 254-268, 2008.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, p, 1256–1268, 2012.

REEH, P. W.; STEEN, K. H. Tissue acidosis in nociception and pain. **Prog Brain Res**, v. 113, p. 143–151, 1996.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids– new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1711–1723, 2005.

RIJSDIJK, M. et al. The Effects of Glucocorticoids on Neuropathic Pain: A Review with Emphasis on Intrathecal Methylprednisolone Acetate Delivery. **Anesth Analg**, v. 118, p. 1097 – 1112, 2014.

ROCHA, A. P. et al. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 57, p. 94–105, 2007.

RODRIGUES, O. E. D. et al. Stereoselective synthesis of selenosteroids. **Tetrahedron Lett**, v. 51, p. 2237 -2240, 2010.

ROWBOTHAM, M. C. Mechanisms of neuropathic pain and their implications for the design of clinical trials. **Neurology**, v. 65, p. 66-73, 2005.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123 – 133, 1998.

SALTER, M.W. Cellular signaling pathways of spinal pain neuroplasticity as target for analgesic development. *Curr Top Med Chem*, v. 6, p. 557 – 567, 2005.

SARTORI, G. et al. Bis-vinyl selenides obtained via iron(III) catalyzed addition of PhSeSePh to alkynes: synthesis and antinociceptive activity. **Org Biomol Chem**, v. 11, p. 1199 – 1208, 2013.

SAVAGE, S. R. Opioid therapy of chronic pain: assessment of consequences. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 43, p. 909 – 917, 1999.

SAVEGNAGO, L. et al. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. **Brain Res**, v. 1175, p. 54 – 59, 2007.

SCHAIBLE, H. -G. Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. **HEP**, v. 177, p. 3 – 28, 2006.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotro-pic hormone: adrenocorticoidal steroids and their sintethic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. Ed: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, et al. 9th ed. New York: McGraw-Hill, p. 1459-1486, 1986.

SCHMUTZLER, C. et al. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. **Biol Chem**, v. 388, p. 1053–1059, 2007.

SCHWARTZ, K.; FOLTSZ, P. J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J Am Chem Soc**, v. 79, p. 200 - 214, 1957.

SHER, L. Possible role of selenium in the neurobiology of depression and suicidal behavior in patients with alcohol use disorders. **Int Disabil Human Develop**, v. 6, p. 227–230, 2007.

SHER, L. Role of selenium depletion in the effects of dialyses on mood and behavior. **Med Hypoth**, v. 59, p. 89 – 91, 2002.

SHERRINGTON, C. S. *The Integrative Action of the Nervous System* (Scribner, New York), 1906.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, p. 385 – 405, 2004.

SORKIN, L.S.; CARLTON, S.M. Spinal anatomy and pharmacology of afferent processing. In: YAKSH, T.L.; LYNCH, C.; ZAPOL, W.M. **Anesthesia: Biologic Foundations**. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997.

SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Rad Biol Med**, v. 20, p. 131 – 143, 1993.

STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 49, p. 93 – 110, 1980.

STAZI, A. V.; TRINTI, B. Selenium deficiency in celiac disease: risk of autoimmune thyroid disease. **Minerva Med**, v. 99, p. 643- 653, 2008.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **N Engl J Med**, v. 332, p. 1685-1690, 1995.

STEIN, C. et al. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat Med**, v.9, n.8, p. 1003-1008, 2003.

STREETEN, D. H. Corticosteroid therapy. I. Pharmacological properties and principles of corticosteroid use. **JAMA**, v. 9, p. 944 – 947, 1975.

TAPIERO, H. et al. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed Pharm**, v. 57, p. 134– 144, 2003.

THACKER, M. A. et al. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth Analg**, v. 105, p. 838-847, 2007.

TINGGI, U. Selenium: Its role as antioxidant in human health. **Environ Health Prev Med**, v. 13, p. 102–108, 2008.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. Em: Dickenson, A., Besson, J. (eds). **The Pharmacology of Pain, Springer: Verlag, Berlin**.v. 130/I p. 1-20, 1997.

TURNER, J. L. Postoperative analgesia. In: McGoldrick KE. **Ambul Anesthesiol**. A problem oriented approach. Baltimore: Williams & Wilkins, p.656-669, 1995.

VANE, J. R. et al. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Am J Med**, v. 104, p. 2 – 8, 1998.

VERHAAK, P. F. et al. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. **Pain**, v. 77, p. 231-239, 1998.

VERRI Jr, W.A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v.112, p.116-138, 2006.

VINIK A. Clinical Review: Use of antiepileptic drugs in the treatment of chronic painful diabetic neuropathy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, p. 4936-45, 2005.

VRANKEN, J. H. et al. Pregabalin in patients with central neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a flexible-dose regimen. **Pain**, v. 136, p. 150 – 157, 2008.

WALL, P. D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **J Physiol**, v. 3, p. 403 – 423, 1967.

WASNER, G. et al. Postherpetic neuralgia: topical lidocaine is effective in nociceptor-deprived skin. **J Neurol**, v. 252, p. 677 – 686, 2005.

WILHELM, E. A. et al. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, p. 419 – 425, 2009.

WOLLEMANN, M. Recent developments in the molecular biology of pain. **Acta Biol Szegediensis**, v. 55, p. 1 – 6, 2011.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Pain**, v. 353, p. 1959 – 1964, 1999.

WOOLF, C.; MANNION, R. Neuropathic pain. **Lancet**, v. 354, p. 953 – 954, 1999.

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

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism specific pharmacologic management. **Ann Intern Med**, v. 140, p. 441 – 451, 2004.

World Health Organization. WHO's pain relief ladder. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/>>. Acessado em 16 de julho, 2014.

YAMAGUCHI, T. et al. Ebselen in acute ischemic stroke. A placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Stroke**, v. 29, p. 12 – 17, 1998.

YEDGAR, S. et al. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword? **Pharmacol Sci**, v.28, n.9, p.459-464, 2007.

YOUNG, V. R. et al. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 35, n. 5, p. 1076-1088, 1982.

ZACNY, J. P. A review of the effects of opioids on psychomotor and cognitive functioning in humans. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 3, p. 432 – 466, 1995.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, p. 23 – 37, 2001.