



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

**ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO  
DISSELENETO DE DIFENILA EM CAMUNDONGOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Lucielli Savegnago**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO DISSELENETO DE  
DIFENILA EM CAMUNDONGOS**

**por**

**Lucielli Savegnago**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Zeni**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de  
Doutorado

**ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO DISSELENETO DE DIFENILA  
EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por  
**Lucielli Savegnago**

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em  
Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Gilson Zeni (Orientador)

---

Prof. Dr. Félix Antunes Soares (UFSM)

---

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (UFSM)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Matha Campos (PUC/POA)

---

Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza (UFRGS)

**Santa Maria, agosto de 2007.**

*“ É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver”*

*(Martin Luther King)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar com a sua luz divina.

A minha família, em especial, minha mãe e aos meus irmãos, meus maiores exemplos, pelo apoio incessante e incentivo constante na busca dos meus objetivos.

Ao Diego (“Schumi”), meu amorzinho, por ser tão especial em minha vida e me fazer acreditar que amar vale a pena. Te amo muito !!!

Aos meus orientadores Cristina e Gilson, agradeço pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de perseverança incansável ao ensino e a ciência. Saibam que levarei comigo mais que um aprendizado científico, aprendi em seus grupos de pesquisa que o companheirismo e a união tornam a nossa trajetória melhor e com maior número de conquistas. Cris e GZ, muito obrigada!

Ao professor João Batista por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada!

Aos meus queridos IC's, Cristiano e Larissa, pela ajuda incondicional, pela dedicação, pela lealdade, pela amizade e por contribuírem muito para a minha formação profissional. Obrigada, por tornarem tão agradável a realização deste trabalho. Acredito que não existam palavras para expressar a minha gratidão a vocês. Adoro vocês!

A minha segunda família, “pessoal do lab”: Marina, Vanessa, Lysandro, Alexandre, Simone W, Eluza, Cristiane, Fran, Nilda, Ricardo, pela amizade, por um olhar de apoio, um gesto de compreensão e paciência, um ombro amigo, uma palavra de incentivo. A todos vocês, que compartilharam dos meus ideais a minha gratidão e respeito. Obrigada!

Em especial à Marina e a Vanessa, pela amizade, ajuda incondicional, companheirismo, desabafos e incentivo. Obrigada!

À Simone P, Gabi, Ethel, César, Carina, Liomara, Raquel, Aninha, Bibi, Carine, Renata, Marlon, Carmine, pela amizade, e aos vários momentos de desconcentração. Foi muito bom trabalhar na companhia de vcs!

Ao pessoal do lab. da Química: Schumakinho, Jesus, Maneco, Juliano, Flávia, Carol, Alison, Zé, Elvis, Benhur, Tuane, Dani, Paty, obrigada pela parceria, festas, e pela síntese dos compostos. Obrigada!!

Ao pessoal do Lab. do prof. João pelo companheirismo. Obrigada!

Aos colegas que tomaram outros rumos, Flávia, Ana Paula Ardais, Dionéia, Tati, Gisele, Jozi, Márcio, Carlos Eduardo, Eduardo, Dionei, Fabrício e Guilherme, pelo companheirismo e amizade.

Ao Rinaldo por cuidar tão bem dos animais.

À Angélica e a Márcia, secretárias da Pós-graduação pela paciência e solicitude com que resolvem todos os nossos problemas.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM pelos ensinamentos.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade, e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### ESTUDOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO DISSELENETO DE DIFENILA EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Lucielli Savegnago  
ORIENTADOR: Gilson Zeni  
CO-ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira  
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, agosto de 2007.

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm sido alvos de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas e de suas propriedades farmacológicas. O disseleneto de difenila é um composto orgânico de selênio que apresenta baixa toxicidade quando administrado pela via subcutânea em camundongos, nas doses em que exerce ação antinociceptiva e antiinflamatória. Assim, a pesquisa dos mecanismos pelos quais esse composto exerce seus efeitos é importante para a sua aplicação biológica. Desta forma, no presente trabalho investigou-se a toxicidade aguda induzida pelo disseleneto de difenila quando administrado pela via oral em camundongos e as propriedades antinociceptiva e antiinflamatória desse composto, bem como os possíveis mecanismos envolvidos em tal processo. A administração oral do disseleneto de difenila causou baixa toxicidade o que foi evidenciado pelo índice de mortalidade (dose letal > 312 mg/kg). Apesar do disseleneto de difenila não ter apresentado evidências de toxicidade renal e hepática, o ganho de peso corporal dos camundongos foi reduzido, o que pode indicar toxicidade sistêmica causada por esse composto. A administração oral do disseleneto de difenila reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, bem como, preveniu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato, capsaicina, formalina, bradicinina (BK) e acetato de forbol miristato (PMA). A administração oral do disseleneto de difenila foi capaz de prevenir a nocicepção térmica, no modelo da imersão da cauda a 55°C. O disseleneto de difenila co-injetado intraplantar com o glutamato causou redução significativa na reposta nociceptiva induzida pelo glutamato, sendo que esse efeito antinociceptivo local foi bloqueado pelo pré-tratamento local com a L-arginina e com o ditiotreitol (DTT). Além disso, a administração oral do disseleneto de difenila preveniu a nocicepção induzida pela injeção intratecal (i.t.) de glutamato, ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDA), capsaicina, BK, substância P (SP), fator de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), mas não bloqueou significativamente a nocicepção causada pela injeção i.t. do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionico (AMPA), cainato e ácido ( $\pm$ )-1-aminoclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD). A antinocicepção causada pela administração oral do disseleneto de difenila no teste da formalina foi revertida pelo pré-tratamento com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), N <sup>$\omega$</sup> -nitro-L-arginina (L-NOARG,

inibidor da enzima óxido nítrico sintase - NOS), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, inibidor da guanilato ciclase), azul de metileno (inibidor inespecífico da guanilato ciclase), tetraetilamônio (TEA; bloqueador de diferentes tipos de canais de potássio, inclusive os dependentes de voltagem), apamina (bloqueador de canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio) e caribidotoxina (bloqueador de canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio), mas não foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com glibenclamida (bloqueador de canais de  $K^+$  dependente de ATP) e com o inativador da proteína  $G_{i/o}$  (toxina pertussis). O tratamento oral com disseleneto de difenila reduziu a alodínia mecânica induzida pela ligadura parcial de nervo ciático (dor neuropática) e pela injeção i.pl. de FCA (dor inflamatória crônica) e preveniu a hiperalgesia térmica induzida pela BK, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), glutamato e NMDA. De acordo com o presente trabalho pode-se sugerir que os mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila em camundongos envolvem a participação da via do óxido nítrico/ guanosina monofosfato cíclica (GMPc) /canais  $Ca^{2+}$  e  $K^+$ , inibição da PKC e PKA, além da participação dos sistemas glutamatérgicos, peptidérgicos e vanilóides.

**Palavras-chave:** disseleneto de difenila, selênio, dor aguda, dor crônica, nocicepção, inflamação.



## ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Studies of mechanisms involved in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in mice**

AUTHOR: Lucielli Savegnago

ADVISOR: Gilson Zeni

CO-ADVISER: Cristina Wayne Nogueira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, august 2007

The interest in organoselenium biochemistry and pharmacology has increased in the last two decades due to a variety of organoselenium compounds that possess biological activity. Accordingly, diphenyl diselenide, a simple diaryl diselenide, is known as a safety drug when administered acutely to mice at doses that have antiinflammatory and antinociceptive activities. Therefore, the research of the mechanisms by which this compound exerts its effects is extremely important for the therapeutic application. Based on the considerations above, the aims of the present study were to evaluate the acute toxicity induced by diphenyl diselenide in mice using oral route of administration with the purpose of offering safety in the use of this compound and to verify the antinociceptive and antiinflammatory activities caused by diphenyl diselenide as well as its mechanisms of action. Diphenyl diselenide administered orally produced minor toxicological effects which were evidenced by the index of mortality (lethal-dose > 312 mg/kg). Although diphenyl diselenide did not provide evidence for renal or hepatic toxicity, the body weight gain in mice exposed to this compound was reduced, which might indicate systemic toxicity. The oral administration (p.o.) of diphenyl diselenide inhibited acetic acid-induced abdominal constriction as well as capsaicin-, glutamate- bradykinin (BK)- phorbol myristate acetate (PMA)- and formalin induced nociception and caused a significant increase in tail-immersion response latency time. In addition, diphenyl diselenide co-injected intraplantarly (i.pl.) in association with glutamate induced a significant reduction of the licking and in the paw oedema formation induced by glutamate. The local pre-treatment of mice with L-arginine and dithiothreitol (DTT; i.pl.) restored local antinociception caused by diphenyl diselenide when analyzed against glutamate-induced nociception. Moreover, diphenyl diselenide, given orally, caused significant inhibition of the biting behavior induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), substance P (SP), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), BK and capsaicin, but completely failed to affect the nociception induced by  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-mehtyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), kainate and ( $\pm$ )-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (*trans*-ACPD). The antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test was reversed by i.t. injection of several K<sup>+</sup> channel blockers such as apamin and charybdotoxin (large- and small-conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel inhibitors, respectively),

tetraethylammonium (TEA, non-selective voltage-dependent K<sup>+</sup> channel inhibitor), but not glibenclamide (ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel inhibitor). Injection of mice with inhibitor of nitric oxide (NO) synthase (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine; L-NOARG), guanylyl cyclase inhibitors (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one - ODQ; and methylene blue) and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) significantly blocked the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide when assessed on the formalin test. In contrast, i.t. injection of pertussis toxin, an inactivator of G<sub>i/o</sub> protein, did not antagonize the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in the formalin test. Diphenyl diselenide increased nociceptive threshold in mechanical allodynia induced by both partial sciatic nerve ligation (neuropathic pain) and ACF i.pl. injection (inflammatory chronic pain) as well as attenuated acute thermal hyperalgesia induced by i.t. injection of glutamate, NMDA, BK and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Together these results suggested the participation of nitric oxide/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel, pathways, inhibition PKA e PKC, as well as glutamatergic, peptidergic and vanilloid systems in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in mice.

**Key words:** diphenyl diselenide, selenium, acute pain, chronic pain, nociception, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônios sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	9
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos.....	11
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática demonstrando a transmissão e o processamento da dor da periferia ao SNC.....	12
<b>Figura 4:</b> Diagrama esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal que recebem as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes.....	13
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do ebselen.....	31
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do disseleneto de difenila.....	31
<b>Artigo 1</b>	
<b>Figura 1:</b> Effect of diphenyl diselenide administered orally against acetic-acid induced writhing movements in mice.....	41
<b>Figura 2:</b> Effect of diphenyl diselenide administered orally against capsaicin-induced licking in mice.....	42
<b>Figura 3:</b> Effect of diphenyl diselenide administered orally on the tail-immersion test in mice.....	42

**Figura 4:** Effect of pre-treatment of animals with L-arginine on the antinociceptive profiles of diphenyl diselenide and N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginine methyl ester against the glutamate -induced licking (A) and paw oedema (B) in mice..... 43

**Figura 5:** Effect of pre-treatment of animals with dithiothreitol on the antinociceptive profiles of diphenyl diselenide and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) against the glutamate -induced licking (A) and paw oedema (B) in mice..... 43

## Artigo 2

**Figura 1:** Effect of diphenyl diselenide administered orally against glutamate (A), NMDA (B), AMPA (C), kainite (D) or trans-ACPD (E)- induced biting in mice..... 51

**Figura 2:** Effect of diphenyl diselenide administered orally on the nociceptive behavior induced by substance P (A), IL-1 $\beta$  (B) -or TNF- $\alpha$  (C)..... 52

**Figura 3:** Effect of diphenyl diselenide on the biting response caused by injection of BK (A) or capsaicin (B)..... 52

## Artigo 3

**Figura 1:** Effect of diphenyl diselenide given by oral route on the licking (A, B) and oedema (C) induced by formalin in mice. The total time spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and the second (15 - 30 min, panel B) phase after intraplantar injection of formalin. The oedema (panel C) was measured at the end of second phase of formalin test. The effect of diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o) given 5 min after the formalin injection in mice has been demonstrated in panel D..... 80

**Figura 2:** Effect of pretreatment of mice with L-NOARG (panels A and B), ODQ (panels C and D) and methylene blue (panels E and F) 10 min before injection of diphenyl diselenide against the first and the second phase of formalin-induced licking in mice ..... 81

**Figura 3:** Effect of pretreatment of mice with tetraethylammonium (panels A and B), charybdotoxin (panels C and D), apamin (panels E and F) and glibenclamide (panels G and H) on the antinociceptive profiles by diphenyl diselenide and morphine and morphine against formalin-induced nociception in mice..... 82

#### Artigo 4

**Figura 1:** Effect of diphenyl diselenide administered orally on mechanical allodynia induced by sciatic nerve injury in response to 10 applications of 0.6 g VFH..... 101

**Figura 2:** Effect of diphenyl diselenide administered orally on mechanical allodynia in response to 10 applications of 0.6 g VFH induced by CFA in mice..... 102

**Figura 3:** Effect of diphenyl diselenide administered orally on the glutamate (panel A)-, NMDA (panel B)-, PGE<sub>2</sub> (panel C) or BK (panel D)- induced nociceptive response in mice..... 103

#### Discussão

**Figura 7:** Possíveis sítios de ação do disseleneto de difenila..... 114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Effect of diphenyl diselenide, administered orally, on the body weight gain in mice.....	41
<b>Tabela 2</b> - Effect of diphenyl diselenide administered orally on biochemical parameters in mice.....	41
<b>Tabela 3</b> - Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and oedema induced by glutamate in mice.....	42
<b>Tabela 4</b> - Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and paw oedema induced by bradykinin in mice.....	43
<b>Tabela 5</b> - Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and paw oedema induced by PMA in mice.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µmol/kg	micromol por quilograma
ACF	adjuvante complete de Freund
ADP	adenosina difosfato
ALT	alanina amino transferase
AMPA	ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolopropiônico
AMPc	adenosina monofosfato-cíclico
AST	aspartato amino transferase
ATP	adenosina trifosfato
BK	bradicinina
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CAL	calidina
CCK	colecistocinina
CCDVs	canais de cálcio dependente de voltagem
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
DI <sub>50</sub>	dose que inibe a resposta em 50%
DL <sub>50</sub>	dose que causa 50% de morte
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitól
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
Eros	espécies reativas de oxigênio
GC	guanilato ciclase
GMPc	guanosina monofosfato-3'-5'-cíclico
GTP	guanosina trifosfato
i.c.v.	intracerebroventricular
iGluRs	receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL-1β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6

IL-8	interleucina-8
IM	inibição máxima
iNOS	sintase do óxido nítrico induzida
i.p.	intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
i.pl.	intraplantar
i.t.	intratecal
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
L-NOARG	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
LOX	lipoxigenase
m/s	metros por segundo
mg/Kg	miligramas por quilogramas
MAPKs	proteínas quinases ativada por mitógenos
mGluRs	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mm	milímetros
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NGF	fator de crescimento neuronal
NK	neurocinina
NK1	neurocinina 1
NK2	neurocinina 2
NK3	neurocinina 3
NKA	neurocinina A
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
nNOS	sintase de óxido nítrico neuronal
NPY	neuropeptídeo Y
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
P2X3	receptor purinérgico ionotrópico 3
PAF	fator de agregação plaquetária
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PG	prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	prostaglandina D <sub>2</sub>



PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandina I <sub>2</sub>
PI-3K	fosfoinositol 3-quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PL <sub>A2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	fosfolipase C
PMA	acetato forbol miristato
p.o	<i>per</i> via oral
PTZ	pentilenotetrazol
RVM	medula rostroventromedial
s.c.	subcutânea
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervosa periférico
SP	substância P
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
trans-ACPD	ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
TEA	Tetraetilamônio
TRPV1	receptor vanilóide transiente do tipo 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Dor.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Transmissão da dor.....	6
2.1.2 Processamento central da dor.....	11
2.1.3 Mediadores químicos.....	15
2.1.3.1 Glutamato.....	16
2.1.3.2 Óxido nítrico.....	18
2.1.3.3 Substância P .....	19
2.1.3.4 Cininas .....	20
2.1.3.5 Prostaglandinas .....	21
<b>2.2 Dor inflamatória.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Dor neuropática.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Selênio.....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Características químicas .....	26
2.4.2 Biodisponibilidade do selênio.....	26
2.4.3 Atividade biológica.....	27
<b>2.5 Compostos orgânicos de selênio.....</b>	<b>29</b>
2.5.1 Ebselen.....	29
2.5.2 Disseleneto de difenila.....	31
2.5.2.1 Propriedades farmacológicas.....	31
2.5.2.2 Propriedades toxicológicas.....	32
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Propriedades antinociceptivas do disseleneto de difenila: Evidências de mecanismos de ação.....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Artigo 1: Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action.....	37
<b>4.2 Mecanismos espinhas na ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila.....</b>	<b>48</b>

4.2.1 Artigo 2: Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide.....	48
<b>4.3 Envolvimento da via do óxido nítrico/GMP cíclico/canais de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> na ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila no teste da formalina.....</b>	<b>55</b>
4.3.1 Artigo 3: Involvement of nitric oxide/cyclic GMP/ and - channels pathway in the antinociception caused by diphenyl diselenide in the formalin test.....	55
<b>4.4 Disseleneto de difenila atenua a hiperalgesia térmica e o comportamento de dor inflamatória persistente e neuropática em camundongos.....</b>	<b>83</b>
4.4.1 Artigo 4: Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice.....	83
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>8. DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....</b>	<b>151</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam na íntegra o presente estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** encontradas no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre todos os artigos científicos contidos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO** desta tese.

## 1- INTRODUÇÃO

Dentre os diversos sistemas de “vigilância” da homeostase do organismo, a dor tem papel de destaque por despertar nossa atenção imediatamente. Além de despertar, retém nossa atenção até que o ponto sensível tenha sido identificado e o evento que está desencadeando a lesão, ou represente risco, tenha sido afastado (Wall, 1999). Desse modo, o primeiro propósito da dor aguda é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), permitindo que mecanismos de defesa ou de fuga sejam adotados (Millan, 1999).

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor, mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa (neuropatias). Nesses quadros patológicos, o processamento sensorial é anormal (Besson, 1999). Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas principalmente, está associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (Besson, 1999; Woolf e Mannion, 1999).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Sensações possuem vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Experiências incorporam os componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam a percepção final da dor (Millan, 1999).

De uma forma geral, o estímulo nociceptivo depende da ação de mediadores que são comuns ao processo inflamatório, principalmente, em casos de dor crônica

(Ferreira e Nakamura, 1979; Clatworthy et al., 1995; Khasar et al., 1999; Bennett et al., 2000; Ji e Strichartz, 2004). Neste contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória são empregadas no tratamento contra a dor. Na verdade, a grande maioria dos fármacos presentes no mercado que são utilizados para o controle da dor, possuem um cunho antiinflamatório (Mendell e Sahenk, 2003).

Estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e anatômicos têm contribuído para o descobrimento de múltiplos mediadores químicos envolvidos na dor, o que facilita o entendimento dos mecanismos de ação dos neurotransmissores e das drogas envolvidas na modulação central e periférica da dor (Levine e Taiwo, 1994; Wood e Docherty, 1997; Millan, 1999). Por isso, muitos esforços têm sido dedicados, buscando compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na origem da dor, com o objetivo de encontrar drogas eficazes, com baixos efeitos colaterais e que possam ser empregadas nestas circunstâncias. De fato, atualmente, não existe tratamento satisfatório e nem medidas adequadas e específicas para o controle da dor (Kingery, 1997; Woolf e Mannion, 1999; Mendell e Sahenk, 2003).

Os compostos orgânicos do selênio, os quais possuem síntese simples e atividades farmacológicas relevantes, têm sido alvo de interesse e estudo (Muller et al., 1984; Nogueira et al., 2003a, b; Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004; Zasso et al., 2005). O ebselen, composto orgânico que contém selênio, é conhecido como um antioxidante e importante agente capaz de mimetizar a atividade da enzima glutathiona peroxidase (Muller et al., 1984). Além dessas propriedades, o ebselen possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória, as quais podem ser resultantes da sua capacidade de neutralizar o peroxinitrito e inibir a proteína quinase C (PKC), a óxido nítrico sintase (NOS) e a 5-lipoxigenase (LOX) (Parnhan e Graf, 1987; Cotgreave et al., 1989; Schewe, 1995; Walther et al., 1999; Mugesh et al., 2001).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o disseleneto de difenila apresenta maior atividade em mimetizar a enzima glutathiona peroxidase e menor toxicidade quando comparado ao ebselen (Meotti et al., 2004). Além disso, o disseleneto de difenila, quando administrado pela via subcutânea (s.c) e intraperitoneal (i.p.) apresenta várias propriedades farmacológicas como: antinociceptiva, antiinflamatória, antioxidante, anti-úlceras, neuroprotetora hepatoprotetora, anti-hiperglicemiante e também protege contra a discinesia orofacial induzida por reserpina e haloperidol (Nogueira et al., 2003a, b, 2004; Ghisleni et al, 2003, Borges et al., 2005a, 2006; Savegnago et al., 2006; Burger et al,

2004, 2006). Além disso, Rosa et al (2006) demonstraram que o disseleneto de difenila administrado em camundongos induz facilitação da formação da memória, sem causar neurotoxicidade comportamental.

Tendo em vista que até o momento as atividades farmacológicas atribuídas ao disseleneto de difenila foram obtidas a partir da sua administração pela via subcutânea ou intraperitoneal, tornou-se importante investigar a toxicidade aguda induzida pelo disseleneto de difenila quando administrado pela via oral, com o propósito de estender o estudo farmacológico e/ou toxicológico sobre esse composto. Além disso, no presente estudo, foram investigadas as possíveis ações antinociceptivas e antiinflamatórias causadas pelo disseleneto de difenila quando administrado pela via oral, bem como, foram esclarecidos alguns mecanismos pelos quais esse composto esteja exercendo tal efeito. Para isso, foram avaliados os efeitos causados pelo disseleneto de difenila em modelos de nocicepção aguda e crônica (através de modelos de nocicepção neuropática e inflamatória) em camundongos.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Dor

O organismo possui diversos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor tem papel de destaque, pois atua como um mecanismo de alerta do corpo, pois “informa” que algo está ameaçando o bem-estar e retém a atenção até que a causa tenha sido identificada e afastada (Wall, 1999). Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de muitas doenças. Porém, quando persistente, a dor provoca reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (Chapman e Gavrin, 1999; Julius e Basbaum, 2001; Griffis et al., 2006).

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (Loeser e Melzack, 1999). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (Julius e Basbaum, 2001). Neste sentido, a dor parece ser influenciada por fatores tanto fisiológicos (sensoriais) quanto psicológicos, e a nocicepção refere-se apenas a parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. De fato, o componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias. Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo. Neste sentido, em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental evidenciada, desta maneira, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção (Tjølsen e Hole, 1997).

Em termos de duração, uma sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores (receptores responsáveis em detectar um estímulo doloroso) acontece na ausência de qualquer dano tecidual,



e, neste caso, desempenha função protetora do organismo contra possíveis danos teciduais. Em contrapartida, a dor aguda é uma resposta normal causada por uma lesão de tecido com conseqüente ativação dos nociceptores no local da lesão, sendo que a dor desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Este tipo de dor geralmente aparece após cirurgias ou situações traumáticas e persiste menos que um mês, possuindo também caráter protetor. Por fim, a dor crônica é causada por uma lesão tecidual ou doença que geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, este tipo de dor não desaparece mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido, podendo durar meses ou anos, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento (Lotsch e Geisslinger, 2001; Loeser e Melzack, 1999).

Não é apenas a duração que distingue a dor aguda da dor crônica, mas a capacidade do organismo de reparar o sítio da lesão e restaurar os disparos aferentes e o processamento central normal (Loeser, 2000). Pode-se destacar ainda, alterações adaptativas como a neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, tais como sensibilização, desinibição dos neurônios inibitórios do corno dorsal, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal e alterações na facilitação e inibição descendente da dor. Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e da duração do estímulo, quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna o tratamento do quadro patológico (Besson, 1999; Woolf e Salter, 2000; Zimmermann, 2001; Wang e Wang, 2003).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão freqüentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (Stein et al., 2003). Na dor crônica, muitos eventos ocorrem em associação com os eventos básicos da nocicepção, que alteram a relação entre o estímulo e a resposta nociceptiva e afetam a modulação do estado doloroso resultante. Além disso, alterações centrais crônicas na neuroquímica da sinalização da dor produzem hipersensibilidade, aumentando a freqüência e duração dos impulsos aferentes. Ademais, mudanças estruturais secundárias à lesão nervosa periférica incluem a perda de interneurônios espinhais, rearranjos não apropriados de processos neurais aferentes na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas no gânglio sensorial. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras e da participação do sistema imune (Dray et al., 1994; Perkins e Tracey, 2000; Watkins

e Maier, 2002; Dogrul et al., 2003). Especificamente, ainda não foi esclarecido até que ponto os mecanismos envolvidos nestas síndromes diferem daqueles implicados em processos de dor aguda, no qual reside o ponto crítico para o desenvolvimento de terapias racionais (Aley et al., 2000).

Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor: 1) a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; 2) a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”); 3) a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e 4) a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (Millan, 1999).

No entanto, quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, pode ocorrer um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (Dray, 1997). Dentre as desordens que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo doloroso) e a alodínia (dor resultante de um estímulo que é normalmente não nocivo) (Millan, 1999). Todavia, estudos recentes relatam que embora a distinção entre hiperalgesia e alodínia em humanos possa apresentar valor clínico, a base molecular desta diferença permanece obscura. Além disso, tem sido sugerido que a utilização do termo hipernocicepção é mais apropriada quando se trata de resultados obtidos com técnicas de avaliação da sensibilidade mecânica em animais (Parada et al, 2003).

### 2.1.1 Transmissão da dor

A percepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas localizadas na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais, denominadas nociceptores (ou receptores da dor), os quais são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele; é ela que fornece a maioria das informações nociceptivas (dolorosas, que são resultantes de lesões ou que

poderiam causar lesões) periféricas ao sistema nervoso central (SNC) (Julius e Basbaum, 2001).

A sensibilização dos nociceptores se deve a diferentes estímulos, tais como, mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (Julius e Basbaum, 2001).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes primárias (neurônios de primeira ordem) ao SNC. Essas fibras são classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, essencialmente em três tipos: 1) fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s); 2) fibras A $\delta$ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s) e 3) fibras A $\beta$ : espessas (mais de 10 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (Millan, 1999) (Figura 1). Na pele, a proporção entre esses três tipos de fibras é de 70, 10 e 20% respectivamente, mas esses valores podem variar de acordo com a espécie e região do corpo analisada.

As fibras descritas acima respondem de maneira diferente aos estímulos inócuos e agressivos. As fibras A $\beta$  respondem somente ao toque, vibração, pressão e outros tipos de estimulação sensorial que não sejam nociceptivos, como estímulos mecânicos de baixa intensidade (Millan, 1999). No entanto, a estimulação dessas fibras pode aliviar a dor, é o que ocorre quando elas são ativadas por fricção da pele pela mão após alguma lesão.

A maioria das fibras C são polimodais, isto é, são ativadas por estímulos nocivos mecânicos ou térmicos e ainda por estímulos nocivos de origem química como ácidos e a capsaicina. Algumas fibras do tipo C são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem a estímulos térmicos de alta ou baixa intensidade (Julius e Basbaum, 2001). Essas fibras são classificadas em dois grupos, de acordo com o seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no

corno dorsal da medula espinhal (Hunt e Rossi, 1985). As fibras C não-peptidérgicas expressam o receptor purinérgico  $P_2X_3$ , o receptor para o fator neurotrófico derivado da glia Ret e sítios de ligação para a isolecitina  $B_4$ , cujos terminais sinápticos localizam-se mais internamente na substância gelatinosa da medula espinhal (especialmente na lâmina II). O outro grupo de fibras C denominadas peptidérgicas sintetiza peptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo. Essas fibras fazem conexões com neurônios da lâmina mais externa do corno dorsal da medula (especialmente na lâmina I) (Cuello et al., 1993; Averil et al., 1995).

Por sua vez, as fibras  $A\delta$ , são conhecidas como mecanotermo nociceptores, ou seja, fibras responsivas às estimulações nociceptivas mecânicas e térmicas. Além disso, essas fibras podem ser classificadas em fibras  $A\delta$  do tipo I, respondem a estímulos de calor intenso (até 53 °C) e fibras  $A\delta$  do tipo II que respondem a temperaturas menores que 43°C (Shelley e Cross, 1994; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

Sob circunstâncias normais, apenas as fibras C e  $A\delta$  transmitem as informações nociceptivas da periferia à medula espinhal, porém estudos recentes utilizando animais transgênicos em conjunto com informações fisiológicas, farmacológicas e bioquímicas, têm demonstrado o papel das três categorias de fibras sensoriais nos processos de dor persistente (Dray e Perkins, 1997; Grubb, 1998; Besson, 1999).

Tipos de fibras	A $\alpha$ e A $\beta$	A $\delta$ (I e II)	C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 $\mu$ m	2-6 $\mu$ m	0,4-1,2 $\mu$ m
Velocidade de condução	30-100 m/s	1,2-30 m/s	0,5-2 m/s
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

**Figura 1:** Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônio sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001.

Dentro deste contexto, a sensibilização dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos, mecânicos e /ou químicos, o que ocasiona na liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam ou facilitam a transmissão da informação ao SNC (Figura 2). Esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann. Quando é considerado um quadro crônico, também participam da transmissão nociceptiva mediadores liberados a partir de células inflamatórias (Besson, 1999).

Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e na transmissão da dor, destacando-se entre eles, os metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), peptídeos (bradicinina, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, substância P (SP), colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, serotonina, citocinas, óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), prótons, entre outros. Além desse, outros mediadores químicos, tais como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato),

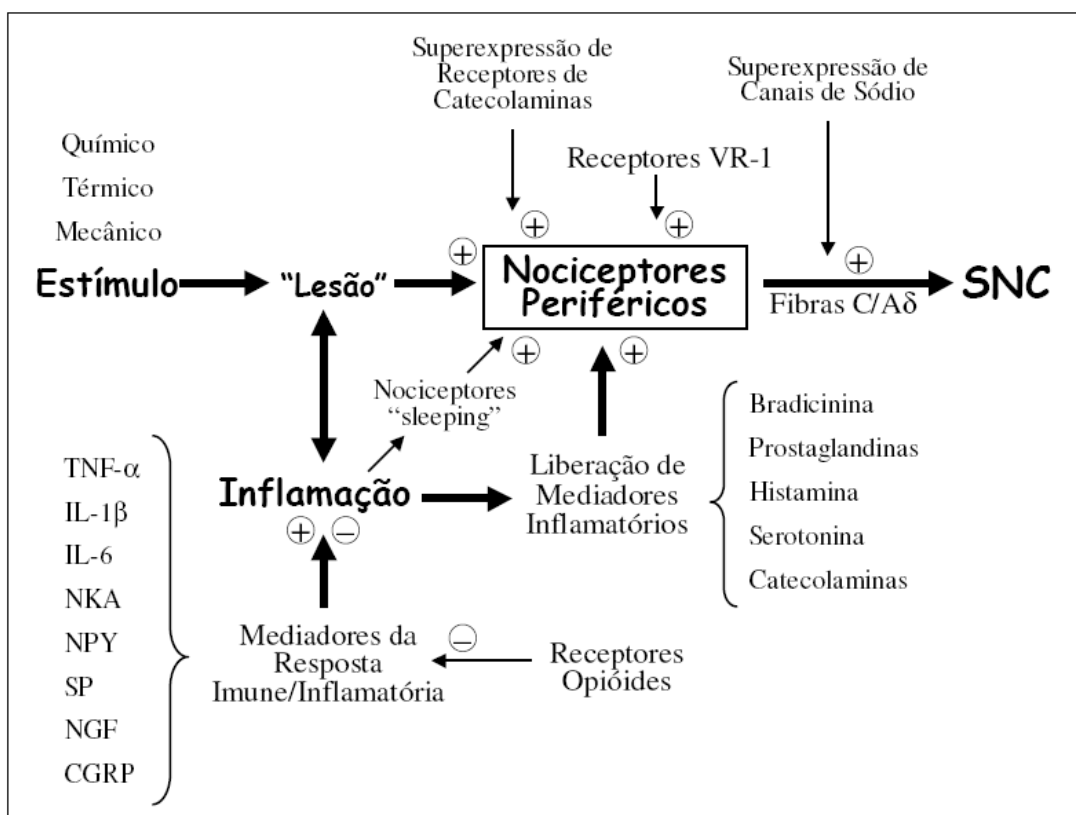
acetilcolina, e outros, que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina, capsaicina, ácido acético), são também responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto central. Alguns mediadores atuam através da interação com receptores acoplados a proteínas G, desencadeando a formação de segundos mensageiros, como o adenosina monofosfato-cíclico (AMPc), guanosina monofosfato-cíclico (GMPc), várias classes de proteínas quinase, inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG), aumento de cálcio intracelular e ativação de canais iônicos. Estes eventos iniciais induzem a ativação secundária de quinases intracelulares tais como a proteína quinase A (PKA) e PKC. Outros mediadores da nocicepção ativam diretamente canais iônicos, os quais são capazes de alterar a permeabilidade da membrana a íons (Pleuvry e Lauretti, 1996; Millan, 1999; Calixto et al., 2000; Petersen-Zeitz e Basbaum, 1999; Woolf e Salter, 2000; Julius e Basbaum, 2001; Parada et al., 2003).

Em processos dolorosos mais persistentes observam-se descargas ectópicas espontâneas nas fibras aferentes primárias relacionadas a alterações nos canais iônicos regulados por voltagem, desencadeando dor espontânea de origem nervosa (Sah et al., 2003; Lai et al., 2003; Lograsso e Mckelvy, 2003). Estes canais estão localizados na membrana plasmática de axônios lesados ou próximos ao local da lesão, e/ou no gânglio da raiz dorsal (Holden e Pizzi, 2003; Lograsso e Mckelvy, 2003).

Os canais de sódio ativados por voltagem, os quais produzem um influxo de íons Na<sup>+</sup> necessário para a produção de um potencial de ação regenerativo, estão expressos em neurônios sensoriais primários e são alvos importantes no estudo da patofisiologia molecular da dor e na procura de novas terapias (Waxman et al., 1999; Petersen e Rowbothan, 2000; Veneroni et al., 2003).

Atualmente, vem crescendo o interesse pelo esclarecimento da possível participação dos canais de cálcio nos processos de dor crônica. O íon Ca<sup>2+</sup> entra nas terminações nervosas através de canais e regula muitas funções, incluindo proteínas relacionadas ao crescimento. Os canais de cálcio do tipo L e N estão diretamente implicados na liberação de neurotransmissores e de neuromoduladores, como o CGRP, nos neurônios sensoriais da medula espinhal. O bloqueio dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo N e P/Q, mas não do tipo L, reduz os sinais comportamentais da dor de origem neuropática em modelos animais de lesão

nervosa, porém, a ausência de antagonistas seletivos para os diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  torna difícil o entendimento de suas ações nos processos de dor crônica (Matthews e Dickenson, 2001; Sekizawa et al., 2000; Dogrul et al, 2003).



**Figura 2:** Representação esquemática dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos. + significa estimula e – significa inibe. Adaptado a partir de Hill, 2001.

### 2.1.2 Processamento central da dor

Os mediadores químicos liberados após diferentes estímulos fazem com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes ao SNC, para que este a processe e responda adequadamente em cada situação (Figura 3).

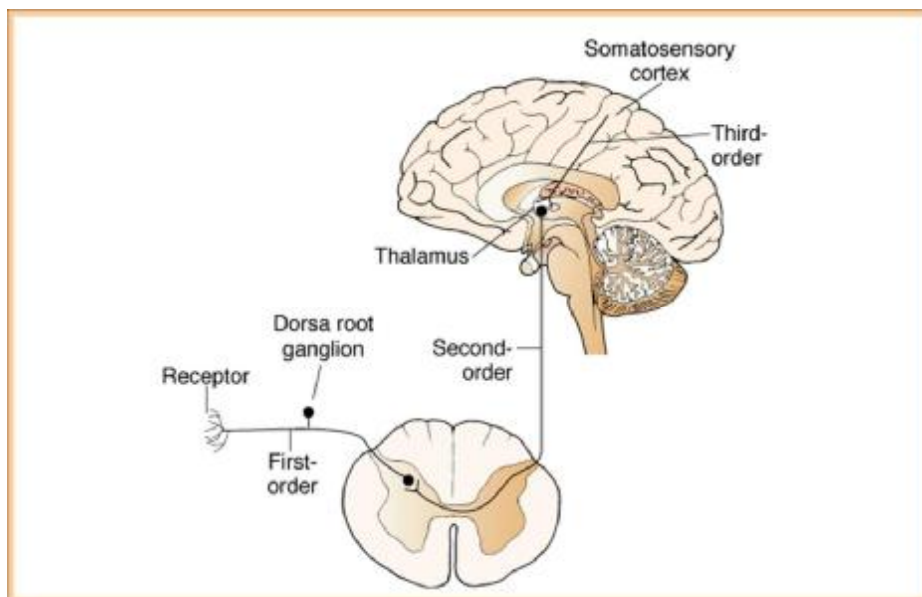


Figura 3 - Representação esquemática demonstrando a transmissão e o processamento da dor da periferia ao SNC. First order: neurônio de primeira ordem; dorsal root ganglion: gânglio da raiz dorsal; second order: neurônio de segunda ordem; third order: neurônio de terceira ordem; thalamus: tálamo. Adaptado de Hill, 2001.

Inicialmente, os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários na medula espinhal, mais precisamente no corno dorsal, área primária de recebimento da maioria das informações somato-sensoriais (Coggeshall e Carlton, 1997). O corno dorsal da medula (Figura 4) é uma estrutura dividida em lâminas com base em sua citoarquitetura, sendo que cada lâmina se caracteriza por receber tipos diferentes de informações. As fibras aferentes primárias C e A $\delta$  têm suas terminações principalmente nas lâminas superficiais, mas também em lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinhal, onde liberam diversos neurotransmissores. Vários estudos mostram que as maiorias das fibras associadas com a transmissão nociceptiva terminam na lâmina I (zona marginal) e II (substância gelatinosa). Alguns estímulos somato-sensoriais provenientes da pele, músculos ou vísceras também são capazes de chegar à medula espinhal através do corno ventral (Besson e Chaouch, 1987).



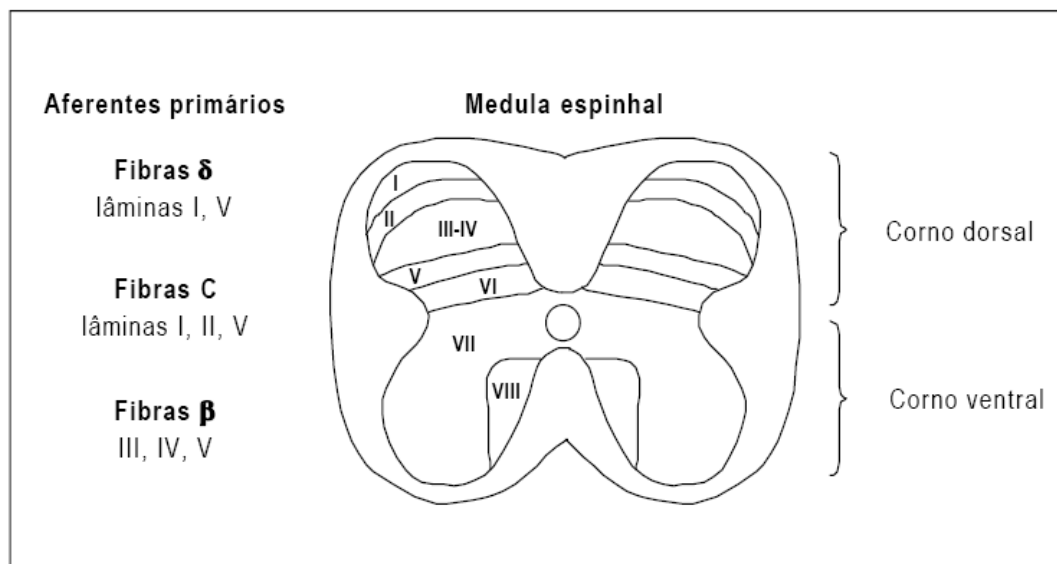


Figura 4 – Diagrama esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal que recebem as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes. Adaptado a partir de Craig e Dostrovsky et al., 1999.

A partir da integração dos impulsos no corno dorsal, as vias nociceptivas aferentes dão origem a diferentes modelos de projeção nas estruturas corticais e supra-corticais. Neste estágio, os componentes sensoriais; discriminativos e afetivos, bem como os componentes cognitivos, são atribuídos ao impulso nociceptivo (Almeida et al., 2004).

Os diferentes feixes ascendentes que se formam devido à interação de neurônios de primeira ordem com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal dão origem a diversas vias ascendentes que podem ser classificadas em dois grupos: monossinápticas e polissinápticas (Millan, 1999; Almeida et al., 2004)

As vias de projeção monossinápticas projetam-se diretamente a estruturas cerebrais superiores e incluem os feixes: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquio-amigdalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espinohipotalâmico e neoespinotalâmico. O outro sistema, o polissináptico, apresenta uma estação de retransmissão a neurônios de segunda ordem que conduzem a informação nociceptiva aos centros superiores cerebrais e consistem nos feixes paleoespinotalâmico, espinocervical e coluna dorsal polissináptica (Millan, 1999, 2002; Almeida et al., 2004).

Muitas destas vias ascendentes fazem conexões com neurônios de terceira ordem no tálamo, que projetam seus axônios pela cápsula interna do córtex somatosensorial até o giro pós-central, onde a localização do estímulo nociceptivo é realizada; e giro anterior do cíngulo, relacionado à interpretação emocional da dor (Russo e Brode, 1998).

O organismo também possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor, pois 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 do passado e processada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada que é enviada para a medula espinhal através dos neurônios descendentes (Millan, 1999). Portanto, além de desempenhar importante papel na interpretação da informação nociceptiva ascendente, as estruturas supra-espinhais também estão fortemente envolvidas na modulação de circuitos descendentes que controlam a dor.

Desde a descoberta, por Wall (1967), de que os neurônios presentes nas lâminas (I, II e IV-VI) da medula espinhal estão sujeitos à modulação por estruturas supra-espinhais, o entendimento do circuito modulatório descendente da dor tem progredido drasticamente (Fields e Basbaum, 1999). A modulação e integração descendente da informação nociceptiva é processada nesse circuito pelas vias descendentes que se originam no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM) (Millan, 1999, 2002; Vanegas e Schaible, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras primárias aferentes, bem como em neurônios do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (Millan, 1999, 2002).

Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (Liebeskind et al., 1973; Urban e Nagy, 1997; Porreca et al., 2002). Por exemplo, na medula rostroventromedial estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (*on*) e as células “desliga” (*off*), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva (Fields e Basbaum, 1999). Postulou-se que as células “desliga” (*off*), exercem inibição da nocicepção nas vias descendentes uma vez que quando sua atividade está aumentada há uma inibição da transmissão nociceptiva.

Por outro lado, as propriedades das células “liga” (*on*) tornam-se incompatíveis com o conceito de sistema inibitório descendente, uma vez que parecem facilitar os mecanismos nociceptivos no corno dorsal quando estão ativas (Fields e Basbaum, 1999). De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve excitar as células-*off* e inibir as células-*on* na medula rostroventromedial (Fields et al., 1991). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, cada forma de lesão induz um tipo diferente de neuroplasticidade sobre o sistema, fenômeno que acontece, principalmente, em casos de dores persistentes.

Além da modulação descendente da informação nociceptiva envolver uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, os sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos nesta conexão, como por exemplo, os sistemas opióide, neuropeptídérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (Millan, 2002).

É importante mencionar que tanto na dor clínica quanto na dor induzida em modelos experimentais, não há, a princípio, um mediador ou uma via (ascendente ou descendente) dominante que contribua para a condução e perpetuação do estímulo nociceptivo. Dependendo do local, tipo e duração do estímulo e levando-se em consideração componentes afetivos e emocionais, ocorre à ativação de múltiplos canais sensoriais, que irão convergir e interagir com estruturas supra-espinhais, promovendo a sensação global de dor (Millan, 1999).

### 2.1.3 Mediadores químicos

A ação direta ou indireta de mediadores químicos, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina, dopamina e óxido nítrico), peptídeos (cininas, taquicininas, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), proteínas (citocinas, fator de crescimento do nervo), entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (Besson, 1999; Fürst, 1999; Millan, 1999; Calixto et al., 2000). Dentre os vários mediadores químicos da dor e/ou

inflamação, o glutamato, o óxido nítrico, a substância P, as cininas, as prostaglandinas, desempenham papéis importantes.

### 2.1.3.1 Glutamato

O glutamato e seus receptores compreendem o sistema de neurotransmissores excitatórios mais importante do sistema nervoso de mamíferos, onde participam de diversos eventos fisiológicos e patológicos, como aprendizado, memória, epilepsia, depressão, lesão cerebral causada por isquemia e outros (Coderre, 1993; Dingledine e McBain, 1994; Lipton e Rosenberg, 1994; Thomas, 1995; Dickenson, 1997; Hudspith, 1997). As funções do glutamato foram descritas inicialmente no sistema nervoso central, mas este neurotransmissor também exerce um papel importante na sinalização de tecidos como ossos, pele, astrócitos, coração, pâncreas e medula óssea (Skerry e Genever, 2001).

As ações desencadeadas pelo glutamato são mediadas através da ativação de receptores localizados nas membranas neuronais pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais (Meldrum et al., 1999). Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados de acordo com estudos farmacológicos e moleculares, em duas classes distintas, os receptores glutamatérgicos “ionotrópicos” ( $i$ GluRs) e os receptores glutamatérgicos “metabotrópicos” ( $m$ GluRs). Os  $i$ GluRs são acoplados a canais iônicos, podendo ainda ser subdivididos em três tipos distintos conforme sua permeabilidade a íons e ativação por ligantes, são eles: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropionato (AMPA) e cainato. Os receptores NMDA medeiam a transmissão excitatória lenta e são permeáveis principalmente ao  $Ca^{2+}$ , com menor condutância ao  $Na^+$ . Os receptores AMPA medeiam a neurotransmissão excitatória rápida e são canais com grande permeabilidade a cátions monovalentes ( $Na^+$  e  $K^+$ ) e com baixa permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  (Dichter e Wilcox, 1997). Os receptores cainato diferem da maioria dos receptores AMPA por serem relativamente permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$  (Ozawa et al., 1998).

Por outro lado, os  $m$ GluRs dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com a sua homologia: o grupo I ( $m$ GluR 1 e 5), grupo II ( $m$ GluR 2 e 3) e grupo III ( $m$ GluR 4, 6, 7 e 8). Os  $m$ GluRs pertencem a uma família de receptores

que estão acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), promovendo então a modulação de efetores intracelulares que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução de sinal (Osawa et al., 1998; Fundytus, 2001).

O glutamato, após ser liberado para o espaço extracelular e realizar sua ação via seus receptores, é removido da fenda sináptica principalmente por sistemas de transporte que são dependentes de sódio, localizados nos neurônios e principalmente nas células gliais (Danbolt, 2001). A atividade de alguns receptores de glutamato, em especial o receptor ionotrópico do tipo NMDA e alguns mecanismos de captação de neurotransmissores são regulados pelo seu estado redox (Goslan e Ben-Ari, 1995; Trotti et al., 1997; Tang e Aizenman, 1993). Um aumento nas concentrações de glutamato na fenda sináptica leva à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que incluem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes e maior influxo de cálcio e sódio (Lafon-Cazal et al., 1993; Reynolds e Hastings, 1995; Singh et al., 2003; Lipton e Rosenberg, 1994). Alguns estudos têm demonstrado que o tratamento com compostos de selênio restabelece a atividade de enzimas antioxidantes, reduz a peroxidação de lipídeos e previne a morte celular em modelos de toxicidade pelo glutamato e seus agonistas (Porciúncula et al., 2001; Savaskan et al., 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que os receptores glutamatérgicos estão diretamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta nociceptiva (Aanonsen e Wilcox, 1987, 1990; Mao et al., 1992; Coggeshall e Carlton, 1997). Neste sentido, dados da literatura demonstram que substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos, tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos, apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos (Lutfy et al., 1997; Neugebauer, 2002; Wiech et al., 2004).

Além disso, os antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA inibem tanto a produção como a manutenção do estado de hipersensibilidade dolorosa em diversos modelos pré-clínicos de dores crônicas, e têm mostrado eficácia em pacientes com estas patologias. Contudo, o mais potente e eficaz agente disponível na clínica, a quetamina, produz efeitos colaterais importantes, tais

como sedação, disforia e alucinação, que limitam sua utilização (Martin e Eisenach, 2001).

### 2.1.3.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um importante mensageiro biológico que está envolvido na transmissão sináptica, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (Ferreira et al., 1999). O NO é sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina através de três isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS). As enzimas nNOS e eNOS são constitutivas, enquanto a iNOS é induzida por vários estímulos. Contrariamente as NOS constitutivas, que dependem do  $\text{Ca}^{2+}$ , a atividade da iNOS não depende do influxo de cálcio na célula e a sua expressão está aumentada por estímulos inflamatórios (Meller e Gebhar, 1993).

Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC), tida como seu receptor fisiológico, que por sua vez converte a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases (Moore et al., 1991).

Por ser uma molécula gasosa pequena, muito reativa e que passa através de membranas celulares facilmente, o NO é considerado um “transmissor retrógrado”, isto é, a ativação de algum receptor (NMDA, por exemplo) no neurônio pós-sináptico induz a produção de NO, que se difunde rapidamente e entra no neurônio pré-sináptico, para modular sua atividade. O NO pode ser liberado após a estimulação direta de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, contribuindo para sua excitabilidade após o estímulo nociceptivo, além de sensibilizar nociceptores (Moore et al., 1991; Haley et al., 1992; Babbedge et al., 1993; Meller e Gebhart, 1993; Yamamoto et al., 1993). Tem sido sugerido o uso de inibidores da síntese de NO em casos nos qual a dor ou hiperalgesia são mediadas por receptores NMDA, já que o NO é um dos principais mediadores produzidos após o aumento da concentração de cálcio intracelular causada pela ativação desse receptor (Malmberg e Yaksh, 1993; Rivot et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que o ebselen e o disseleno de difenila, compostos orgânicos de selênio, inibem a iNOS, isoforma da óxido nítrico

sintase que se torna ativa nos processos inflamatórios (Hattori et al., 1994; Ghisleni et al., 2003; Porciúncula et al., 2003).

Uma característica marcante do NO é sua dualidade, ou seja, sua capacidade de apresentar efeitos antagônicos em estados patológicos diversos, como por exemplo, na dor. De fato, quando se utiliza ativadores ou inibidores da cascata L-arginina/NO/GMPc, o NO pode agir como um agente pronociceptivo ou antinociceptivo tanto em sítios periféricos quanto em supra-espinhais (Aley et al., 1998). Por exemplo, tanto inibidores da NOS e/ou da guanilato ciclase solúvel (GCs) quanto substrato da NOS exibem atividade antinociceptiva (Duarte et al., 1990; Moore et al., 1991; Kawabata et al., 1993; Abacioglu et al., 2000; Souza e Prado, 2001). Contribuindo para a controvérsia sobre a dualidade de efeitos do NO, diversos estudos demonstram que a administração de um inibidor da NOS e da guanilato ciclase reduzem o efeito antinociceptivo causado por várias drogas, como por exemplo, a dipirona, o sildenafil, o diclofenaco, a nimesulida, o meloxicam, a morfina, entre outras, possivelmente esse efeito ocorre por ativar a via do NO/GMPc (Lorenzetti e Ferreira, 1996; Granados-Soto et al., 1997; Islas-Cadena et al., 1999; Aguirre-Bañuelos e Granado-Soto, 2000; Jain et al., 2001; Ortiz et al., 2003; 2006). Por outro lado, existem drogas com atividade antinociceptiva, provavelmente por inibir a síntese de NO, pois quando é administrado em animais um precursor do NO, a atividade dessas drogas é revertida (Meotti et al., 2006; Santos et al., 2005).

Uma explicação para esses efeitos contraditórios do NO podem ser devido a diferenças dos modelos de dor experimental utilizados, pois diferentes tipos de neurônios sensoriais primários podem estar envolvidos, como também dos níveis de NO teciduais, o conteúdo intracelular de GMPc, as diferenças de drogas e dosagens utilizadas e também ao uso de diferentes espécies animais.

### 2.1.3.3 Substância P

A substância P (SP) é um neuropeptídeo amplamente distribuído no organismo, onde atua como neurotransmissor e neuromodulador. Recentemente, receptores da SP (principalmente o subtipo NK<sub>1</sub>) foram observados não somente em neurônios e células imunes como também em outras células periféricas, incluindo

células ósseas (Goto et al., 2007). Porém, é no sistema nervoso central e periférico que a SP atua como neurotransmissor das mensagens nociceptivas.

Este neuropeptídeo é sintetizado pelos neurônios do gânglio da raiz dorsal e liberado nas fibras do tipo C em resposta a agressões ou a estimulações intensas dos nervos periféricos (Basbaum e Jessell, 2000; Goto et al., 2007). Ela atua sobre os receptores de neurocininas (NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>), preferencialmente no subtipo de receptor NK<sub>1</sub>, o qual se localiza preferencialmente na lamina I do corno dorsal da medula espinhal em uma variedade de espécies, incluindo humanos, macacos e ratos (Regoli et al., 1994; Campos e Calixto, 2000; Harrison e Geppetti, 2001).

Dados da literatura demonstram a interação que existe entre a SP e o glutamato na medula espinhal, de fato, os receptores NMDA pré-sinápticos localizados nas terminações de fibras C facilitam e prolongam a transmissão da mensagem nociceptiva, através da liberação de SP e glutamato (Malcangio et al., 1998; Benoliel et al., 2000; Sakurada et al., 2002). Além disso, é importante salientar que antagonistas seletivos de receptores NK1 e NMDA bloqueiam a hiperalgesia e alodínia, sugerindo que estes receptores contribuem para a alteração da transmissão nociceptiva (McLeod et al., 1999).

#### 2.1.3.4 Cininas

As cininas, bradicinina (BK) e calidina (CAL) são peptídeos formados em resposta a estímulos fisiológicos ou durante o processo inflamatório, a partir de precursores chamados cininogênios, através da ação de enzimas denominadas de cininogenases. O grupo mais importante de cininogenases é representado pelas calicreínas, um grupo de proteases encontradas no sangue (calicreína plasmática) e na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual) (Murray et al., 1990; Beaubien et al., 1991; Okuse, 2007). A ação da calicreína plasmática sobre o cininogênio resulta na formação do nonapeptídeo bradicinina. A calicreína tecidual atuando sobre os cininogênios origina o decapeptídeo calidina (Lys-bradicinina) (Okuse, 2007).

A ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> estimula a fosfolipase C e conseqüente formação de IP<sub>3</sub> e diacilglicerol (DAG). O aumento dos níveis de IP<sub>3</sub> resulta em aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Lee et al., 1993), enquanto que a



formação de DAG resulta na ativação de isoformas específicas de PKC (Tippmer et al., 1994). Por sua vez, a PKC, também promove o aumento da concentração de cálcio intracelular e ativa a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) citosólica, enzima fundamental para a produção de derivados do ácido araquidônico. A estimulação dos receptores para cininas pode, ainda, ativar a adenilato ciclase, modular canais de potássio sensíveis ao cálcio, estimular o transporte de íons cloreto e promover a formação de óxido nítrico (Burch e Axelrod, 1987; Bhoola et al., 1992; Hall, 1992; Okuse, 2007).

Atuando nos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, acoplados à proteína G, as cininas estão implicadas em várias condições fisiopatológicas, especialmente nos processos inflamatórios e na indução da nocicepção (Calixto et al., 2000; Marceau e Regoli, 2004; Okuse, 2007, Campos et al., 2007). Os receptores B<sub>1</sub> são considerados relevantes no estágio crônico da inflamação e na hiperalgesia (Campos et al., 1998; Calixto et al., 2000) e estão envolvidos nas respostas nociceptivas de origem inflamatória e neurogênica (Corrêa e Calixto, 1993; Pesquero et al., 2000; Ferreira et al., 2001; Marceau e Regoli, 2004).

Durante os últimos anos, muitos estudos surgiram na literatura na tentativa de encontrar antagonistas dos receptores da bradicinina, especialmente antagonista B<sub>1</sub>, para uma possível aplicação terapêutica no tratamento da dor (Wirth et al., 1991; Sufka e Roach, 1996; Campos et al., 1999; Bock and Longmore, 2000; Fox et al., 2005; Mattos et al., 2006; Campos et al., 2007).

#### 2.1.3.5 Prostaglandinas

As prostaglandinas, produzidas tanto por células não neuronais quanto por neurônios aferentes primários, são substâncias geradas a partir do ácido araquidônico liberado dos fosfolipídeos de membrana pela ação da enzima PLA<sub>2</sub>. Uma vez formado, o ácido araquidônico é convertido nos prostanóides: prostaglandinas e tromboxanos pela via da ciclooxigenase, leucotrienos e ácidos hidroxieicosatetraenóicos pela via da lipoxigenase ou epóxidos lipídicos e dióis através da via da epoxigenase (Cashman, 1996; Appleton, 1997; Zeilhofer, 2007).

Os produtos das ciclooxigenases, principalmente as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), provocam comportamento nocifensivo e alodinia quando administradas espinhalmente quando geradas após o estímulo nociceptivo têm a

propriedade de aumentar a sensibilidade dos nociceptores à dor causada por substâncias como histamina ou bradicinina (Ferreira, 1972; Minami et al., 1994; Zeilhofer, 2007).

Dentre as prostaglandinas, a PGE<sub>2</sub> se destaca por ser uma das principais prostaglandinas pró-nociceptivas liberadas periféricamente (Vanegas e Schaible, 2001). A PGE<sub>2</sub> exerce suas ações através da interação com receptores de membrana específicos, que podem ser divididos em quatro subtipos: EP1, EP2, EP3 e EP4 (Coleman et al., 1994). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G e ativam a adenilato ciclase ou a fosfolipase C (PLC) (Machwate et al., 2001; Zeilhofer, 2007).

Foi demonstrado que a PGE<sub>2</sub> é liberada espinhalmente nos primeiros minutos após a injeção intraplantar de formalina em ratos, o que mostra que, além de sensibilizar neurônios, este prostanóide também pode participar do estabelecimento da dor aguda (Malmberg e Yaksh, 1995). Nesse mesmo estudo, foi também elucidado que, ao mesmo tempo em que a PGE<sub>2</sub> é liberada (0 - 10 min após a injeção de formalina), ocorre à liberação de diversos aminoácidos excitatórios como glutamato, aspartato, taurina e glicina e um indicador da produção de NO (citrulina) que sabidamente estão envolvidos com a transmissão da nocicepção periférica (Malmberg e Yaksh, 1995).

## **2.2 Dor inflamatória**

Na maioria das situações, o processo inflamatório pode estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção (Levine e Reichling, 1999).

A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo multimediado. Ela é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microorganismos ou outros agentes irritantes e potencializar o reparo tecidual (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Os sinais clínicos da inflamação, eritema, calor, inchaço e dor, foram descritos no início da era clássica pelos gregos e romanos (Fantone e Ward, 1990). O quinto sinal da inflamação, lesão aguda dos tecidos, com perda da função dos órgãos foi mencionado mais tarde por Virchow, no século XIX (Rocha e Silva, 1978).

Neste contexto, a inflamação pode ser classificada como aguda e crônica, de acordo com o tempo de duração e características patológicas (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A inflamação aguda apresenta curta duração (horas a meses), durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o NO e prostaglandinas, como a PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e a PGF<sub>2α</sub> promovem principalmente a vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Outro sinal precoce da inflamação aguda é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas (plasma) dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A vasodilatação e formação de exsudato são geralmente acompanhadas da marginação, adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Aderem e Smith, 2004). A inflamação aguda pode ser finalizada com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (Gilroy et al., 2004; Aderem e Smith, 2004). A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses. Durante a inflamação crônica ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (Gilroy et al., 2004; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Tanto a liberação de mediadores primários quanto a síntese de novos mediadores são responsáveis pela ativação e/ou sensibilização de nociceptores adjacentes à lesão. A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que estes disparem com estímulos de menor

intensidade (Khasar et al., 1999; Coutaux et al., 2005; Holden e Pizzi, 2003). Desta forma, estes nociceptores são ativados por estímulos que em condições normais seriam inócuos (Finnerup e Jensen, 2004; Millan, 1999). Isto é bem evidenciado através de modelos experimentais, onde a injeção de um agente pró-inflamatório como o ACF sensibiliza os locais injetados, tornando estes animais responsivos a estímulos térmicos e mecânicos inócuos a um animal não injetado (Larson et al., 1986). De fato, a dor é uma característica peculiar da inflamação e a dor inflamatória é o maior problema clínico em vários distúrbios inflamatórios, como, por exemplo, a artrite reumatóide (MacMahon et al., 2005).

Portanto, nestas situações encontra-se um quadro de estimulação constante dos nociceptores, a qual é responsável por alterações plásticas, não somente no tecido nervoso periférico, mas também em nível central; isto é muito comum em casos de neuropatia periférica, onde a lesão nervosa gera um processo inflamatório crônico, com alterações plásticas no SNP e SNC (MacFarlane et al., 1997; Ji e Woolf, 2001; Woolf e Salter, 2000; Coderre et al., 1993; Ji e Strichartz, 2004). 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, podendo desta forma, aumentar a susceptibilidade de instalação de um quadro de dor inflamatória crônica (Woolf e Mannion, 1999; Mendell e Sahenk, 2003).

Nestas condições, a inflamação perde sua característica de proteção ao organismo e torna-se uma patologia. A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido ao seu envolvimento em doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doença neurodegenerativas, cardiovasculares e reumáticas (Kamiya et al., 2003; MacMahon et al., 2005; Garcia, 2005).

### **2.3 Dor neuropática**

A dor neuropática foi definida em 1994 pela Associação internacional para o do Estudo da Dor como a “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso”.

A etiologia da dor neuropática é heterogênea e pode ser ocasionada a um insulto primário ao sistema nervoso periférico ou central (Zimmermann, 2001).

As neuropatias originam-se quando ocorre uma lesão nos nervos ou nas demais estruturas que transmitem a sensação dolorosa e podem resultar de trauma mecânico, lesão nervosa (amputação ou compressão), efeitos tóxicos de drogas, doenças como diabetes ou síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) (Mendell e Sahenk, 2003).

A lesão de nervos periféricos é frequentemente acompanhada de inflamação local transitória, a qual contribui para o início da sensação de dor. Neste sentido, assim como na dor inflamatória, na dor neuropática estão envolvidos múltiplos mediadores inflamatórios (Ji e Strichartz, 2004). Corroborando com isso, estudos mostram que a extensão da hiperalgesia está diretamente relacionada com a extensão da resposta inflamatória ao sítio da lesão do nervo (Clatworthy et al., 1995). Além disso, drogas antiinflamatórias aliviam a hiperalgesia em modelos animais de injúria do nervo (Clatworthy et al., 1995; Bennett et al., 2000).

Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não são inteiramente compreendidos. No entanto, MacFarlane e colaboradores (1997) sugerem que o desenvolvimento de dor crônica após lesão de nervo ocorra através de alterações na medula espinhal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e, eventualmente, mudança no fenótipo. Estas alterações ocorrem principalmente devido a uma estimulação excessiva dos nociceptores, uma vez que estes estão com limiar de ativação mais baixo (hipersensibilidade) (Coutaux et al., 2005).

Na dor neuropática, assim como acontece no processo inflamatório, a ação dos mediadores sobre seus receptores, tanto em nervos periféricos quanto centrais, inicia uma cascata de sinalização que culmina na manutenção do potencial de ação. Por ser um evento crônico, a principal característica desta patologia são mudanças plásticas causadas por alterações na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores, mediadores de sinalização extracelular, entre outros (Woolf e Mannion, 1999; Xiao et al., 2002; Ji e Strichartz, 2004; Quintão et al., 2006).

Assim, os mecanismos patofisiológicos da dor neuropática refletem, em grande parte, aqueles ocorridos na inflamação, embora, alguns autores relatem que a lesão de nervo produz, em neurônios aferentes primários, alterações neuroquímicas ligeiramente distintas daquelas produzidas na inflamação (Woolf e Mannion, 1999; Yajima et al., 2003).

## 2.4 Selênio

### 2.4.1 Características químicas

O elemento selênio foi descoberto em 1817, pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Esse elemento químico é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica, que pode se apresentar sob quatro estados de oxidação: selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ). O Se compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre (S). Esta similaridade permite que o Se substitua o S, promovendo interações Se-S nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e S constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980). Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de S pelo átomo de Se (Klayman e Günther, 1973).

### 2.4.2 Biodisponibilidade do selênio

Nos mamíferos, o selênio parece ser rapidamente absorvido no duodeno, seguido pelo jejuno e íleo. Além do trato gastrintestinal, o selênio pode ser absorvido por tecidos cutâneos e inalação. Estas duas últimas vias de absorção de selênio estão relacionadas com a exposição e intoxicação ocupacional por compostos de selênio (Whanger et al., 1976).

Após a absorção, os maiores níveis de selênio estão localizados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unha e esmalte de dentes (Martin e Gerlack, 1972). Em animais intoxicados cronicamente, o selênio é depositado principalmente nos rins e fígado, seguido pelo pâncreas, baço e pulmões (Wilber, 1980). A primeira evidência de que os compostos de selênio são metabolizados em animais foi determinada após um longo período de tratamento com selenito de sódio. Os animais apresentavam odor gátrico característico, que posteriormente demonstrou ter sido causado pelo seleneto de dimetila (Klayman e Gunther, 1973). Esse composto pode ser resultado da detoxicação metabólica de muitos compostos de selênio, a qual envolve uma série de metilações dependentes da S-adenosilmetionina (Hoffman e McConnell, 1986).

O selênio pode ser eliminado por três vias excretoras: urina, fezes e ar expelido. Por ser excretado na urina essa pode ser usada como indicadora em casos de intoxicações ou de exposição a altos níveis do elemento (Valentine et al., 1978). Recentemente, foi demonstrado que dentro dos níveis normais de selênio, ou seja, não tóxicos, a principal forma encontrada na urina é como seleno-açúcar, entretanto, nos caso de doses tóxicas de selênio, o marcador biológico encontrado na urina é o trimetilselenônio (Suzuki et al., 2006). A excreção de selênio pelo ar expirado é realizada basicamente pelo composto volátil seleneto de dimetila e tem sido detectado na respiração de indivíduos expostos acidentalmente a níveis altos desse elemento (Mozier et al, 1988).

#### 2.4.3 Atividade biológica

O interesse em relação ao selênio tem crescido nos últimos anos, devido à descoberta do selênio como um elemento traço essencial (Schwartz e Foltz, 1957) cuja concentração pode ocasionar deficiência ou toxicidade. De fato, quando a ingestão diária excede a capacidade corporal de eliminação, algum tipo de intoxicação e/ou patologia pode surgir.

No ano de 1930, o selênio foi reconhecido como uma substância tóxica quando cavalos do oeste da China que se alimentaram de plantas com grande potencial de acumular este elemento apresentaram sintomas de envenenamento, como perda de cascos, pêlos e anemia (Spallholz, 1993). As patologias mais comuns associadas à toxicidade do selênio são: a doença alcalina (*alkali disease*), uma doença de caráter crônico, e o falso cambalear (*blind staggers*), uma doença de caráter agudo que compromete o SNC (Martin e Gerlack, 1972). O homem é suscetível a intoxicação por selênio, principalmente pelo amplo uso na indústria, particularmente na síntese de compostos, uma vez que este elemento constitui um importante intermediário em síntese orgânica (Wilber, 1980). Como não existe um tratamento adequado para as intoxicações de selênio (selenoses), pode-se utilizar compostos que reduzam a sua toxicidade, tais como o ácido ascórbico (Svirbely, 1938), o arsênio (capaz de aumentar a excreção biliar); a metionina (administrada

com a vitamina E, as quais protegem o tecido hepático de necroses causadas por selenoses crônicas) (Okamoto e Günther, 1972; Wilber, 1980).

Por outro lado, a importância do selênio como elemento traço essencial na dieta foi reconhecida após a descoberta da doença de Keshan, uma cardiopatia infantil com alta incidência em algumas regiões da China onde o solo é extremamente pobre em selênio (Ge e Yang, 1993).

Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000). Outras patologias associadas à deficiência de selênio, encontradas em humanos são: problemas musculares, alterações digestivas, doenças cardiovasculares e alterações reumáticas (Neve et al., 1987; Ortuño et al., 1996).

O selênio também exerce influência em patologias associadas aos transtornos de humor, uma vez que a carência de selênio parece levar a um estado de humor mais deprimido (Hawkes e Hornbostel, 1996) e o aumento no consumo deste elemento estabiliza o humor e diminui o estado depressivo e outros sintomas negativos do humor como ansiedade, confusão e hostilidade (Benton e Cook, 1991, Finley e Penland, 1998). Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. Para humanos, a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50 - 200 µg, podendo ser encontrado nos seguintes alimentos: castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont et al., 2006; Reilly, 1996).

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como antioxidante. Além disso, o Se está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutatona peroxidase (Flohé et al., 1973), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990), sendo que a atividade redox do Se tem fundamental importância para o sítio catalítico dessas enzimas.

Portanto, a partir da descoberta do papel essencial do selênio nos sítio ativo de enzimas e do conceito de que moléculas contendo selênio podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) que os clássicos antioxidantes, (Arteel e Sies,



2001) se intensificou a síntese e o interesse em compostos orgânicos contendo selênio.

## 2.5 Compostos orgânicos de selênio

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm sido alvos de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas de suas propriedades farmacológicas e por apresentar menor toxicidade em relação às espécies inorgânicas (Parnham e Graf, 1991; Kanda et al., 1999; Nogueira et al., 2004). Dentre os compostos orgânicos de selênio estudados no nosso grupo de pesquisa se destacam o ebselen e o disseleneto de difenila.

### 2.5.1 Ebselen

O ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) (Figura 5) é um composto orgânico de selênio que apresenta propriedade antioxidante similar à selenoenzima glutathione peroxidase (Parnham e Graf, 1991). Esse composto possui baixa toxicidade, pois ele não libera selênio de sua molécula (Parnham e Graff, 1987). De fato, Wendel e colaboradores (1984) demonstraram que em animais deficientes de selênio, a atividade da enzima glutathione peroxidase não aumentava pela suplementação com ebselen.

O ebselen apresentou importantes efeitos como antioxidante na redução da peroxidação lipídica e pelas reações com grupos sulfidrílicos (-SH) em diferentes tecidos (Sies e Arteel, 2000; Rossato et al., 2002; Davis et al., 2004; Nowak et al., 2006). Além disso, esse composto apresenta efeitos protetores em diversos modelos de isquemia tais como: cerebral, cardíaca, hepática e em um modelo in vitro, pela privação de glicose e oxigênio (Osaki et al., 1997; Tan et al., 1997; Takasago et al., 1997; Kondoh et al., 1999; Imai et al., 2001; Porciúncula et al., 2003). Neste contexto, o ebselen causou neuroproteção em pacientes que sofreram acidente vascular cerebral isquêmico em um ensaio clínico de fase III (Yamaguchi et al., 1998), e, além disso, quando administrado em humanos, diminuiu os déficits

neurológicos provocados por hemorragia de aneurisma subaracnóide (Saito et al., 1998). Devido aos diversos indicativos clínicos de redução de danos cerebrais após aneurisma, este composto aponta como um promissor agente neuroprotetor (Saito et al., 1998; Porciúncula et al., 2001; 2003). Em modelos de primatas, o Ebselen reduz os sintomas da doença de Parkinson induzidos pelo íon 1- metil - 4- fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>) (Moussaoui et al., 2000).

Além dessas propriedades, o ebselen possui atividades antiinflamatórias, as quais podem ser devido a sua capacidade de inibir algumas enzimas envolvidas no processo inflamatório e por reduzir a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Parnhan e Graf, 1987; 1991; Haddad et al., 2002; Walther et al., 1999). O ebselen também inibe a formação de leucotrienos sintetizados pela via da lipoxigenase 5, e em granulócitos inibe a atividade da PKC e da NADPH oxidase (Schewe et al., 1995; Cotgreave et al., 1989; Mugeshe et al., 2001). Além disso, o ebselen inibe in vivo e in vitro a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), isoforma da óxido nítrico sintase que se torna ativa nos processos inflamatórios (Hattori et al., 1994; Porciúncula et al., 2003).

Recentemente, estudos têm investigado a habilidade deste composto na supressão de enzimas envolvidas no processo apoptótico e vias de sinalização, colaborando para a elucidação de outros mecanismos que possam estar envolvidos nas propriedades farmacológicas do ebselen (Yoshizumi et al., 2002, 2004; Xu et al., 2006). Em estudos in vitro com tecidos e células do SNC o ebselen apresentou efeito protetor contra a excitotoxicidade provocada pelo glutamato, bem como demonstrou alterar alguns parâmetros do sistema glutamatérgico (Porciúncula et al., 2001, 2004; Nogueira et al., 2002). Além disso, Herin et al (2001) sugeriram que o efeito neuroprotetor do ebselen em injúrias provocadas pelo glutamato e seus agonistas, pode ser em parte devido a sua direta interação com o sítio modulatório redox do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). No entanto, este composto quando administrado por infusão direta na região CA1 do hipocampo prejudica a performance dos animais na tarefa de esquiva inibitória, sugerindo que o ebselen pode prejudicar os processos de aquisição, consolidação e evocação da memória (Porciúncula et al., 2002).

A toxicidade do ebselen envolve principalmente, a oxidação de grupos-SH de moléculas biologicamente ativas (Young et al., 1981). De fato, diversos trabalhos demonstraram que esse composto, inibe a atividade de enzimas sulfidrílicas,

incluindo, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Borges et al., 2005b),  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (Nogueira et al., 2003c) e a 5-lipoxigenase (Schewe, 1995).

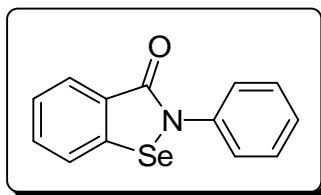


Figura 6 - Estrutura química do ebselen

### 2.5.2 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (figura 6) é um composto orgânico que contém Se, portanto um organocalcogênio. Nos últimos anos, na tentativa de buscar novos fármacos que poderão representar uma nova alternativa terapêutica no combate e/ou controle de patologias, o nosso grupo de pesquisa tem investigado amplamente as propriedades farmacológicas e /ou toxicológicas do disseleneto de difenila.

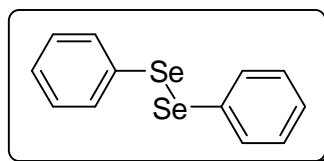


Figura 6 - Estrutura química do disseleneto de difenila

#### 2.5.2.1 Propriedades farmacológicas

O composto disseleneto de difenila é conhecido por ser mais ativo como mimético da selenoenzima glutathione peroxidase (Meotti et al., 2004) que o ebselen. De acordo com isso, em diversos trabalhos o disseleneto de difenila tem-se apresentado como um bom agente antioxidante na redução da peroxidação de lipídeos provocada por diversos agentes e em diferentes tecidos (Meotti et al., 2004; Santos et al., 2004; 2005; Posser et al., 2006)

Dados da literatura também indicam que esse composto orgânico de selênio apresenta várias propriedades farmacológicas, tais como anti-úlceras (Savegnago et

al., 2006), neuroprotetor (Ghislene et al., 2003), hepatoprotetor (Borges et al., 2005; 2006), anti-hiperglicemiante (Barbosa et al., 2006) e também protege contra a discinesia orofacial induzida por reserpina e haloperidol (Burger et al., 2004, 2006). Além disso, Rosa et al (2006) demonstraram que o disseleneto de difenila administrado em camundongos induz facilitação da formação da memória, sem causar neurotoxicidade comportamental.

Estudos recentes do nosso grupo relataram que o disseleneto de difenila quando administrado pela via subcutânea apresenta ação antinociceptiva e antiinflamatória mais potente que ebselen, em camundongos e ratos (Nogueira et al., 2003b; Zasso et al., 2005). Sendo que, o possível mecanismo envolvido na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila parece envolver a via serotoninérgica, mas não os sistemas opióide, dopaminérgico, colinérgico muscarínico e o adrenérgico (Zasso et al., 2005). Semelhante ao ebselen, o disseleneto de difenila também inibe a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), isoforma da óxido nítrico sintase que se torna ativa nos processos inflamatórios (Ghisleni et al., 2003).

É importante salientar que nas doses nas quais o disseleneto de difenila apresenta atividade farmacológica ele não apresenta toxicidade.

#### 2.5.2.2 Propriedades toxicológicas

Além das propriedades farmacológicas, alguns estudos, entretanto, descrevem que o disseleneto de difenila induz efeitos toxicológicos.

Estudo do nosso laboratório demonstrou que a toxicidade do disseleneto de difenila depende tanto da via de administração quanto da espécie animal avaliada (ratos ou camundongos). De fato, quando o disseleneto de difenila foi administrado em diferentes doses pela via subcutânea (s.c.) em ratos e camundongos, esse composto não causou nenhum sinal de neurotoxicidade e morte dentro de um período de observação de 72 horas, isso pode ser atribuído a uma baixa taxa de absorção e perda de metabolização do composto. A  $DL_{50}$  obtida tanto para ratos quanto para camundongos foi  $> 500 \mu\text{mol/Kg}$  (156 mg/Kg). Por outro lado, quando o disseleneto de difenila foi administrado em diferentes doses pela via intraperitoneal (i.p.) em ratos e camundongos, os parâmetros toxicológicos foram alterados. Por exemplo, a administração i.p. desse composto em camundongos alterou os níveis de

creatinina e induziu morte e convulsão, o que poder ser devido à rápida absorção e ao metabolismo de primeira passagem no fígado, a  $DL_{50}$  obtida foi de 210  $\mu\text{mol/kg}$  (65 mg/kg). Entretanto, em ratos a administração intraperitoneal do disseleneto de difenila não alterou os parâmetros hepáticos (aspartato amino transferase - AST; e alanina amino transferase - ALT) e renais (uréia e creatinina) e a  $DL_{50}$  obtida foi de 1200  $\mu\text{mol/kg}$  (374 mg/kg). A partir desses dados, pode-se sugerir que o disseleneto de difenila é mais tóxico em camundongos que em ratos (Nogueira et al., 2003a).

Neste contexto, é importante mencionar que o disseleneto de difenila é conhecido por ser menos tóxico que o ebselen. Isso é comprovado, quando ratos são tratados com esses dois compostos pela via intraperitoneal, o valor da  $DL_{50}$  para o disseleneto de difenila é cerca de três vezes maior que o ebselen (valores da  $DL_{50}$  = 1200 e 400  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente) (Nogueira et al., 2003a; Meotti et al., 2003). Além disso, o ebselen apresenta potência letal semelhante em ratos e camundongos quando administrado pela via i.p. (valores da  $DL_{50}$ : 400 e 340  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente). Por outro lado, quando o ebselen é administrado pela via subcutânea, ele não induz efeitos tóxicos, tanto para camundongos como para ratos, semelhante como acontece para o disseleneto de difenila.

Alguns estudos demonstraram que após a exposição crônica ou aguda a altas doses do disseleneto de difenila em camundongos, este composto ocasiona a deposição de selênio no fígado, rim e cérebro, demonstrando o potencial tóxico desse composto (Jacques-Silva et al., 2001; Maciel et al., 2003). Esses resultados suportam a idéia que o disseleneto de difenila atravessa a barreira cérebro-sangue sendo o cérebro um dos órgãos alvo de toxicidade desse composto. De acordo com isso, Brito et al. (2006) demonstraram que a administração do disseleneto de difenila antes do tratamento com pentilenotetrazol (PTZ; um antagonista  $GABA_A$ ) causa neurotoxicidade em camundongos, o qual foi verificado pelo aumento na suscetibilidade para a convulsão química induzida pelo PTZ e pelo aumento da incidência de morte nestes animais. Além disso, outros estudos relatam que a administração do disseleneto de difenila causa danos cerebrais tanto in vitro quanto in vivo em ratos e camundongos (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001)

O composto disseleneto de difenila demonstrou ainda afetar alguns parâmetros do sistema glutamatérgico em cérebro de ratos in vivo e in vitro (Nogueira et al., 2001) e em ensaios in vitro com plaquetas humanas (Borges et al., 2004). Outros estudos relatam que o disseleneto de difenila inibe a atividade de

enzimas sulfidrílicas, incluindo a  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (Nogueira et al., 2003c; Maciel et al., 2000) e a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Borges et al., 2005b), provavelmente devido à interação com os grupos -SH da enzima.

Conforme estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, o disseleneto de difenila também altera alguns parâmetros reprodutivos, como por exemplo: causa mal-formação óssea e outras anomalias em fetos de ratas tratadas com este composto (Favero et al., 2005); induz alterações no desenvolvimento e em parâmetros comportamentais nos filhotes de ratas expostas a esse composto no período lactacional (Favero et al., 2006); e administrações repetidas desse composto em ratas grávidas no período da organogênese induzem um retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal (Weis et al., 2007). Por outro lado, mais recentemente, Favero et al (2007) demonstraram que ratos adultos machos expostos por um período sub-crônico ao disseleneto de difenila não apresentaram alterações nos fetos de ratas não expostas a esse composto.

Assim, devido às inúmeras propriedades descritas para o disseleneto de difenila, o nosso objetivo geral foi avaliar o potencial antinociceptivo e biológico do disseleneto de difenila administrado pela via oral em camundongos, bem como estender o nosso estudo sobre esse composto orgânico de selênio, uma vez que, existe uma intensa busca por fármacos que poderão representar uma nova alternativa terapêutica no combate e/ou controle de patologias.

### 3- OBJETIVOS

Considerando que:

- É de fundamental importância estender o nosso estudo sobre o disseleneto de difenila, uma vez que, este apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, sendo que estas foram obtidas a partir da sua administração pela via s.c. ou i.p.;
- O disseleneto de difenila apresenta atividade antinociceptiva e antiinflamatória quando administrado pela via s.c. em ratos e camundongos.

Os objetivos do presente estudo foram:

- (1) Investigar a toxicidade aguda induzida pelo disseleneto de difenila quando administrado pela via oral em camundongos com o propósito de oferecer segurança no uso desse composto, bem como estender o nosso estudo sobre esse composto orgânico de selênio. Para avaliar a toxicidade foram utilizados dois parâmetros de estudo: curva dose-resposta, onde se observou o índice de letalidade dos animais que receberam o composto e também foram realizadas dosagens bioquímicas, a fim de avaliar a funcionalidade hepática e renal dos camundongos.
- (2) Avaliar a ação do disseleneto de difenila, administrado pela via oral, no controle da nocicepção aguda e crônica através de estudos farmacológicos "in vivo", utilizando diferentes protocolos experimentais de dor em camundongos, assim como avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade antinociceptiva. As ações do disseleneto de difenila sobre a nocicepção aguda foram investigadas utilizando modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos. Por sua vez, os efeitos do disseleneto de difenila sobre a nocicepção crônica foram avaliados através da administração intraplantar de ACF (modelo de nocicepção inflamatória crônica) e ligadura parcial do nervo ciático (modelo de nocicepção neuropática) em camundongos.

## 4- ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos.

Os **Artigos 1 e 2** estão dispostos da mesma forma que foram publicados na edição das revistas científicas. O **Artigo 3** está submetido e o **Artigo 4** recentemente foi aceito e ainda não se encontra no formato da revista.



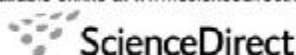
## **4.1 Propriedades antinociceptivas do diseleneto de difenila: Evidências de mecanismos de ação**

### 4.1.1 Artigo 1

#### **Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action**

Lucielli Savegnago, Larissa G. Pinto, Cristiano R. Jesse, Diego Alves,  
Joao B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni

*European Journal of Pharmacology*

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Pharmacology 555 (2007) 129–138

[www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

## Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action

Lucieli Savegnago, Larissa G. Pinto, Cristiano R. Jesse, Diego Alves,  
João B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni\*

*Laboratório de Sintese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organoseleniados, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil*

Received 15 March 2006; received in revised form 9 October 2006; accepted 9 October 2006  
Available online 17 October 2006

### Abstract

The present study examined the acute toxicity and antinociceptive effects of diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, given orally (p.o.), in chemical and thermal models of pain in mice. Diphenyl diselenide (7.8–312 mg/kg, p.o.) did not cause mortality. This compound did not change plasma AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) activities as well as urea and creatinine levels in mice after 72 h of exposure. Diphenyl diselenide (1–100 mg/kg, p.o.) inhibited acetic acid-, capsaicin-, glutamate-, bradykinin(BK)- and phorbol myristate acetate (PMA)-induced pain. Diphenyl diselenide also reduced glutamate-, bradykinin-, PMA-induced paw oedema formation. Moreover, diphenyl diselenide caused a significant increase in tail-immersion response latency time. Diphenyl diselenide co-injected subplantarily in association with glutamate-induced a significant reduction of the licking and in the paw oedema formation induced by glutamate. The local pre-treatment of mice with L-arginine, intraplantarly, restored antinociception caused by diphenyl diselenide or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) when analyzed against glutamate-induced nociception. The pre-treatment of mice with dithiothreitol (DTT) intraplantarly restored local antinociception caused by diphenyl diselenide or 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) when analyzed against glutamate-induced nociception. These results indicate that diphenyl diselenide produced antinociception in several models of pain through mechanisms that involve an interaction with not only nitergic system but also via interaction with redox modulatory sites of glutamate receptors.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Diphenyl diselenide; Selenium; Antinociception; Glutamate; Nitric oxide system

### 1. Introduction

Selenium is largely known to develop its biological activity as an integral part of functional selenoproteins, including glutathione peroxidase and thioredoxin reductase, which catalyze reactions essential to the protection of cellular components against oxidative and free radical damage (Rotruck et al., 1973; Burk and Lane, 1983; Bock et al., 1991).

The interest in organoselenium biochemistry and pharmacology has increased in the last two decades due to a variety of organoselenium compounds that possess biological activity (Nogueira et al., 2004). Accordingly, a number of novel

pharmaceutical agents which are selenium-based or which target specific aspects of selenium metabolism are under development (May, 1999; Nogueira et al., 2003; Meotti et al., 2004). In addition to their antioxidant property (Muller et al., 1984; Meotti et al., 2004), selenium compounds were found to have neuro-protective (Porciúncula et al., 2001; Rossato et al., 2002), antihypertensive, anticancer, antiviral, immunosuppressive, antimicrobial and antiinflammatory properties (Sies, 1993; Schewe, 1995; May, 1999; Nogueira et al., 2003; Zasso et al., 2005).

Ebselen (an organoselenium compound) is a classical antioxidant and well known as the most important glutathione peroxidase mimetic agent (Muller et al., 1984; Daiber et al., 2000). Furthermore to its peroxidase-like activity, ebselen has antiinflammatory activity in different models of inflammation (Pamham and Graf, 1987; Schewe, 1995), which may be related at least in part to its capability to scavenge peroxynitrite, a

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 32208146; fax: +55 55 32208978.  
E-mail address: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br) (G. Zeni).

potent inflammatory mediator (Sies and Arceel, 2000). The mechanism(s) underlying the antiinflammatory activity of ebselen is still not completely understood but is linked to inhibition of NADPH-oxidase, protein kinase C, nitric oxide synthase and lipoxygenases most likely by interacting with critical thiol/disulfide groups in these enzymes (Cotgrave et al., 1989; Walther et al., 1999; Mugesh et al., 2001).

Recently, our group has reported that diphenyl diselenide, a simple diaryl diselenide, is active as a glutathione peroxidase mimic and is a safety drug when administered acutely to mice at doses that have antiinflammatory and antinociceptive activities (Nogueira et al., 2005; Meotti et al., 2004). Moreover, data from our laboratory have shown that diphenyl diselenide injected subcutaneously elicits significant and dose-related antinociception when assessed against chemical and thermal behavioural tests. Moreover, our research group demonstrated that the mechanism underlying the antinociception action of diphenyl diselenide involves the serotonergic pathway (Zasso et al., 2005). Interestingly, the antinociceptive and antiinflammatory potency of diphenyl diselenide was higher than that of ebselen (Nogueira et al., 2003, 2004).

Therefore, due to the need for more effective analgesic or antiinflammatory compounds with low side-effects, many studies have been appearing in the literature involving the synthesis of new compounds which can provide alternatives to current therapeutic agents.

Based on the considerations above, the aims of the present study were: (a) to evaluate the acute toxicity induced by diphenyl diselenide in mice using oral route of administration with the purpose of offering safety in the use of this compound, (b) to investigate the antinociceptive activity induced by diphenyl diselenide in chemical and thermal models of pain in mice and (c) to examine some possible mechanisms involved in the local antinociceptive activity produced by diphenyl diselenide in the glutamate model of nociception.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Drugs

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> was synthesized and characterized in our laboratory by the method previously described (Paulmier, 1986). Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. Diphenyl diselenide was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide, 10%) for the experiments in which the local effect of (PhSe)<sub>2</sub> was analyzed. The dose of DMSO (10%) did not cause detectable effect. For the other experiments, the vehicle used was canola oil.

### 2.2. Animals

The behavioural experiments were conducted using Swiss mice of both sexes (25–35 g) maintained at 22–25 °C with free

access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle. In all experiments of nociceptive behavioral, the animals (male and female mice were homogeneously distributed among groups) were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experiments of lethal-dose-response and toxicity of (PhSe)<sub>2</sub> were carried out only with male mice.

The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmernann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

### 2.3. General toxicity and lethal-dose

To investigate the potential toxicity of diphenyl diselenide, mice received a single oral dose of diphenyl diselenide (7.8–312 mg/kg) or vehicle (10 ml/kg, canola oil). After the compound administration, animals were observed up to 72 h to determine the lethal potential of diphenyl diselenide. The body weight gain of animals was also recorded as a sign of general toxicity.

After 72 h of exposure, mice were slightly anesthetized for blood collection by heart puncture in tubes containing heparin. Plasma was obtained by centrifugation at 2000 ×g for 10 min (hemolyzed plasma was discarded) and used for biochemical assays.

The following biochemical parameters were measured: plasma enzymes AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) used as the biochemical markers for the early acute hepatic damage and determined by the colorimetric method of Reitman and Frankel (1957). Renal function was analyzed by determining plasma urea (Mackay and Mackay, 1927) and creatinine levels (Jaffe, 1886).

### 2.4. Acetic acid-induced abdominal constriction

The abdominal constrictions were induced by intraperitoneal injection of acetic acid (1.6%, i.p.) and carried out according to the procedure described previously (Nogueira et al., 2003). After acetic acid injection, mice were individually placed in separate boxes and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min. Mice were pre-treated with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg) by oral route (p.o.), 30 min before the irritant injection. Control animals received a similar volume of vehicle (10 ml/kg, canola oil).

To assess the time-course of the antinociceptive effect of diphenyl diselenide, mice were pre-treated with diphenyl diselenide (40 mg/kg, p.o.; this dose used was based on the mean of ID<sub>50</sub> for acetic acid test) 0.5–6 h before intraperitoneal injection of acetic acid.

### 2.5. Capsaicin-induced nociception

The method used for capsaicin-induced licking was similar to that described by Sakurada et al. (1993). After an adaptation

period, mice were pre-treated with vehicle (canola oil, p.o., 10 ml/kg) or diphenyl diselenide (1–100 mg/kg, p.o.) 30 min before the intraplantar (i.pl.) administration of capsaicin (1.6 µg/paw, 20 µl) in the ventral surface of the right hindpaw. The amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer for 5 min following capsaicin injection and was considered as indicative of nociception.

#### 2.6. Tail-immersion-induced nociception

The tail-immersion test was carried out as described by Janssen et al. (1963). The lower 3.5 cm portion of the tail was marked and animals were then injected with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg, p.o.) or vehicle (canola oil, p.o., 10 ml/kg), 30 min before the test. The test was determined by immersing the lower 3.5 cm of the tail into a cup freshly filled with water from a large constant-temperature (55 °C) bath until the typical tail withdrawal response was observed. A 7-s cut-off was imposed in this measure.

Changes in tail-blick latency,  $\Delta t$  (s), was calculated for each animal according to the formula:  $\Delta t$  (s) = post-drug latency – pre-drug latency (Pinardi et al., 2003).

In the experiments designed to evaluate the possible participation of the opioid system in the antinociceptive effect of diphenyl diselenide, mice were pre-treated with naloxone (1 mg/kg, s.c.) or saline (0.9% NaCl) 15 min before administration of vehicle (canola oil), morphine (2.5 mg/kg, s.c.) or diphenyl diselenide (10–100 mg/kg, p.o.). The tail-immersion test was carried out 30 min after morphine and diphenyl diselenide administration.

#### 2.7. Glutamate-induced nociception and paw oedema

The procedure used was similar to that described previously (Beirith et al., 2002). Mice were treated with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg, p.o.) or canola oil (10 ml/kg, p.o.) 30 min before glutamate injection. A volume of 20 µl of glutamate solution (10 µmol/paw prepared in saline) was injected intraplantarly (i.pl.) in the ventral surface of the right hindpaw. The mice were observed individually for 15 min following glutamate injection and the amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception.

To determine if the antinociceptive effect was due to a local action, animals received 20 µl of glutamate solution (10 µmol/paw) co-administered with diphenyl diselenide (20–200 nmol/paw) intraplantarly in the ventral surface of the right hindpaw. After injection the drugs, mice were observed for 15 min and the amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception. The doses of diphenyl diselenide were selected on the basis of previous studies carried out in our laboratory (Zasso et al., 2005).

In order to assess whether the antinociceptive activity produced by diphenyl diselenide (given orally or intraplantarly) in glutamate-induced nociception was associated with the development of oedema formation. The paw oedema was

measured by comparing the difference between the weight of the glutamate-treated paw and the weight of the contralateral paw (non-treated paw). For this purpose, animals were sacrificed 15 min after glutamate injection by cervical dislocation and both paws were cut at the ankle joint and weighed on an analytical balance.

#### 2.8. Analysis of the mechanisms involved in diphenyl diselenide action on the glutamate test

To address some mechanisms involved in local effect caused by diphenyl diselenide on glutamate-induced nociception and paw oedema, distinct groups of animals were treated with different classes of drugs, all of them locally co-administered with glutamate (10 µmol/paw).

To explore the possible contribution of nitric oxide-arginine pathway in the antinociception caused by diphenyl diselenide in the glutamate test, mice were pre-treated with L-arginine (60 µg/paw, i.pl., a nitric oxide precursor) and after 10 min received diphenyl diselenide (200 nmol/paw, i.pl.), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 µg/paw, i.pl., an inhibitor of nitric oxide synthase-NOS) or vehicle (20 µl/paw, i.pl.), all drugs were administered in association with glutamate (10 µmol/paw, i.pl.), except L-arginine. After injection of the drugs, the mice were observed for 15 min and the amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception.

To examine the involvement of redox modulatory site of glutamate receptors in nociceptive transmission, sulphhydryl reducing agents such as dithiothreitol (DTT) and oxidizing agents, such as 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were tested. For this purpose, mice were pre-treated with dithiothreitol (0.3 µg/paw, i.pl.) and after 10 min they received diphenyl diselenide (200 nmol/paw, i.pl.), 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (0.4 µg/paw, i.pl.) or vehicle (20 µl/paw, i.pl.), all drugs were administered in association with glutamate (10 µmol/paw, i.pl.), except dithiothreitol. After injection of drugs, the mice were observed for 15 min and the amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception.

At the end of each experiment, we measured the paw oedema as described by Beirith et al. (2002).

#### 2.9. Bradykinin-induced nociception and paw oedema

The experiment was performed according to the method described by Ferreira et al. (2003). Mice were treated with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg, p.o.) or with canola oil (10 ml/kg, p.o.) 30 min before bradykinin injection (10 nmol/paw, 20 µl) in the ventral surface of the right hindpaw. Animals were observed individually for 10 min following bradykinin injection and the amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception. The paw oedema also was measured at the end of experiment. All procedures were realized as described by Cunha et al. (2001).

### 2.10. Phorbol myristate acetate (PMA)-induced nociception and paw oedema

The procedure used was similar to that described previously (Siebel et al., 2004). Mice were treated with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg) by p.o. route, 30 min before i.p. injection of PMA (protein kinase C (PKC) activator, 0.03 µg/paw, 20 µl). After 15 min the i.p. injection of PMA, animals were observed for a further 30 min. The time spent licking the injected paw during this period was recorded with a chronometer and considered as indicative of pain.

We also measured the paw oedema 45 min after PMA injection. The procedure was realized as described previously (Siebel et al., 2004).

### 3. Statistical analysis

The results are presented as means ± S.E.M. or means ± S.D. The statistically significant difference between groups was calculated by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test when appropriate. Probability values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered as statistically significant. The  $ID_{50}$  values (i.e. the dose of diphenyl diselenide which reduced the pain response by 50% in relation to control group values) and  $LD_{50}$  values (i.e. the dose of diphenyl diselenide that caused mortality in 50% of mice) were determined by linear regression from individual experiments using "GraphPad Software" (GraphPad software, San Diego, CA) and are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Maximal inhibition values were calculated at the more effective dose used.

### 4. Results

#### 4.1. General toxicity and lethal-dose determination

Calculated  $LD_{50}$  for diphenyl diselenide administered by oral route was estimated to be  $>312$  mg/kg (or 1 mmol/kg) with an observation period of 72 h. No mortality was observed after the mice exposure to all doses tested. However, a significant

Table 1  
Effect of diphenyl diselenide, administered orally, on the body weight gain in mice

Groups (mg/kg)	Body weight gain (g)
Control	0.75 ± 0.68
7.8	-1.90 ± 0.62*
15.6	-1.93 ± 1.75*
23.4	-3.25 ± 1.25*
31.2	-2.83 ± 1.16*
46.8	-4.61 ± 1.86*
62.4	-2.41 ± 1.43*
109.2	-4.41 ± 1.08*
156	-3.08 ± 1.73*
234	-3.51 ± 2.63*
312	-5.20 ± 1.92*

Data are reported as mean ± S.D. of 6–12 animals.

\* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

Table 2  
Effect of diphenyl diselenide administered orally on biochemical parameters in mice

Groups (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urea (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Control	173.2 ± 40.6	32.1 ± 14.4	42.8 ± 11.8	0.20 ± 0.09
7.8	150.3 ± 53.6	29.3 ± 10.5	38.5 ± 5.2	0.28 ± 0.16
15.6	187.8 ± 52.0	36.5 ± 16.4	41.1 ± 6.9	0.16 ± 0.05
23.4	230.3 ± 66.0	35.5 ± 11.6	35.0 ± 7.5	0.18 ± 0.07
31.2	152.3 ± 18.5	27.0 ± 10.4	36.0 ± 7.6	0.20 ± 0.06
46.8	117.0 ± 19.0	28.0 ± 13.0	38.3 ± 14.0	0.16 ± 0.05
62.4	140.5 ± 34.3	18.8 ± 4.3	32.1 ± 7.1	0.18 ± 0.04
109.2	218.3 ± 83	24.3 ± 13	32.3 ± 8.6	0.20 ± 0.06
156	178 ± 44	25.3 ± 16.4	31.5 ± 6.3	0.15 ± 0.05
234	181.8 ± 43.4	25.5 ± 12.3	31.6 ± 5.0	0.15 ± 0.05
312	244 ± 56.8	32.1 ± 26.3	35.3 ± 25.2	0.18 ± 0.04

Data are reported as mean ± S.D. of six animals.

reduction in the body weight gain was observed after diphenyl diselenide exposure, at all doses, when compared to the control group (Table 1).

Moreover, oral administration of diphenyl diselenide in mice, at all doses tested, did not change plasma AST and ALT activities, as well as, urea and creatinine levels when compared to the control group (Table 2).

#### 4.2. Acetic acid-induced abdominal constriction

A time-course analysis of the antinociceptive profile of diphenyl diselenide was accomplished. The antinociceptive effect of diphenyl diselenide reached its peak 30 min after p.o. administration and remained significant up to 2 h after the administrations (results not show). Thus, the time point (30 min) of the maximum effect of diphenyl diselenide was chosen for all further studies.

The results of antinociceptive effect of diphenyl diselenide on acetic acid-induced abdominal constriction response in mice are presented in Fig. 1. It can be seen that diphenyl diselenide, given (30 min earlier) by oral route, produced an inhibition of the acetic acid-induced abdominal constriction in mice with the

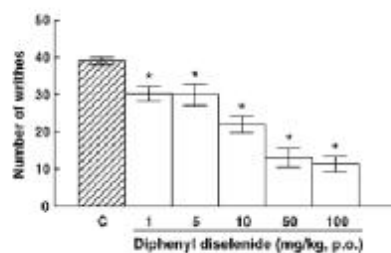


Fig. 1. Effect of diphenyl diselenide administered orally against acetic acid-induced writhing movements in mice. Animals were pre-treated orally with diphenyl diselenide at various doses (from 1 to 100 mg/kg) for 30 min prior to the acetic acid (1.6%, i.p.). Each column represents the mean with S.E.M. for 6–12 mice in each group. Control (C) indicates the animal injected with canola oil. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Duncan's test) \*  $P < 0.05$ .

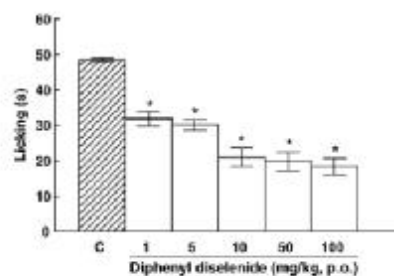


Fig. 2. Effect of diphenyl diselenide administered orally against capsaicin-induced licking in mice. Animals were pre-treated orally diphenyl diselenide with all various doses (from 1 to 100 mg/kg) for 30 min prior to capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw). Each column represents the mean with S.E.M. for 8–12 mice in each group. Control (C) indicates the animal injected with canola oil. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Duncan's test) \*  $P < 0.05$ .

mean  $ID_{50}$  value (and their respective 95% confidence limits) of 39.72 (34.81–45.32) mg/kg and inhibition of 71  $\pm$  5%.

#### 4.3. Capsaicin-induced nociception

Diphenyl diselenide, at all doses, caused an inhibition of the capsaicin-induced licking response ( $P < 0.05$ , Duncan's test) (Fig. 2), with a mean  $ID_{50}$  value of 22.5 (13.3–38.1) mg/kg and a maximal inhibition value of 67  $\pm$  4%.

#### 4.4. Tail-immersion-induced nociception

In the tail-immersion test the one-way ANOVA revealed that diphenyl diselenide administered, p.o., at the doses of 10–100 mg/kg caused a significant increase in the reaction time to thermal stimuli as compared to the control group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

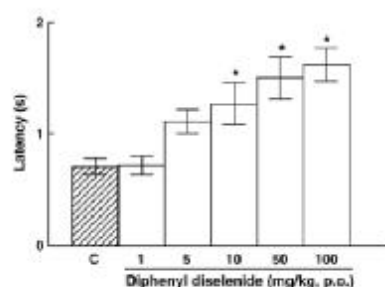


Fig. 3. Effect of diphenyl diselenide administered orally on the tail-immersion test in mice. Animals were pre-treated orally with diphenyl diselenide at various doses (from 1 to 100 mg/kg) for 30 min prior to tail-immersion at 55 °C. Each column represents the mean with S.E.M. for 6–10 mice in each group. Control (C) indicates the animal injected with canola oil. Asterisks denote the significance levels, when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Duncan's test) \*  $P < 0.05$ .

Table 3  
Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and oedema induced by glutamate in mice

Experimental groups	Glutamate	
	Licking (s)	Paw oedema (mg)
Control	122.6 $\pm$ 4.39	72.0 $\pm$ 2.34
(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg) i		
5	49.6 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	62.6 $\pm$ 2.45
10	37.0 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	59.1 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>
25	20.7 $\pm$ 4.75 <sup>a</sup>	60.5 $\pm$ 2.71 <sup>a</sup>
50	12.8 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>	56.0 $\pm$ 4.04 <sup>a</sup>
100	5.5 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	52.1 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>

Animals were pre-treated with diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, at various doses (from 1 to 100 mg/kg, p.o.) for 30 min prior to glutamate (10  $\mu$ mol/paw, i.pl., 20  $\mu$ l). Data represents the mean with S.E.M. for 6–10 mice in each group. Control values (C) indicate the animal injected with canola oil. <sup>a</sup> Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ), as determined by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

Pre-treatment with naloxone (1 mg/kg, s.c.), an antagonist of the opioid receptor, abolished the antinociceptive effect of morphine (positive control) at the dose of 2.5 mg/kg, s.c. The antinociceptive effect of diphenyl diselenide (10–100 mg/kg, p.o.) was not prevented by pre-treatment with naloxone (results not shown).

#### 4.5. Glutamate-induced nociception and paw oedema

The results presented in Table 3 show that diphenyl diselenide, given orally, caused a significant inhibition of the glutamate-induced nociception, with a mean  $ID_{50}$  value of 14.2 (8.8–22.2) mg/kg and inhibition 95  $\pm$  1%. Furthermore, one-way ANOVA revealed that the p.o. treatment of the animals with diphenyl diselenide (10–100 mg/kg) resulted in an inhibition of the paw oedema formation induced by i.pl. injection of glutamate (Table 3). The maximal inhibition observed was of 28  $\pm$  3%.

When co-injected subplantarily in association with glutamate (10  $\mu$ mol/paw), diphenyl diselenide (200 nmol/paw) caused a significant reduction of the licking induced by glutamate. The maximal inhibition observed was 47  $\pm$  5% (results not shown). Diphenyl diselenide, at all doses tested, inhibited of the paw oedema formation induced by injection of glutamate. The maximal inhibition observed was 20  $\pm$  5% (results not shown).

#### 4.6. Analysis of the possible peripheral mechanisms involved in diphenyl diselenide action on the glutamate test

The result presented in Fig. 4A shows that the local pre-treatment of mice with the nitric oxide precursor, L-arginine (60  $\mu$ g/paw, i.pl.), intraplantarily injected 10 min earlier, restored the local antinociception caused by diphenyl diselenide (200 nmol/paw) or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10  $\mu$ g/paw), when analyzed against glutamate-induced nociception. The paw oedema induced by the injection of glutamate was reduced by diphenyl diselenide (200 nmol/paw) (Fig. 4B).

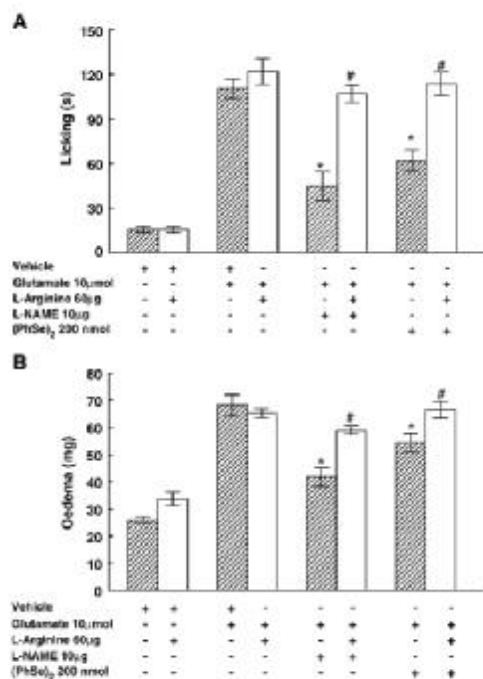


Fig. 4. Effect of pre-treatment of animals with L-arginine (60 µg/paw) on the antinociceptive profiles of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>; 200 nmol/paw) and N<sup>2</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10 µg/paw) against the glutamate (10 µmol/paw, 20 µl)-induced licking (A) and paw oedema (B) in mice. Each column represents the mean with S.E.M. for 6–10 mice in each group. \*  $P < 0.05$  when compared to the glutamate group plus vehicle (one-way ANOVA followed by Duncan's test). #  $P < 0.05$  comparing agonist (diphenyl diselenide or L-NAME) plus antagonist (L-arginine) plus glutamate versus agonist plus glutamate.

The participation of redox modulatory site of glutamate receptors in nociceptive transmission in glutamate-induced licking and paw oedema was confirmed by using dithiothreitol and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). The pre-treatment of mice with dithiothreitol, given 10 min earlier, restored the antinociception caused by diphenyl diselenide or 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) when analyzed against glutamate-induced nociception (Fig. 5). Conversely, the paw oedema was not altered by dithiothreitol (results not shown).

#### 4.7. Bradykinin-induced nociception and paw oedema

As can be seen in Table 4, diphenyl diselenide (25, 50 and 100 mg/kg, p.o.) significantly inhibited nociception induced by i.p.l. injection of bradykinin (10 nmol/paw). The maximal inhibition observed was 91±4% and the calculated mean ID<sub>50</sub> value for this effect was 34.66 (24.26–49.52) mg/kg.

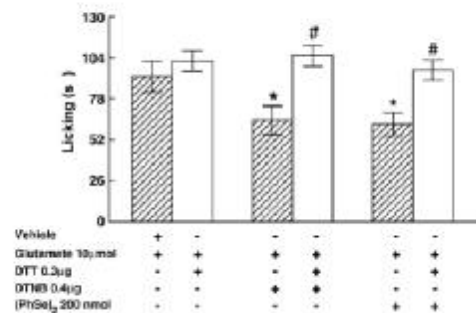


Fig. 5. Effect of pre-treatment of animals with dithiothreitol (DTT; 0.3 µg/paw) on the antinociceptive profiles of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>; 200 nmol/paw) and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; 0.4 µg/paw) against the glutamate (10 µmol/paw, 20 µl)-induced licking (A) and paw oedema (B) in mice. Each column represents the mean with S.E.M. for 6–12 mice in each group. \*  $P < 0.05$  when compared to the glutamate group plus vehicle (one-way ANOVA followed by Duncan's test). #  $P < 0.05$  comparing diphenyl diselenide or DTNB plus DTT plus glutamate versus glutamate plus diphenyl diselenide or DTNB.

Furthermore, diphenyl diselenide (100 mg/kg, p.o.) was significantly effective in inhibiting the mouse paw oedema induced by i.p.l. injection of bradykinin (percentage of inhibition of 24±4%)(Table 4).

#### 4.8. Phorbol myristate acetate (PMA)-induced nociception and paw oedema

As revealed in Table 5, oral treatment with diphenyl diselenide (1–100 mg/kg) significantly inhibited PMA-induced licking response. The maximal inhibition observed was 92±2% and the calculated mean ID<sub>50</sub> value for this effect was 31.09 (20.94–46.17) mg/kg. Oral treatment of the animals with diphenyl

Table 4  
Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and paw oedema induced by bradykinin in mice

Experimental groups	Bradykinin	
	Licking (s)	Paw oedema (mg)
Control	37.7±2.25	61.5±3.31
(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg) 1	34.0±6.31	60.0±2.88
5	28.0±5.22	58.5±5.33
10	27.0±6.04	57.2±5.35
25	10.7±4.81*	57.7±4.75
50	8.7±2.75*	59.7±4.32
100	3.4±1.34*	46.5±3.30*

Animals were pre-treated with diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, at various doses (from 1 to 100 mg/kg, p.o.) for 30 min prior to bradykinin (10 nmol/paw, i.p.l., 20 µl). The paw oedema was measured at the end of experiment. Data are reported as the mean with S.E.M. for 8–10 mice in each group. Control values (C) indicate the animal injected with canola oil. \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ), as determined by one-way ANOVA followed by Duncan's test.

Table 5  
Effect of diphenyl diselenide administered orally on the licking and paw oedema induced by PMA in mice

Experimental groups	PMA	
	Licking (s)	Paw oedema (mg)
Control	141.1±5.96	49.85±3.21
(PhSe) <sub>2</sub> (mg/kg) 1	129.7±8.45	42.44±3.27
10	41.7±4.92*	45.2±3.30
50	30.4±4.55*	42.44±1.10
100	11.5±2.50*	35.2±1.95*

Animals were pre-treated with diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, at various doses (from 1 to 100 mg/kg, p.o.) for 30 min prior to PMA (0.03 μg/paw, i.p., 20 μl). The paw oedema was measured 45 min after PMA injection. Data are reported as the mean with S.E.M. for 5–10 mice in each group. Control values (C) indicate the animal injected with camel oil. \* Significantly different from the control group (*P*<0.05), as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

diselenide resulted in an inhibition of 34+4% of the paw oedema formation induced by i.p. injection of PMA (Table 5).

## 5. Discussion

In the present study, we found that diphenyl diselenide administered orally produced minor toxicological effects and induced antinociception in various pain models in mice. The minor toxic potential of diphenyl diselenide, orally administered, was evidenced by the index of mortality. Although diphenyl diselenide did not provide evidences for renal or hepatic toxicity, the body weight gain in mice exposed to this compound was reduced, which might indicate systemic toxicity.

Previous report demonstrated that the toxicity induced by diphenyl diselenide depends on the route of administration as well as the species (rat or mice) (Nogueira et al., 2003). In fact, diphenyl diselenide administered by i.p. route was more toxic than by s.c. route in mice (LD<sub>50</sub>=62.4 and >156 mg/kg, respectively) (Nogueira et al., 2003). Here, we demonstrated that LD<sub>50</sub> for diphenyl diselenide administered orally was similar to that found by s.c. route. Accordingly, diphenyl diselenide administered by s.c. or p.o. route did not induce seizures or death in mice, which can be attributed to a slow rate of absorption and lack of metabolism of the compound. In contrast, this compound injected by i.p. route induced seizures and death in mice, which can be tentatively linked to a faster rate of absorption and to a first pass liver metabolism (Nogueira et al., 2003).

The results presented in this study revealed that diphenyl diselenide, orally administered, elicited an inhibition of the acetic acid-induced visceral nociceptive response in mice. Accordingly, this organoselenium compound reduced visceral pain induced by acetic acid when subcutaneously administered (Nogueira et al., 2003). The acetic acid-induced writhing reaction in mice, described as a model for visceral pain, has long been used as a screening tool for the assessment of antinociceptive or antiinflammatory property of new agents (Vinogor et al., 1979; Tjøsen and Hole, 1997).

One interesting finding in the present study was the observation that diphenyl diselenide orally injected caused a prolonged tail-flick latency, indicating an increase of nocicep-

tive threshold. The results obtained on tail-flick test confirmed that antinociception caused by diphenyl diselenide was not mediated by opioid mechanisms. These data are in accordance with previous data demonstrating that diphenyl diselenide subcutaneously administered caused dose-related increase in the latency for tail-flick response, similar to morphine (Nogueira et al., 2003). The tail-flick response is believed to be a spinally mediated reflex (Chapman et al., 1985). Moreover, Grumbach (1966) has shown that the effectiveness of antinociceptive agents in the tail-flick pain model is highly correlated with relief of human pain.

We have also shown, in the present study, that diphenyl diselenide produced significant antinociceptive effect on the capsaicin-induced neurogenic paw licking response. These results are consistent with our previous work, in which, diphenyl diselenide administered by subcutaneous route caused significant antinociception against capsaicin-induced licking (Nogueira et al., 2003). It has been shown that capsaicin, the pungent alkylic substance obtained from hot red chili peppers, is a valuable pharmacological tool for studying a subset of mammalian primary sensory C-fibers and Aδ afferent neurons including polymodal nociceptors and warm thermoceptors (Jancsó, 1992). In addition, it has been proposed that capsaicin-induced nociception is brought about by activation of the capsaicin receptor, also known as the vanilloid receptor (TRPV), termed TRPV subtype 1 (TRPV1), ligand-gated non-selective cation channel in primary sensory neurons (Caterina et al., 1997; Tomimaga et al., 1998; Szallasi and Blumberg, 1999). It has been widely documented that a capsaicin evokes the release of neuropeptides, excitatory amino acids (glutamate and aspartate), nitric oxide and pro-inflammatory mediators in the periphery and transmits nociceptive information to the spinal cord (Santos and Calixto, 1997; Sakurada et al., 1996, 2003).

Based on this evidence, we sought to determine whether or not diphenyl diselenide inhibits nociceptive response caused by intraplantar injection of glutamate into the mouse hindpaw. The results demonstrated that diphenyl diselenide, administered orally, produced a significant inhibition in the licking and the paw oedema caused by intraplantar injection of glutamate into the mouse hindpaw. It is interesting to mention that diphenyl diselenide was more potent to inhibit the nociception caused by glutamate (LD<sub>50</sub>=14.2 mg/kg) than that of caused by capsaicin, bradykinin, PMA and acetic acid (22.5, 34.6, 31.09 and 39.7 mg/kg, respectively) in mice. In fact, diphenyl diselenide was significantly more potent in blocking glutamate and capsaicin-induced nociception. Thus, the present results indicate that, at least in part, the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide could be due to an interaction with the capsaicin receptor and the glutamatergic system. In agreement, diphenyl diselenide modulates glutamatergic system *in vivo* and *in vitro* (Nogueira et al., 2001).

Glutamate plays an important role in nociception peripheral pain transmission and its intraplantar injection evokes thermal and mechanical hyperalgesia (Jackson et al., 1995; Carlton et al., 1995, 1998) as well as spontaneous lifting and licking behaviors in mice (Berrith et al., 2002). Glutamate excites and sensitizes nociceptors localized in the unmyelinated axons of rat



glabrous skin (Coggeshall and Carlton, 1998). It has been reported the presence of peripheral glutamate receptors on peripheral primary afferents in humans (Werncke et al., 1997).

In order to provide more evidence of glutamatergic system involvement in antinociception caused by diphenyl diselenide, we attempted to determine whether or not diphenyl diselenide co-injected locally with glutamate was capable of inhibiting nociceptive response caused by glutamate into the mouse hindpaw. In agreement with the findings obtained, we revealed, for the first time, that local administration of diphenyl diselenide induces antinociceptive and antioedematogenic effect when co-injected with glutamate. In agreement, Zasso et al. (2005) have reported that diphenyl diselenide produced a significant antinociceptive local effect on the late phase of the formalin test.

In the present study we also attempted to characterize further some of the mechanisms through which diphenyl diselenide exerts its local antinociceptive action in the glutamate model of nociception in mice.

To our knowledge, this is the first study indicating that L-arginine-nitric oxide pathway is, at least in part, involved in antinociception induced by diphenyl diselenide in the glutamate test. This conclusion derives from the fact that pre-treatment of animals with the substrate for NOS, L-arginine, significantly restored the antinociception caused by diphenyl diselenide and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; a known inhibitor of nitric oxide synthase). Considering the present data, we may speculate that local antinociceptive action produced by diphenyl diselenide is probably linked to an inhibition of NOS activity. Considerable evidence has accumulated suggesting a role for nitric oxide (NO) as a mediator of inflammation (Lyons, 1995). NO increases the synthesis/release of pro-inflammatory mediators such as cytokines and reactive oxygen species (Marcinkiewicz et al., 1995) and prostanooids (Sutetbin et al., 1995), resulting in promotion of inflammatory reaction. In this way, peripherally released NO contributes to the development of oedema and hyperalgesia in tissue injury and inflammation (Pears et al., 2006).

Another interesting finding in the present study is the demonstration that the pre-treatment of mice with dithiothreitol significantly restored the antinociception caused by diphenyl diselenide and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). Here, we reported that a reducing agent, dithiothreitol, causal nociception and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), the oxidizing agent, induced significant alleviation of the nociceptive response caused by injection of glutamate. Reynolds et al. (1990) found that reducing agents potentiate the NMDA receptor-induced increase in intracellular calcium, and this effect has been shown to be reversed by 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). NMDA receptor function is highly regulated by various modulating sites located on the receptor, including the redox modulatory (Rock and MacDonald, 1995; Laughlin et al., 1998). This result may indicate that the antinociceptive effect induced by diphenyl diselenide could be via the interaction with redox modulatory site of glutamate receptors, namely NMDA receptor.

Recently, it has been established that nociceptive response induced by glutamate is mediated by interaction with NMDA

receptors and the activation of the L-arginine-nitric oxide pathway (Beirith et al., 2002). Thus, these previous findings and the present results may suggest that the local antinociceptive action induced by diphenyl diselenide could be both an inhibition of NOS and a blockade of NMDA receptor.

The current study clearly indicates that the antinociceptive effect of diphenyl diselenide, given by p.o. route, is related to the release of bradykinin. In fact, diphenyl diselenide inhibited bradykinin-induced antinociception and paw oedema formation in mice. Bradykinin and its related kinins are vasoactive peptides which have an important role as inflammatory mediators and are normally released following tissue trauma or infection. Once released, bradykinin may induce pain by direct stimulation of the nociceptors (A $\delta$  and C-fibers) innervating many tissues. Furthermore, bradykinin can release most inflammatory and algogenic substances, namely products derived from arachidonic acid pathways, cytokines and nitric oxide (Dray and Perkins, 1997; Calixto et al., 2000, 2001).

In this study we have also demonstrated that diphenyl diselenide, orally injected, inhibited PMA-induced antinociception and paw oedema formation in mice. In fact, Souza et al. (2002) have reported that an intraplantar injection of PMA, a known protein kinase C activator, induces paw licking in mice. Accordingly, Tsuchiya et al. (2005) found that nociceptive response to PMA was associated with the formation of oedema and erythema in the injected paw which was observed in histological study.

In conclusion, our results indicate that diphenyl diselenide is a drug which induced minor toxic effects when administered by p.o. route in mice. Additionally, this compound may be a useful drug as an anti-inflammatory and an antinociceptive agent since diphenyl diselenide produced antinociception in different models of pain in mice. Besides, the antinociceptive action of this compound could be associated with its ability to inhibit NO production and through the interaction with the glutamatergic system.

#### Acknowledgements

The financial support by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPq are gratefully acknowledged. J.B.T.R., L.S., C.R.J., C.W.N. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

#### References

- Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the antinociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924, 219–228.
- Beek, A., Feederbrun, J.H., Leimbilder, W., Sawers, G., Veyrick, B., Zinnis, F., 1991. Selencystatin: the 21st antimicrob. *Mol. Microbiol.* 5, 515–520.
- Dare, R.F., Lane, J.M., 1983. Modification of chemical reactivity by selenium deficiency. *Foodm. Appl. Toxicol.* 1, 213–221.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1–5.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 14, 519–526.
- Caceres, M.J., Schumacher, M.A., Tomimaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

- Chapman, C.R., Casey, K.L., Dubner, R., Foley, K.M., Gracely, R.H., Reading, A.E., 1985. Pain measurement: an overview. *Pain* 22, 1–31.
- Carlton, S.M., Hargrett-GL, Coggeshall, R.E., 1995. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci. Lett.* 197, 25–28.
- Carlton, S.M., Chang, K., Ding, Z., Coggeshall, R.E., 1995. Glutamate receptors on postganglionic sympathetic axons. *Neuroscience* 83, 601–608.
- Coggeshall, R.E., Carlton, S.M., 1998. Ultrastructural analysis of NMDA AMPA and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J. Comp. Neurol.* 391, 78–88.
- Coggeshall, R.E., Dudley, S.K., Kass, G.E.N., Thompson, D., Moldau, B., 1989. Studies on the anti-inflammatory activity of Ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C? *Biochem. Pharmacol.* 38, 649–656.
- Cunha, P.M., Prode, L.S., Mendes, G.L., Malheiros, A., Filho, V.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sci.* 70, 159–169.
- Daloz, A., Zou, M., Bachschmid, M., Ulrich, V., 2000. Ebselen as a peroxyl radical scavenger *in vitro* and *ex vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 59, 153–160.
- Dry, A., Perkins, M.N., 1987. Kainic acid and pain. In: Farmer, S.G. (Ed.), *The Kainic System*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 157–172.
- Ferreira, J., Da Silva, G.L., Calixto, J.B., 2002. Contribution of vanilloid receptors to the event reception induced by D<sub>2</sub> kinase receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 100, 1–8.
- Gumbach, L., 1988. The prediction of analgesic activity in man by animal testing. In: Krieger, R.S., Dunbar, P.R. (Eds.), *Pain*. Little Brown and Co., Boston, pp. 163–182.
- Jackson, D.L., Goff, C.B., Richardson, J.D., Hargreaves, K.M., 1985. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 284, 321–325.
- Jaffe, M.Z., 1886. Methods determining sensitivities. *Physiol. Chem.* 10, 39–45.
- Jancsó, G., 1992. Pathological reactions of C-fibers primary sensory neurons to peripheral nerve injury. *Exp. Physiol.* 77, 405–431.
- Jessen, P.A.J., Niemegeers, C.J.F., Dony, J.H.G., 1963. The tail-flick effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Azonalintellforschung* 15, 502–507.
- Laughlin, T.M., Kite, K.F., Wilcox, G.L., 1998. Rats: manipulation of NMDA receptors *in vivo*: alteration of acute pain transmission and dynorphin-induced allodynia. *Pain* 80, 37–45.
- Lyons, C.R., 1995. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv. Immunol.* 59, 223–271.
- Maday, E.M., Maday, L.L., 1927. Methods determining area. *J. Clin. Invest.* 4, 295–296.
- Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Chaur, D., 1995. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 25, 947–951.
- May, S.W., 1999. Selenium-based drug design: rationale and therapeutic potential. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8, 1017–1030.
- Meoni, F.C., Stangherlin, B., Zani, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. *Eur. Res.* 94, 276–282.
- Mugesh, G., du Mont, W.W., Sies, H., 2001. Chemistry of biologically important organoselenium compounds. *Chem. Rev.* 101, 2125–2179.
- Muller, A., Cadenas, E., Graf, P., Sies, H., 1984. A novel biologically active selenium compound I. Glutathione peroxidase-like activity *in vitro* and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3233–3239.
- Nogueira, C.W., Reis, L.N., Berry, M.L., Soares, D.O., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res.* 905, 157–163.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zani, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory and antihypertensive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 26–31.
- Nogueira, C.W., Zani, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285.
- Parham, M.J., Graf, P., 1987. Selenium-sulfur compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3095–3102.
- Paulmier, C., 1985. Selenium functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1st. Pergamon Press, Oxford, pp. 25–51.
- Perna, A.T., Morosini, S., Pireolo, A., Pini, A., 2006. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: possible involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* 78, 718–723.
- Pirardi, G., Stenalia, P., Miranda, H.P., 2003. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 603–608.
- Ponferrada, L.O., Rocha, J.B.T., Boscó, C.R., Viedira, D., Soares, D.O., 2001. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 295, 213–216.
- Reizman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 59–63.
- Reynolds, J.J., Rush, E.A., Akerman, F., 1990. Reduction of NMDA receptors with dithiothreitol increases [H<sup>3</sup>]MK-801 binding and NMDA-induced Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Br. J. Pharmacol.* 101, 178–187.
- Rock, D.M., McDonald, R.L., 1992. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 463–482.
- Rossato, J.L., Ketter, L.A., Centurion, F.B., Silva, S.J.N., Ludke, D.S., Zani, G., Braga, A.L., Rubia, M.A., Rocha, J.B.T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 27, 297–303.
- Rotrock, J.T., Pope, A.L., Garber, H.E., Swanson, A.D., Hafeman, D.G., Houston, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 558–560.
- Sakurada, T., Katsunuma, K., Yogo, H., Tan-No, K., Sakurada, S., Kizasa, K., 1995. Antinociception induced by CP 95,145, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the formalin and capsaicin tests. *Neurosci. Lett.* 181, 142–145.
- Sakurada, T., Saggiya, A., Sakurada, C., Tanno, K., Sakurada, S., Kizasa, K., Hara, A., Abiko, Y., 1996. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral responses in the mouse. *Neurochem. Lett.* 23, 271–274.
- Sakurada, T., Maruyama, T., Moriyama, T., Sakurada, C., Ueno, S., Sakurada, S., 2001. Differential effects of intraplantar capsaicin and substance P on capsaicin-induced desensitization *in vivo*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 113–121.
- Santos, A., Calton, J.B., 1997. Ruthenium red and capsaicin: antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci. Lett.* 235, 73–75.
- Santolita, L., Valent, A., Iannò, A., Di Rosa, M., 1995. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Dr. J. Pharmacol.* 114, 323–328.
- Schewe, T., 1995. Molecular actions of ebselen—an anti-inflammatory antioxidant. *Gen. Pharmacol.* 26, 1153–1169.
- Siebel, J.S., Deibitz, A., Calixto, J.B., 2004. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Res.* 1003, 61–67.
- Sies, H., 1977. Ebselen, a selenium compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic. Biol. Med.* 04, 313–323.
- Sies, H., Arndt, G.E., 2000. Interaction of peroxyl radicals with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1421–1432.
- Soares, A.L., Morosini, F.A., Almeida, K.R., Benício, C.M., Costa, K.A., Coelho, M.M., 2002. *In vivo* evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Dr. J. Pharmacol.* 33, 544–548.
- Szallasi, Z., Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharm. Rev.* 51, 159–232.
- Tjøsen, A., Hole, K., 1997. Animal models of analgesia. In: Dickson, A., Besom, J.-M. (Eds.), *The Pharmacology of Pain*, vol. 1304. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1–20.
- Tominaga, M., Corroia, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gillett, H., Skinner, K., Ruman, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The cloned nociceptin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 551–561.
- Tsuchiya, M., Sakakibara, A., Yamamoto, M., 2005. A tschylsine NK1 receptor antagonist attenuates the 4beta-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. *Dr. J. Pharmacol.* 807, 75–84.

- Vinagre, R., Traas, J.F., Selph, J.L., Johnston, P.R., 1979. Antagonism of pain and hyperalgesia: Anti-inflammatory drugs. In: Vane, J.R., Ferreira, S.H. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50/1. Springer-Verlag, Berlin, pp. 203–212.
- Walther, M., Holzhauser, H., Kuhn, R.J., Wiesner, R., Rulmann, J., Kuhn, H., 1999. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenase by the anti-inflammatory drug Ebselen: dual type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 196–205.
- Warwick, T., Joram, E., Stubbing, A., 1997. Local treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine, inhibits development of secondary hyperalgesia in rat by a peripheral action. *Neurosci. Lett.* 227, 1–4.
- Zasso, F.R., Gungles, C.F.P., Jung, F.A.C., Araldi, B., Zoni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. On the mechanisms involved in analgesic action induced by diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 283–289.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

## **4.2 Mecanismos espinhas na ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila**

### 4.2.1 Artigo 2

#### **Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide**

Lucielli Savegnago, Larissa G. Pinto, Cristiano R. Jesse, João B. T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni

*Brain research*

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)**BRAIN  
RESEARCH**

## Research Report

**Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide**

Lucieli Savegnago, Larissa G. Pinto, Cristiano R. Jesse, João B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni\*

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 27 April 2007

Available online 16 June 2007

## Keywords:

Diphenyl diselenide

Selenium

Glutamatergic receptor

Cytokines proinflammatory

Antinociception

Mice

## ABSTRACT

The present study was designed to investigate further the mechanisms involved in the antinociception caused by diphenyl diselenide in behavioral model of pain in mice. Diphenyl diselenide (1–100 mg/kg), given orally, produced significant inhibition of the biting behavior induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate (175 nmol/site) and *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA; 450 pmol/site), with mean  $ED_{50}$  values of 45.92 (39.74–60.4) and 55.77 (36.52–77.5) mg/kg respectively. However, diphenyl diselenide completely failed to affect the nociception induced by  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA; 135 pmol/site), ( $\pm$ )-1-aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic acid (*trans*-ACPD; 50 nmol/site) and kainate (110 pmol/site). This compound also reduced the nociceptive response induced by substance P (SP) (135 ng/site, i.t.), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; 1 pg/site), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; 0.1 pg/site), bradykinin (BK; 0.1  $\mu$ g/site) and capsaicin (30 ng/site) with mean  $ED_{50}$  values of 16.22, 7.06, 6.06, 4.18 and 7.90 mg/kg, respectively. Together, these results indicate that diphenyl diselenide produced antinociception at spinal sites, with a possible interaction with glutamatergic pathways, more specifically via interaction with NMDA receptors, peptidergic or vanilloid systems.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

Pain is one of the most pervasive problems in our society and has high social costs due to the significant impairment or permanent disabling of millions of people. In this context, the search for drugs that might be useful in the control of pain has become crucial (Millan, 1999; Julius and Basbaum, 2001).

Pain can be defined as an unpleasant perception of a nociceptive sensation. This concept involves 2 components, nociception and perception. Pain perception is an integrative function modulated by emotional, motivational psychological conditions and individual's past history. Nociception or the

nociceptive sensation results from the activation of specific primary sensory neuron subpopulations that transmit the nociceptive information to the spinal cord from where it is relayed to supraspinal levels (Millan, 1999; Julius and Basbaum, 2001). The tissue damage can result in the activation of nociceptors through the release of several neurotransmitters and neuromodulators as substance P, glutamate, bradykinin, prostaglandin, histamine, serotonin, cytokines such as TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) and interleukin-18 among others (Griffis et al., 2006). These bind to receptors and activate signaling pathways, among these protein kinases A and C, calcium/calmodulin-dependent

\* Corresponding author. Fax: +55 55 32208978.

E-mail address: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br) (G. Zeni).

protein kinase, and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Ji and Strichartz, 2004) responsible for lowering the nociceptor threshold and increasing neuronal membrane excitability. Taking this into account, pain can be subject to several levels of biochemical and pharmacological controls, involving a diversity of cell types and soluble mediators (Julius and Basbaum, 2001).

Diphenyl diselenide, a simple diaryl diselenide, exerts biological actions, including antioxidant (Meotti et al., 2004), hepatoprotective (Borges et al., 2005, 2006), anti-ulcer (Savagnago et al., 2005) and anti-inflammatory and antinociceptive effects (Savagnago et al., 2007; Nogueira et al., 2003). In previous studies, we have reported that systemic administration of diphenyl diselenide inhibits chemical models of nociception, including visceral pain induced by acetic acid, biting behavior induced by intra-plantar (i.pl.) injection of glutamate, formalin, capsaicin, bradykinin and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in mice (Savagnago et al., 2007). Moreover, in the same study, it was demonstrated that diphenyl diselenide co-injected locally with glutamate was capable of inhibiting nociceptive and oedematogenic response caused by glutamate into the mouse hindpaw (Savagnago et al., 2007). The mechanisms associated with antinociceptive effect induced by diphenyl diselenide involve, at least in part, its ability of interacting with nitric oxide synthesis as well as with serotonergic and glutamatergic systems (Savagnago et al., 2006; Nogueira et al., 2003). Pieces of evidence now indicate that diphenyl diselenide could be of potential interest for the management of certain pain disorders (Nogueira et al., 2003; Zasso et al., 2005; Savagnago et al., 2007).

In the present study, we sought to examine further the mechanisms through which diphenyl diselenide causes antinociception in mice. For this purpose we used selective glutamatergic receptor agonists as well as substance P, bradykinin (BK), capsaicin, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

## 2. Results

The results presented in Figs. 1A-B shows that diphenyl diselenide (10-100 mg/kg), given orally, produced pronounced inhibition of the nociceptive response induced by spinal injections of glutamate and NMDA, with mean  $ID_{50}$  values (and their respective 95% confidence limits) of 45.92 (39.74-60.4) and 55.77 (36.52-77.5) mg/kg and maximal inhibitions of 52+3%, and 58+4%, respectively. In contrast, diphenyl diselenide had no significant effect against AMPA, trans-ACPD and kainate mediated biting response in mice (Figs. 1C-F).

Figs. 2A-C show that diphenyl diselenide, given by oral route (1-100 mg/kg), significantly inhibited the nociceptive response induced by i.t. injection of SP, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  when compared to the control group. The calculated mean  $ID_{50}$  values for the antinociceptive effect of diphenyl diselenide against SP, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were 15.22 (12.0-21.92), 5.06 (2.67-13.74) and 7.06 (5.09-8.20) mg/kg and maximal inhibitions of 72 $\pm$ 4, 89 $\pm$ 1 and 88 $\pm$ 4%, respectively.

The results depicted in Figs. 3A-B show that treatment with diphenyl diselenide (1-100 mg/kg, p.o.), 30 min prior caused significant inhibition of BK and capsaicin-induced biting responses. The inhibition observed was 78 $\pm$ 5 and 81 $\pm$ 1%,

with mean  $ID_{50}$  values of 4.18 (3.76-4.69) and 7.90 (5.12-12.21) mg/kg, respectively, against the BK and capsaicin responses.

## 3. Discussion

The results of the present study extend previous data from our group (Savagnago et al., 2005) and clearly show that the glutamatergic system, more specifically via interaction with NMDA receptor, plays a critical role in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide. In fact, diphenyl diselenide causes significant inhibition of glutamate (Glu) and NMDA-induced biting response, but did not inhibit the biting response caused by intrathecal injection of kainate, AMPA and trans-ACPD. In agreement, we have recently reported that local administration of diphenyl diselenide induces antinociceptive effect when co-injected with glutamate and this effect could be via interaction with the redox modulatory site of glutamate receptors, namely NMDA receptor. Thus, taking together the previous and the present findings strongly suggest that the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide depends on its selective interaction with NMDA receptor.

Evidence in the literature indicates an important cross talk between glutamate and SP in pain at spinal level (Beirith et al., 1996). The behavior indicative of pain, which can be observed after spinal administration of substance P, is potentiated by co-administration of NMDA (Rosa et al., 2005). Moreover, there are reports showing that pre-synaptic NMDA receptors located on the terminals of small-diameter pain fibers facilitate and prolong the transmission of nociceptive messages, through the release of substance P and glutamate (Liu et al., 1997; Rosa et al., 2005). The results presented here reveal that diphenyl diselenide markedly attenuated the biting response induced by i.t. injection of substance P. On the basis of this finding, we may suggest that antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide involved a possible interaction with glutamate and SP receptors and/or with their signal transduction mechanisms.

We have also shown, in the present study, that diphenyl diselenide caused a significant antinociceptive effect on the capsaicin-induced biting behavior. Capsaicin activates a recently cloned ligand-gated ion channel receptor named vanilloid (TRPV1) which are located in the dorsal horn of the spinal cord. The activation of TRPV1 induces membrane depolarization and increases cation influx, leading noxious stimulus. Additionally, TRPV1 is activated by several inflammatory mediators, such as nerve growth factor (Chuang et al., 2001) and bradykinin (Chuang et al., 2001).

The data obtained with capsaicin reinforce a hypothesis of NMDA receptors involvement in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide. This conclusion derives from the fact that considerable evidence has been accumulated suggesting that central sensitization caused by capsaicin injection involves the activation of different receptor systems in the spinal cord, among which the NMDA receptor seems to play a crucial role (Wille, 2002). In addition, behavioral studies have investigated the role of the NMDA receptor in capsaicin-induced nociception in rodents and in primates. NMDA receptor antagonists have been shown to prevent capsaicin-induced

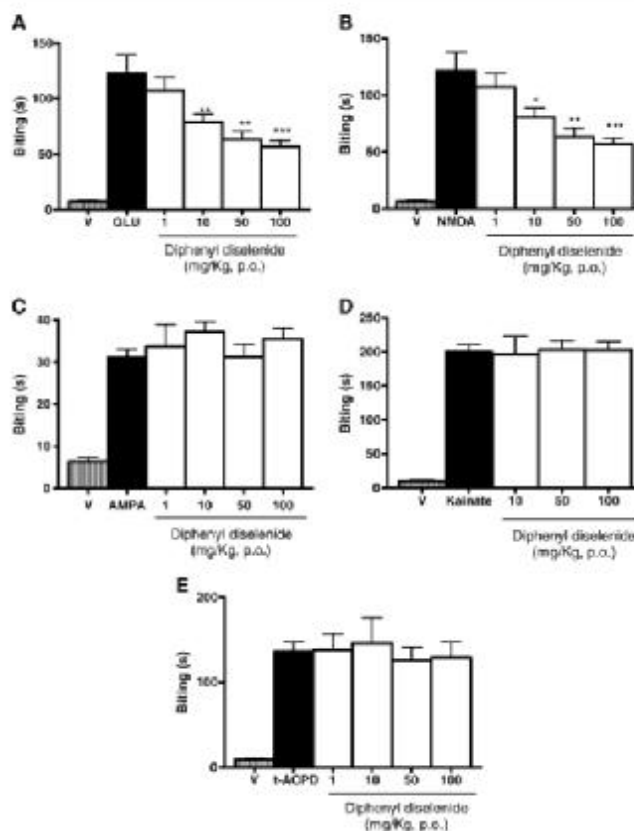


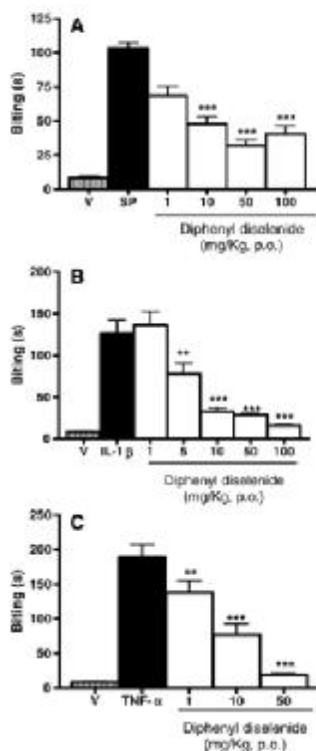
Fig. 1 – Effect of diphenyl diselenide administered orally (1–100 mg/kg), against glutamate (175 nmol/site, i.t., A), NMDA (450 pmol/site, i.t., B), AMPA (135 pmol/site, i.t., C), kainate (110 pmol/site, i.t., D) or *trans*-ACPD (50 nmol/site, i.t., E)-induced biting in mice. Each column represents the mean  $\pm$  SEM for six to eight animals. Asterisks denote the significance levels \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to the control group values (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

nociception after intrathecal or parenteral injection in mice. Thus, the capsaicin-induced pain model is suitable for the evaluation of the antinociceptive activity of new NMDA receptor antagonists both in experimental animals and humans.

Moreover, studies have provided evidence that SP, capsaicin and glutamate interact synergistically in the excitation of dorsal horn nociceptive neurons and in the production of pain, through mechanisms that involve NO production (Liu et al., 1997; Caruso et al., 2006; Sakurada et al., 1990). It is noteworthy that the biological effects of diphenyl diselenide are, at least in part, due to its ability in interacting with NO (Savegnago et al., 2007). As a result, this property could explain the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in the glutamate, SP and capsaicin-induced nociceptive behavior. It has also been reported that i.t. injections of SP or glutamate in mice induced a behavioral response similar to that caused by noxious stimulation and showed a similar response, consist-

ing of biting, scratching and licking the lumbar and caudal parts of the body. For these reasons, i.t. SP or glutamate injection has been widely used for pain models to study the nociceptive/antinociceptive mechanism (Choi et al., 2009).

Another interesting finding of the present study is the demonstration that diphenyl diselenide, given by p.o. route, strongly inhibited bradykinin-induced biting in mice. BK and its related kinins are vasoactive peptides which have an important role as inflammatory mediators and are normally released following tissue trauma or infection. Once released, BK may induce pain by direct stimulation of the nociceptors (A $\delta$  and C fibers) innervating many tissues. Furthermore, BK can release most inflammatory and algogenic substances, namely products derived from arachidonic acid pathways, cytokines and nitric oxide (Dray and Perkins, 1997; Calixto et al., 2000, 2001). Moreover, both functional and neurochemical evidence have been accumulated that bradykinin can excite



**Fig. 2** – Effect of diphenyl diselenide administered orally (1–100 mg/kg, p.o.) on the nociceptive behavior induced by substance P (SP, 135 ng/site, i.t., A); IL-1 $\beta$  (1 pg/site, i.t., B) or TNF- $\alpha$  (0.1 pg/site, i.t., C). Each column represents the mean  $\pm$  SEM for six to eight animals. Asterisks denote the significance levels \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 compared to the control group value (dosed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

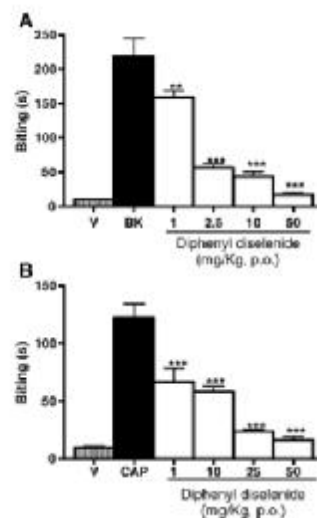
primary sensory neurons and evoke release of neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide and substance P (Geppetti, 1993; Vasko et al., 1994; Smith et al., 2000; Vanegas and Schaible, 2001).

Moreover, the present study demonstrates that diphenyl diselenide orally administered caused an inhibition of the biting response caused by i.t. injection of cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Since cytokines are small regulatory molecules that have well-described roles in the inflammatory process (Sommer and Kress, 2004) a powerful inhibition of these polypeptides would elucidate, at least in part, the anti-inflammatory effects described for diphenyl diselenide. Choi et al. (2003) have reported that i.t. injections of mouse proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) induce biting behavior. In addition, proinflammatory cytokines are well known to be involved in the pathophysiology of pathological pain states that are related in hyperalgesia or allodynia (Reeve et al., 2000). Thus, these data

suggest that the development of proinflammatory cytokines antagonists may be a novel therapeutic goal in pain reduction. Interestingly, the binding of IL-1 $\beta$  to its receptor IL-1RI activates tyrosine kinases and calcium-independent PKC (Obreja et al., 2002), which could explain, in part, the nociception caused by this peptide. In agreement, our research group reported previously that diphenyl diselenide orally injected inhibited PMA (a known PKC activator)-induced nociception in mice (Savegnago et al., 2006). Taking together these results strongly suggest that the effect caused by diphenyl diselenide on IL-1 $\beta$ -induced biting is due to its property of PKC inhibitor.

The results presented here revealed that diphenyl diselenide, orally administered, elicits an inhibition of the TNF- $\alpha$ -induced nociception. TNF- $\alpha$  is released early during acute inflammation and triggers the release of a cascade of pronociceptive cytokines, including interleukin-1 and interleukin-6, which stimulates cyclooxygenase expression with the consequent production of prostaglandins. In addition, TNF- $\alpha$  also stimulates the production of chemokines, such as interleukin-8 and neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1), which in turn stimulate the release of sympathomimetic amines (Cunha et al., 1992). Previous report has shown that TNF- $\alpha$ -induced nociception involves the phosphorylation of p38 (Schäfers et al., 2003).

Taken together the results of the present study confirm and significantly extend our previous results (Savegnago et al., 2006; Zasso et al., 2005; Nogueira et al., 2004), showing that antinociception caused by systemic administration of diphenyl diselenide in mice depends on its direct and/or indirect



**Fig. 3** – Effect of diphenyl diselenide (1–100 mg/kg) on the biting response caused by injection of BK (0.1  $\mu$ g/site, i.t., A) or capsaicin (30 ng/site, i.t., B). Each column represents the mean  $\pm$  SEM for six to eight animals. Asterisks denote the significance levels \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 compared to the control group values (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).



interaction with glutamatergic system, especially, with its selective NMDA receptors, as well as vanilloid and peptidergic receptors and proinflammatory cytokines.

#### 4. Experimental procedures

##### 4.1. Animals

The behavioral experiments were conducted using male Swiss mice (25–35 g) housed 5 per cage and maintained at 22–25 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle. Mice were acclimatized to an individual transparent cage which was also used as the observation chamber after intrathecal injection. Each mouse was used only once through the experiments. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil, and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

##### 4.2. Intrathecal (i.t.) injection

Intrathecal injections were given to waking animals using the method described by Hylden and Wilcox (1980). Briefly, the animals were restrained manually and a 30-gauge needle, attached to a 25- $\mu$ l microsyringe, was inserted through the skin and between the vertebrae into the subdural space of the L5–L6 spinal segments. Injections were given over a period of 5 s.

##### 4.3. Algogen-induced overt nociception in mice

To test the hypothesis that excitatory amino acids (EAAs), substance P (SP), capsaicin, bradykinin or proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) might be involved in the antinociception caused by diphenyl diselenide, we examined the effect of diphenyl diselenide on the biting response induced by these algogens. For this purpose, mice received diphenyl diselenide by oral route (p.o.) (dose range 1–100 mg/kg) 30 min before i.t. injection of 5  $\mu$ l of the EAAs, substance P (SP), capsaicin, bradykinin or proinflammatory cytokines or vehicle solution. The nociceptive response was elicited by glutamate (an excitatory amino acid, 175 nmol/site, i.t.), NMDA (a selective agonist of NMDA subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 450 pmol/site, i.t.) [Ulca and Raigrodsky, 1988], AMPA (a selective agonist of AMPA-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 135 pmol/site, i.t.) [Bumbilla et al., 1996], kainate (a selective agonist of kainate subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 110 pmol/site, i.t.), trans-ACPD (a metabotropic glutamate agonist, 50 nmol/site, i.t.) [Beaull et al., 1998], SP (NK1 receptor selective agonist, 135 ng/site) [Sakurada et al., 1990], capsaicin (30 ng/site) [Sakurada et al., 1996], IL-1 $\beta$  (1 pg/site) and TNF- $\alpha$  (0.1 pg/site) [Choi et al., 2005], or bradykinin (0.1  $\mu$ g/site) [Kamei et al., 1993] with minor modifications. A group of mice received only vehicle (saline solution) by i.t. route. Immediately after i.t. injection of each

agonist, mice were placed individually in observation chambers, and the amount of time (s) the animal spent biting itself was evaluated: glutamate (3 min); AMPA (1 min); NMDA, SP and capsaicin (5 min); trans-ACPD, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (15 min); and BK (30 min). A bite was defined as a single head movement directed at the flanks or hind limbs, resulting in contact of the animal's snout with the target organ.

##### 4.4. Drugs

The following substances were used: L-glutamic acid hydrochloride (glutamate), kainic acid (kainate), (S)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD), *o*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), capsaicin, cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ ), bradykinin and substance P (Sigma, St. Louis, USA).

Diphenyl diselenide, (PhSe) $_2$ , was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described [Paulmer, 1965]. Analysis of the  $^1$ H NMR and  $^{13}$ C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (91.9%) was determined by GC/MS/MS. Diphenyl was dissolved in canola oil and administered by oral route (p.o.). The mice received diphenyl diselenide in a constant volume of 10 ml/kg body weight. All other drugs used were dissolved in a saline solution (0.9%), with the exception of capsaicin, which was prepared in absolute ethanol. The final concentration of ethanol did not exceed 0.5% and did not cause any detectable effect per se.

##### 4.5. Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SEM, except the ID $_{50}$  values (i.e., the dose of diphenyl diselenide necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID $_{50}$  value was determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Comparisons between experimental and control groups were performed by ANOVA followed by Newman-Keuls' test when appropriated. P values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered as indicative of significance.

#### Acknowledgments

The financial support by UFSM (FAPS), FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. J.B.T.R., L.S., C.R.J., C.W.N. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

#### REFERENCES

- Beirith, A., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L., Creczynski-Pasa, T.B., Calixto, J.B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 345, 233–245.

- Borges, L.P., Borges, V.C., More, A.W., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2005. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210, 1–8.
- Borges, L.P., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2006. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem-Biol. Interact.* 150, 99–107.
- Bozall, S.J., Berthels, A., Tolle, T.R., Ziegansberger, W., Urban, L., 1998. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. *NeuroReport* 9, 1204–1207.
- Brambilla, A., Prudentino, A., Grippo, N., Borini, F., 1996. Pharmacological characterization of AMPA induced biting behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 305, 115–117.
- Calixto, J.D., Cabini, D.A., Ferreira, J., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1–5.
- Calixto, J.B., Cabini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 14, 519–526.
- Caruso, C., Durand, D., Watanabe, H., Lasega, M., 2006. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. *Neurosci. Lett.* 393, 60–64.
- Choi, S.S., Han, K.I., Lee, J.K., Lee, H.K., Han, E.J., Kim, D.H., Suh, H.W., 2003. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. *Life Sci.* 73, 471–485.
- Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D., 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* 411, 957–962.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.R., Ferreira, S.H., 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 660–664.
- Dray, A., Perkins, M., 1997. Kinins and pain. In: Farmer, S.G. (Ed.), *The Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. Academic Press, London, pp. 157–172.
- Geppetti, P., 1993. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.* 47, 1–23.
- Griffis, C.A., Compton, P., Doering, L., 2006. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biol. Res. Nurs.* 7, 297–312.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313–316.
- Ji, R.R., Strichartz, G., 2004. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Science* 282, 1–19.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2007. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 445, 203–210.
- Kamei, J., Kashiwazaki, T., Hitosugi, H., Nagase, H., 1999. Allogenic mediator-induced nociceptive response in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 369, 319–323.
- Liu, Z., Lyrañas, S., Thörnwall, M., Le Greves, P., Nyberg, T., 1997. Elevated cerebrospinal fluid level of substance P and decreased undercapitidase activity at term pregnancy. *Neuropeptides* 31, 415–421.
- McCobb, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94, 276–282.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56–63.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285.
- Oberje, D., Rathee, P.K., Lips, K.S., Distler, C., Kress, M., 2002. IL-13 potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1R1, tyrosine kinase and protein kinase C. *FASEB J.* 16, 1497–1503.
- Paulmier, C., 1996. Selenorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1 ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 25–51.
- Raevs, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L., 2000. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia and hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal response to nociceptive stimuli in the rat. *Eur. J. Pain* 4, 247–257.
- Rosa, K., Gadotti, V.M., Rosa, A.O., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.D., Santos, A.R.S., 2005. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neurosci. Lett.* 361, 165–168.
- Sakurada, T., Manome, Y., Tan-No, K., Sakurada, S., Kisara, K., 1990. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking response induced by intrathecal injection of N-methyl-D-aspartate in mice. *Br. J. Pharmacol.* 101, 307–310.
- Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Sakurada, S., Kisara, K., Hara, A., Abiko, Y., 1995. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate induced behavioural response in the mouse. *Neurochem. Int.* 29, 271–278.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2006. Antisecretory and antitumor effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 86–92.
- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jassa, 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.
- Schäfers, M., Svensson, C.I., Sommer, C., Sorokin, L.S., 2003. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 23, 2517–2521.
- Smith, J.A., Davis, C.L., Burgess, G.M., 2006. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3230–3239.
- Sommer, C., Kress, M., 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361, 184–187.
- Ueda, G., Raigorodsky, G., 1988. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. *Dar. J. Pharmacol.* 123, 211–220.
- Vancuga, H., Schaubli, H.G., 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 64, 327–363.
- Vasko, M.R., Campbell, W.B., Waite, K.J., 1994. Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 14, 4987–4997.
- Willis, W.D., 2002. Long-term potentiation in spinothalamic neurons. *Brain Res.* 90, 202–214.
- Zasse, F.B., Gonçalves, C.E.P., Jung, E.A.C., Arai, D., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 203–209.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

**4.3 Envolvimento da via do óxido nítrico/GMP cíclico/canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  na ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila no teste da formalina**

4.3.1 Artigo 3

**Involvement of nitric oxide/cyclic GMP/  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ - channels pathway in the antinociception caused by diphenyl diselenide in the formalin test**

Lucielli Savegnago, Cristiano R. Jesse, Larissa G. Pinto, Adair R.S. Santos  
João B. T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni\*

*Submetido a Brain Research*

**Involvement of nitric oxide/cyclic GMP/ Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>- channels  
pathway in the antinociception caused by diphenyl diselenide in the  
formalin test**

Lucielli Savegnago<sup>a</sup>, Cristiano R. Jesse<sup>a</sup>, Larissa G. Pinto<sup>a</sup>, Adair R.S. Santos<sup>b</sup>  
João B. T. Rocha<sup>a</sup>, Cristina W. Nogueira<sup>a</sup>, Gilson Zeni<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, SM, RS, CEP 97105-900 Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

Abbreviated title: Diphenyl diselenide exerts antinociceptive properties

- The manuscript whole containing 29 pages
- The manuscript containing 3 figures

\*Correspondence should be sent to:

Gilson Zeni

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

Phone: 55-55-32208140

FAX: 55-55-32208978

E-mail: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br)

**Abstract**

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> injected orally (p.o.) into the mouse caused antinociception against the first and second phase of formalin test, with mean ID<sub>50</sub> values of 25.55 (9.52 - 68.58) and 6.45 (1.75 - 23.8) mg/kg, respectively. This compound also significantly inhibited (43 ± 4%) the mice paw oedema induced by intraplantar injection (i.pl.) of formalin. (PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg), given 5 min after the formalin injection, revealed a significant inhibition (71 ± 6%) in the second phase of the formalin-induced pain, whereas the prophylactic treatment caused more intense inhibition (89 ± 3%). The antinociceptive effect caused by (PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg, p.o.) in the formalin test was prevented by intrathecal (i.t.) injection of several K<sup>+</sup> channels blockers such as apamin and charybdotoxin (small - and large -conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel inhibitors, respectively), tetraethylammonium (TEA, non-selective voltage-dependent K<sup>+</sup> channel inhibitor), but not glibenclamide (ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel inhibitor). The antinociceptive action caused by diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) in the formalin test was also blocked by a nitric oxide (NO) inhibitor (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine; L-NOARG) and guanylate cyclase inhibitors (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one, ODQ and methylene blue. These results suggested the participation of nitric oxide/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel pathways on the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide, but its precise site of action remains unclear.

**Keywords:** Diphenyl diselenide, selenium, antinociceptive, nitric oxide system, K<sup>+</sup> channels

## 1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an important messenger in the central nervous system. It has been suggested that NO may be involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease, cerebral ischemia, alcohol-induced brain damage, long-term potentiation, learning, memory, wakefulness, circadian rhythm, nociception, olfaction, food intake, drinking, regulation of neurotransmitter release, and anxiety (Dawson and Dawson, 1996). Some reports have indicated that NO affects many functions such as pain (Kawabata et al., 1993; Sousa and Prado, 2001; Prado et al., 2002), synaptic plasticity (Li and Wieraszko, 1994) and neuronal damage (Nara et al., 1999; Weissman et al., 1992) biphasically. In agreement, there is evidence that L-arginine/nitric oxide/cGMP pathway may be involved in peripheral and central nociceptive processing (Duarte et al., 1990; Souza and Prado, 2001). It has been reported that increased NO production induces hyperalgesia and that NOS-inhibitors can suppress pain. Paradoxically, results from recent research have also implicated NO as a mediator or modulator in analgesic drug function (Souza and Prado, 2001).

Selenium compounds display antioxidant, neuroprotective, antihypertensive, anticancer, antiviral, immunosuppressive, antimicrobial and anti-inflammatory properties (Sies, 1993; Schewe, 1995; May, 1999; Nogueira et al., 2003; Meotti et al., 2004; Zasso et al., 2005; Savegnago et al., 2007a, b, c). Because of these, a great number of novel pharmaceutical agents which are selenium-based or which target specific aspects of selenium metabolism are under development (May, 1999; Nogueira et al., 2003; Meotti et al., 2004).

The organic selenium compound, ebselen, is a classical antioxidant and well known as the most important glutathione peroxidase mimetic agent (Daiber et al.,

2000). Furthermore to its peroxidase-like activity, ebselen has anti-inflammatory activity in different models of inflammation (Parnhan and Graf, 1987; Schewe, 1995), which may be related at least in part to its capability to scavenge peroxynitrite, a potent inflammatory mediator (Sies and Arteel, 2000). The mechanism(s) underlying the anti-inflammatory activity of ebselen is still not completely understood but is linked to inhibition of NADPH-oxidase, protein kinase C, nitric oxide synthase and lipoxygenases most likely by interacting with critical thiol/disulfide groups in these enzymes (Cotgreave et al., 1989; Walther et al., 1999; Mugesh et al., 2001).

Similarly, diphenyl diselenide, a simple diaryl diselenide, is known as a drug which induces minor toxic effects when administered acutely to mice at doses that has antinociceptive and anti-inflammatory activities when assessed against chemical and thermal behavioral tests (Nogueira et al., 2003; Zasso et al., 2005; Savegnago et al., 2007a). We have previously reported that diphenyl diselenide produces antinociception in several models of pain through a complex mechanism that likely involves an interaction with the serotonergic, glutamatergic and nitrergic pathways, as well as peptidergic and vanilloid systems (Savegnago et al., 2007a, b). More recently, we demonstrated that diphenyl diselenide also produces systemic anti-allodynic action in two models of persistent inflammation and neuropathic pain and attenuates acute hyperalgesia induced by glutamate, NMDA, bradykinin and PGE<sub>2</sub> in mice (Savegnago et al., 2007c).

Nowadays, few drugs are effective in treating pathological (acute and chronic) pain, and in general, these drugs present low efficacy and numerous side effects (Woolf and Mannion, 1999; Mendell and Sahenk, 2003). For that reason, the search for new compounds that could be applied in acute and chronic pain therapy has been essential.

Thus, despite the growing amount of experimental data the precise mechanisms through which diphenyl diselenide causes systemic antinociception in rodents still remain elusive. Therefore, the goal of the present study was to further investigate the mechanisms involved in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. To this end, we carried out experiments to determine the possible participation of the nitric oxide/cyclic GMP/  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{K}^{+}$ - channels pathway in the antinociception induced by diphenyl diselenide in the formalin test.

## 2. Results

### 2.1. Effect of diphenyl diselenide on formalin-induced nociception

The result in Fig. 1 (A) show that diphenyl diselenide (10-100 mg/kg, p.o.) caused a significant inhibition in the first phase (0 - 5 min) of the formalin-induced licking. Furthermore, diphenyl diselenide administered, p.o., at the doses of 1 -100 mg/kg, elicited significant inhibition in the second (15 - 30 min) phase of formalin test (Fig. 1B). The calculated mean  $\text{ID}_{50}$  for these effects were: 25.55 (9.52 - 68.58) for the first phase and 6.45 (1.75 - 23.8) mg/kg for the second phase, and the percentage of inhibition observed was  $76 \pm 3$  and  $97 \pm 1\%$ , respectively.

Furthermore, diphenyl diselenide (0.1 - 100 mg/kg, p.o.) was significantly effective in inhibiting the mouse paw oedema induced by i.pl. injection of formalin (percentage of inhibition of  $43 \pm 4\%$ )(Fig. 1C).

The p.o. administration of the mice with diphenyl diselenide (10 mg/kg), given 5 min after the formalin injection (post-administered diphenyl diselenide), revealed a significant inhibition ( $71 \pm 6\%$ ) in the second (inflammatory nociception) phase of the



formalin-induced pain, whereas the prophylactic treatment (pre-administered diphenyl diselenide) caused an inhibition of  $89 \pm 3\%$  (Fig. 1D).

#### 2.1.1. Antagonism of diphenyl diselenide-induced antinociception by L-NOARG, ODQ and methylene blue in the formalin test

The i.c.v. administration of an inhibitor of NO synthase, L-NOARG (456 nmol/site), significantly reduced the antinociceptive action induced by diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) in the first (0 - 5 min) and in the second (15 - 30 min) phases of the formalin test (Figs. 2A and B).

Figs. 2C and D show that the i.c.v. injection of an inhibitor of guanylate cyclase, ODQ (0.3 nmol/site), inhibited significantly the diphenyl diselenide-induced antinociceptive effect in the second (but not the first) phase of the formalin test. Methylene blue (1 mg/kg, i.p.), attenuated significantly the diphenyl diselenide-induced antinociceptive effect in the second phase of formalin test (Figs. 2E and F).

#### 2.1.2. Involvement of K<sup>+</sup> channels in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in the formalin test

Intrathecal administration of TEA (1  $\mu$ g/site) (Figs. 3A and B), charybdotoxin (250 pg/site) (Figs. 3C and D) and apamin (50 ng/site) (Figs. 3E and F), given 15 min beforehand, prevented the antinociception caused by diphenyl diselenide (10 mg/kg), in the second (but not the first) phase of formalin test.

Conversely, glibenclamide (100  $\mu$ g/site) (Figs. 3G and H) failed to affect the antinociceptive action of diphenyl diselenide (10 mg/kg), against both phases of formalin test. The treatment with apamin, charybdotoxin, TEA and glibenclamide

significantly reversed the antinociceptive effect of morphine when assessed against the first and second phases of the formalin test (Figs. 3A - H).

### 3. Discussion

The results of the present study demonstrated that diphenyl diselenide administered orally elicited a significant antinociception action in mice, when assessed in the formalin model. In fact, this compound produces graded inhibition against neurogenic (first phase, 0 - 5 min) ( $76 \pm 3$ ) and inflammatory (second phase, 15 - 30 min) ( $97 \pm 1\%$ ) pain response caused by formalin injection in mice. Indeed, diphenyl diselenide also was significantly effective in inhibiting ( $43 \pm 4\%$ ) the mouse paw oedema induced by i.pl. injection of formalin. Thus, these results suggest that diphenyl diselenide was more effective in the inflammatory pain on the formalin test and demonstrated that antinociception caused by diphenyl diselenide seems to be associated with its anti-inflammatory action, as revealed by inhibition of paw oedema formation in the mice treated with formalin. The reduction in pain sensitivity of the inflammatory pain (second phase) and paw oedema caused by diphenyl diselenide could be related to inhibition of prostaglandin synthesis at the level of cyclooxygenases (COX). In agreement, it has been demonstrated that nociceptive response caused by the intraplantar injection of formalin together with formation of oedema has been associated with release of several inflammatory mediators, including prostaglandins (Tjølsen et al., 1992). These results are consistent with our early study in which diphenyl diselenide subcutaneous injected caused an antinociceptive action using formalin test (Nogueira et al., 2003). Moreover, our research group has reported that systemic administration (into contra lateral paw) and local (ipsilateral) of diphenyl diselenide reduced the pain-licking response in the

second phase of formalin test, thus confirming that it possesses antinociceptive properties. The systemic effect of diphenyl diselenide suggests the involvement of a central action in the antinociceptive property of this organoselenium compound (Zasso et al., 2005).

The formalin test in mice is a valid and reliable model of nociception and is sensitive for various classes of analgesic drugs. The noxious stimulus is an injection of dilute formalin under the skin of the surface of the right hindpaw. The response is the amount of time the animals spend licking the injected paw. Two distinct periods of high licking activity can be identified, an early phase lasting the first 5 min and a late phase lasting from 15 to 30 min after the injection of formalin. It is suggested that the early phase is due to a direct effect on nociceptors and that prostaglandins do not play an important role during this phase. The late phase seems to be an inflammatory response with inflammatory pain that can be inhibited by anti-inflammatory drugs (Hunnskaar and Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992). It has been demonstrated that intraplantar injection of formalin in rodents produces significant increase in spinal levels of different mediators, such as excitatory amino acids, prostaglandin E<sub>2</sub>, substance P (SP), serotonin (5-HT) and histamine, among other peptides (Tjølsen et al., 1992).

The results of the current study also demonstrated that diphenyl diselenide, when examined in the formalin test, produced not only prophylactic effect (i.e. producing pre-emptive antinociception when it was pre-administered), but also therapeutic (i.e. effective when post-administered) effect. Thus, these findings might have additional therapeutic implications for the development of a new drug to treat inflammatory pain.

Another important objective of the present study was to characterize further some of the mechanisms through which diphenyl diselenide exerts its antinociceptive action in the formalin test.

We reported here, for the first time, that  $\text{Ca}^{2+}$ -activated and non-selective voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel inhibitors caused a significant inhibition of the antinociception induced by systemic administration of diphenyl diselenide when analyzed in the second phase of the formalin model of pain. However, the opening of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels does not appear to play a major role in diphenyl diselenide-induced antinociception because treatment of animals with glibenclamide had no effect on diphenyl diselenide action when assessed against either phase of the formalin test. Our data are in agreement with other authors who have demonstrated the peripheral antinociceptive effects produced by metamizol, meloxicam and resveratrol were blocked by the administration of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated and non-selective voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels inhibitors, but not by the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel blocker, glibenclamide (Granados-Soto et al., 2002; Ortiz et al., 2003a, b, 2005.). Interestingly, analyzing the results obtained here it appears that morphine, a potent analgesic drug, is much more potent than diphenyl diselenide in this behavioral model of pain. Moreover, we cannot discharge the possibility that the observed effect by diphenyl diselenide could be due to the action on other  $\text{K}^+$  channels. The fact that tetraethylammonium (TEA, inhibitor non-selective of voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels) is also able to block  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels (Cook and Quast, 1990) further suggests the participation of these channels in the mechanism of diphenyl diselenide action. The opening of  $\text{K}^+$  channels, causing hyperpolarization of the cell membrane, is a physiological means of decreasing cell excitability. Thus, drugs with this property have a broad clinical potential. The identification of synthetic molecules

that evoke physiological responses by opening K<sup>+</sup> channels has led to a new direction in the pharmacology of ion channels (Lawson, 2000).

Another notable piece was the results provide pharmacological evidence for the involvement of nitric oxide/cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. This assertion is supported by following evidences. First, the i.c.v. administration of L-NOARG (NO synthesis inhibitor) significantly reversed the antinociception caused by diphenyl diselenide in both phases in the formalin test. NO is generated from L-arginine by the catalytic action of NO synthase (NOS). Physiologically, NO actions are believed to be mediated by locally produced NO and in most instances by the subsequently generated second messenger molecule guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP). The second piece of evidence is the fact that the pretreatment of mice with guanylate cyclase inhibitors (methylene blue and ODQ), significantly reversed the antinociceptive effect induced by diphenyl diselenide (Ferreira et al., 1991; Mixcoatl-Zecuatl et al., 2000). Although methylene blue (inhibited both NOS and sGC) is apparently not specific for soluble guanylate cyclase inhibition it has been used as a pharmacological tool to inhibit this enzyme (Jain et al., 2001; Patil et al., 2004). Moreover, the data on ODQ reinforce the possible involvement of NO-cGMP pathway in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide, since ODQ is a highly NO-sensitive inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC).

Several other studies point to antinociceptive effect, via activation of the L-arginine/NO/cGMP (Germany et al., 1996). However, studies in the literature indicate that the NO/cyclic GMP pathway can have pronociceptive rather than antinociceptive effects (Aley et al., 1998). It discrepancy may be due to the different experimental pain model used, diverse tissue level and the variant NO and cyclic GMP intracellular

content (Kawabata et al., 1994; Tegeder et al., 2002). Nevertheless, it is important to point out that in the rat formalin and the rat paw pressure models, the production of NO and cyclic GMP in subcutaneous tissue is involved in antinociceptive states (Duarte et al., 1990; Soares et al., 2000; Soares and Duarte, 2001; Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Ortiz et al., 2003 a, b ; Alves et al., 2004).

It is very important mentioned that in this study the effect caused by diphenyl diselenide in the mice motor coordination was not evaluated. Zasso et al. (2005) have reported that diphenyl diselenide caused no alteration on locomotion behaviour in the open field test, suggesting that the antinociceptive action of this compound was not due to motor disturbances.

Therefore, based on the results we can speculate that diphenyl diselenide could exert antinociceptive effect due to activate: (a)  $K^+$  channels at spinal level; (b) NO/cGMP at supraspinal level and (c) cGMP at systemic level. Thus, collectively these results suggest a major participation of the NO/cyclic GMP pathway and  $Ca^{++}/K^+$  channels in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. Although, its precise site of action remains unclear. Thus, the present results suggest that diphenyl diselenide might be of potential interest in the development of new clinically relevant drugs for the management of pain.

## **4. Experimental procedures**

### **4.1. Animals**

The behavioral experiments were conducted using male Swiss mice (25 - 35g) from our own breeding colony. The mice were kept in separate animal rooms, on a 12 h light/dark cycle (with lights on at 6:00 a.m.), at air- temperature room (23 - 25°C), with free access to food and water. Animals were acclimatized to the

laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experimenters were blinded to the drugs given to mice. In each experimental condition the number of animals used was of 7-10. At the end of the experiments, animals were euthanized by cervical displacement.

The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drugs treatments.

#### **4.2. Intracerebroventricular (i.c.v) and intrathecal (i.t.) injections**

For i.c.v. injections, animals were lightly anaesthetized with ether, and a volume of 5  $\mu$ l of sterile saline or the drugs were directly injected into the lateral ventricle (i.c.v.; coordinates from bregma: 1 mm lateral, 1 mm rostral, 3 mm vertical) as described previously (Vaz et al., 1996).

The i.t. injections were made in conscious mice using the method described by Hylden and Wilcox (1980). The animals received, using a microsyringe connected to polyethylene tubing, a volume of 5  $\mu$ l of sterile saline (control) or drugs which were injected directly between the subdural space of the L5-L6 spinal segments. Injections were given over a period of 5 s (Vaz et al., 1996).

#### **4.3. Effect of diphenyl diselenide on formalin-induced nociception and oedema**

The formalin test was carried out as described by Hunskaar and Hole (1987). Animals received 20  $\mu$ l of 2.5 % formalin solution (0.92 % of formaldehyde), injected

intraplantarily (i.pl.) in the ventral right hindpaw. Animals were pretreated with diphenyl diselenide by oral route (p.o.; 0.1 - 100 mg/kg; 10 ml/kg), 30 min before formalin injection. Control animals received a similar volume of vehicle (canola oil; 10 ml/kg; p.o.). After i.pl. injection of formalin, the time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer during the periods of 0 - 5 min (neurogenic phase) and 15 - 30 min (inflammatory phase) and considered as indicative of nociception.

In order to assess whether the antinociceptive activity produced by diphenyl diselenide in formalin-induced nociception was associated with development of anti-oedematogenic activity, we measured the paw oedema by comparing the difference between the weight of the formalin-treated paw and the weight of the contralateral paw (non-treated paw). For this purpose, animals were sacrificed 30 min after formalin injection by cervical dislocation, and both paws were cut at the ankle joint and weighed on an analytical balance. This procedure was similar to that described previously (Beirith et al., 1998).

In a separate series of experiments, we also investigated the possible antinociceptive effect of diphenyl diselenide given after formalin injection. For this purpose, mice were intraplantarly injected with formalin, and after 5 minutes they received diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (canola oil, p.o.) for evaluation against the second phase of the nociception caused by the formalin.

#### **4.4. Analysis of the possible mechanism of action of diphenyl diselenide in the formalin test**

To address some of the mechanisms by which diphenyl diselenide inhibits formalin-induced nociception, mice were treated with different drugs. The choice of the doses of each drug was based on previous data the literature. The formalin was



chosen for this purpose because of the specificity and sensitivity in nociception transmission that this model provides (Le Bars et al., 2001).

#### 4.4.1. Involvement of nitric oxide/cyclic GMP pathway in the antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in the formalin test

The mice were pre-treated with L-NOARG (NO synthase inhibitor; 456 nmol/site, i.c.v.), ODQ (soluble guanylate cyclase inhibitor; 0.3 nmol/site, i.c.v.) and methylene blue ((inhibited NO synthase and soluble guanylate cyclase; 1 mg/kg, i.p.) 10 min before of diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) injection. Other groups of animals received only diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (canola oil, 10 ml/kg, p.o. or sterile saline 5  $\mu$ l/site; i.c.v.) 30 min before formalin injection. The nociceptive response in the first and second phases of the formalin test was recorded 30 min after administration of diphenyl diselenide or vehicle. The dose of methylene blue was based in study described by Jain et al. (2001) and dose of L-NOARG and ODQ were based in Ferreira et al. (1999)

#### 4.4.2. Possible involvement of K<sup>+</sup> channels in the antinociceptive effect of diphenyl diselenide in the formalin test.

For this purpose, mice were pre-treated with glibenclamide (100  $\mu$ g/site, intrathecal,(i.t.); a blocker of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels), apamin (50 ng/site, i.t.; a blocker of small (or low)-conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels), charybdotoxin (250 pg/site, i.t.; a blocker of large (or fast)-conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels) or with tetraethylammonium (TEA; 1  $\mu$ g/site, i.t.; a non selective blocker of voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels), and after 15 min they received diphenyl diselenide (10 mg/kg,

p.o.) or morphine (2.5 mg/kg, subcutaneous route (s.c.)), used as a positive control, or vehicle. Other groups of animals received saline (5 µl/site) by i.t. route, 15 min prior to the administration of diphenyl diselenide, morphine or vehicle. The nociceptive responses to formalin were recorded 30 or 20 min after the administration the diphenyl diselenide or morphine, respectively. The procedure and doses used was essentially similar to that described previously (Strong, 1990; Aronson, 1992; Welch and Dunlow, 1993; Santos et al., 1999).

#### **4.5. Drugs**

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described (Paulmier, 1986). Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (99.9%) was determined by GC/HPLC. Diphenyl diselenide was dissolved in canola oil. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. All drugs were dissolved in saline, with the exception of ODQ and glibenclamide, which were dissolved in 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). The final concentration of DMSO did not exceed 0.5 % and had no detectable effect per se when assessed in control animals.

#### **4.6. Statistical analysis**

The results are presented as the mean ± S.E.M., except the ID<sub>50</sub> values (i.e. the dose of diphenyl diselenide reducing the pain response by 50% in relation to control group values) were determined by linear regression from individual experiments using “GraphPad Software” (GraphPad software, San Diego, CA) and

are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Maximal inhibition values were calculated at the more effective dose used. The statistical significance of differences between groups was performed by ANOVA followed by Newman-Keuls test. Probability values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered as statistically significant.

### **Acknowledgements**

The financial support by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. J.B.T.R., L.S., C.R.J., C.W.N., A.R.S.S. and G.Z. are the recipients of CNPq fellowships.

### **References**

- Aley, K.O., McCarter, G., Levine, J.D., 1998. Nitric oxide signalling in pain and nociceptor sensitisation in the rat. *J. Neurosci.* 18, 7008 - 7014.
- Alves, D.P., Tatsuo, M.A., Leite, R., Duarte, I.D., 2004. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive  $K^+$  channels activation. *Life Sci.* 74, 2577 - 2591.
- Aronson, J.K., 1992. Potassium channels in nervous tissue. *Biochem. Pharmacol.* 43, 11 - 14.
- Beirith, A., Santos, A.R., Rodrigues, A.L., Creczynski-Pasa, T.B., Calixto, J.B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol* 345, 233 - 245.

- Cook, N.S., Quast, U., 1990. Potassium channel pharmacology. In: Cook NS, editor. Potassium channels: structure, classification, function and therapeutic potential. Chichester, UK' Ellis Horwood Limited; p: 181 - 255.
- Cotgreave, I.A., Duddy, S.K., Kass, G.E.N., Thompson, D., Moldeus, P., 1989. Studies on the anti-inflammatory activity of Ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C? *Biochem. Pharmacol.* 38, 649 - 656.
- Daiber, A., Zou, M., Bachschmid, M., Ullrich, V., 2000. Ebselen as a peroxynitrite scavenger in vitro and ex vivo. *Biochem. Pharmacol.* 59, 153 - 160.
- Dawson, L., Dawson, T. M., 1996. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem. Int.* 29, 97 - 110.
- Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide– cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 289 - 293.
- Ferreira, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in the thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38, 835 - 842.
- Ferreira, S.H., Duarte, I.D., Lorenzetti, B.B., 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 201, 121 - 122.
- Germany, A., Gonzales, P., Contreras, E., 1996. Possible role of nitric oxide in the antinociceptive action of intraventricular bradykinin in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 310, 123 - 127.

- Granados-Soto, V., Arguelles, C.F., Ortiz, M.I., 2002. The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology* 43, 917 - 923.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313 - 316.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103 - 114.
- Jain, N.K., Patil, C.S., Singh A., Kulkarni K.S., 2001. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.* 909, 170 - 178.
- Kawabata, A., Umeda, N., Takagi H., 1993. L-arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-Met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.* 109, 73 - 79.
- Kawabata, A., Manabe, S., Manabe, Y., Takagi, H., 1994. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br. J. Pharmacol.* 112, 547 - 550.
- Lawson, K., 2000. Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int.* 57, 838 - 845.
- Lázaro-Ibáñez, G., Torres-López, J.E., Granados-Soto, V., 2001. Participation of the nitric oxide – cyclic GMP–ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.* 426, 39 - 44.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animals model of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597 - 652.

- Li, G., Wieranszko, A., 1994. Dual effect of sodium nitroprusside on potentials recorded from mouse hippocampal slices. *Brain Res.* 667, 33 - 38.
- May, S.W., 1999. Selenium-based drug design: rationale and therapeutic potential. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8, 1017 - 1030.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z., 2003. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 348, 1243 - 1255.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94, 276 - 282.
- Mixcoatl-Zecuatl, T., Aguirre-Banuelos, P., Granados-Soto, V., 2000. Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 400, 81 - 87.
- Mugesh, G., du Mont, W.W., Sies, H., 2001. Chemistry of biologically important Organoselenium compounds. *Chem. Rev.* 101, 2125 - 2179.
- Nara, K., Konno, D., Uchida, J., Kiuchi, Y., Oguchi, K., 1999. Protective effect of nitric oxide against iron-induced neuronal damage. *J. Neural Transm.* 106, 835 - 848.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56 - 63.
- Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., Granados-Soto, V., 2003a. Possible involvement of potassium channels in peripheral antinociception induced by metamizol: lack of participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 465 - 470.

- Ortiz, M.I., Granados-Soto, V., Castañeda-Hernández, G., 2003b. The NO-cGMP- K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 187 - 195.
- Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., Granados-Soto, V., 2005. Pharmacological evidence for the activation of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels by meloxicam in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 725 - 731.
- Parnham, M.J., Graf, E., 1987. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3095 - 30102.
- Patil, C.S., Jain, N.K., Singh, V.P., Kulkarni, S.K., 2004. Cholinergic-NO- cGMP mediation of sildenafil-induced antinociception. *Indian J. Exp. Biol.* 42, 361 - 367.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C. *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis.* 1 ed. Pergamon Press, Oxford 25 - 51.
- Prado, W.A., Schiavon, V.F., Cunha F.Q., 2002. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 441, 57 - 65.
- Santos, ARS, De Campos, ROP., Miguel, OG., Cechinel Filho, V., Yunes, RA., Calixto, JB., 1999. The involvement of K<sup>+</sup> channels and G<sub>γ0</sub> protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Eur. J. Pharmacol.* 379, 7 - 17.
- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007a. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 555, 129 - 138.

- Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Rocha, J. B.T., Nogueira, C. W. Zeni, G., 2007b. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. *Brain Research*, 1162, 32 - 37.
- Savegnago, L., Jesse, C. R., Pinto, L. G., Rocha, J. B.T., Nogueira, C. W., 2007c. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. *Brain Research*, *in press*.
- Schewe, T., 1995. Molecular actions of ebselen- an anti-inflammatory antioxidant. *Gen. Pharmacol.* 26, 1153 - 1169.
- Sies, H., 1993. Ebselen, a "selenorganic" compounds as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 313 - 323.
- Sies, H., Arteel, G.E., 2000. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1451 - 1455.
- Soares, A.C., Leite, R., Tatsuo, M.A.K.F., Duarte, I.D.G., 2000. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.* 400, 67 - 71.
- Soares, A.C., Duarte, I.D.G., 2001. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat PGE<sub>2</sub>-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.* 134, 127 - 131.
- Souza A.M., Prado, W.A., 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 897, 9 - 19.
- Strong, P.N., 1990. Potassium channel toxins. *Pharmacol. Ther.* 46, 137 - 162.
- Tegeder, I., Schmidtko, A., Niederberger, E., Ruth, P., Geisslinger, G., 2002. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci. Lett.* 332, 146 - 150.



- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5 - 17.
- Vaz, Z.R., Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1996. Antinociceptive action of 2- 4-bromobenzoyl -3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 304 - 312.
- Walther, M., Holzhutter, H., Kuban, R.J., Wiesner, R., Rathmann, J., Kuhn, H., 1999. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenase by the anti-inflammatory drug Ebselen: Dual type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 56, 196 - 203.
- Weissman, B.A., Kadar, T., Brandeis, R., Shapira, S., 1992. NG-nitro-L-arginine enhances neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 146, 139 - 142.
- Welch, S.P., Dunlow, L.D., 1993. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 390 - 399.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353, 1959 - 1964.
- Zasso, F.B., Gonçalves, C.E.P., Jung, E.A.C., Araldi, D., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 283 - 289.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109 - 110.

## Legends

**Fig.1.** Effect of diphenyl diselenide given by oral route (0.1 - 100 mg/kg, p.o) on the licking (A, B) and oedema (C) induced by formalin in mice. The total time spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and the second (15 - 30 min, panel B) phase after intraplantar injection of formalin. The oedema (panel C) was measured at the end of second phase of formalin test. The effect of diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o) given 5 min after the formalin injection in mice has been demonstrated in panel D. To this end, total time spent licking the hindpaw was measured in the second (15 - 30 min) phase after intraplantar injection of formalin. Control value indicates the animals injected with vehicle (canola oil). Each column represents the mean of 7 to 10 animals and vertical lines indicate the S.E.M. Control value "C" indicates the animals injected with vehicle (canola oil). The asterisks denote the significance levels when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test): \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; and \*\*\*  $p < 0.001$ . <sup>ns</sup> denote did not significant difference between mice pre-administered with diphenyl diselenide when compared to post administered.

**Fig.2.** Effect of pretreatment of mice with L-NOARG (456 nmol/site, i.c.v., panels A and B), ODQ (0.3 nmol/site, i.c.v., panels C and D) and methylene blue (1mg/kg, i.p., panels E and F) 10 min before injection of diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) against the first and the second phase of formalin-induced licking in mice. The total time spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A and C) and in the second phase (15 - 30 min, panel B and D) after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean of 7 to 10 animals and vertical lines

indicate the S.E.M. The symbols denote significance levels: \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to the vehicle group; #  $p < 0.05$  compared to diphenyl diselenide alone (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

**Fig.3.** Effect of pretreatment of mice with tetraethylammonium (TEA; 1  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.t.; panels A and B), charybdotoxin (250  $\text{pg}/\text{site}$ , i.t., panels C and D), apamin (50  $\text{ng}/\text{site}$ , i.t.; panels E and F) and glibenclamide (100  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.t.; panels G and H) on the antinociceptive profiles by diphenyl diselenide (10  $\text{mg}/\text{kg}$ , p.o) and morphine (2.5  $\text{mg}/\text{kg}$ ) against formalin-induced nociception in mice. The total time spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min) and the second phases (15 - 30 min) after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean of 7 to 10 animals and vertical lines indicate the S.E.M. The symbols denote significance levels: \*\*  $p < 0.01$ ; and \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to the vehicle group; #  $p < 0.05$  compared to diphenyl diselenide or morphine alone (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

Fig.1

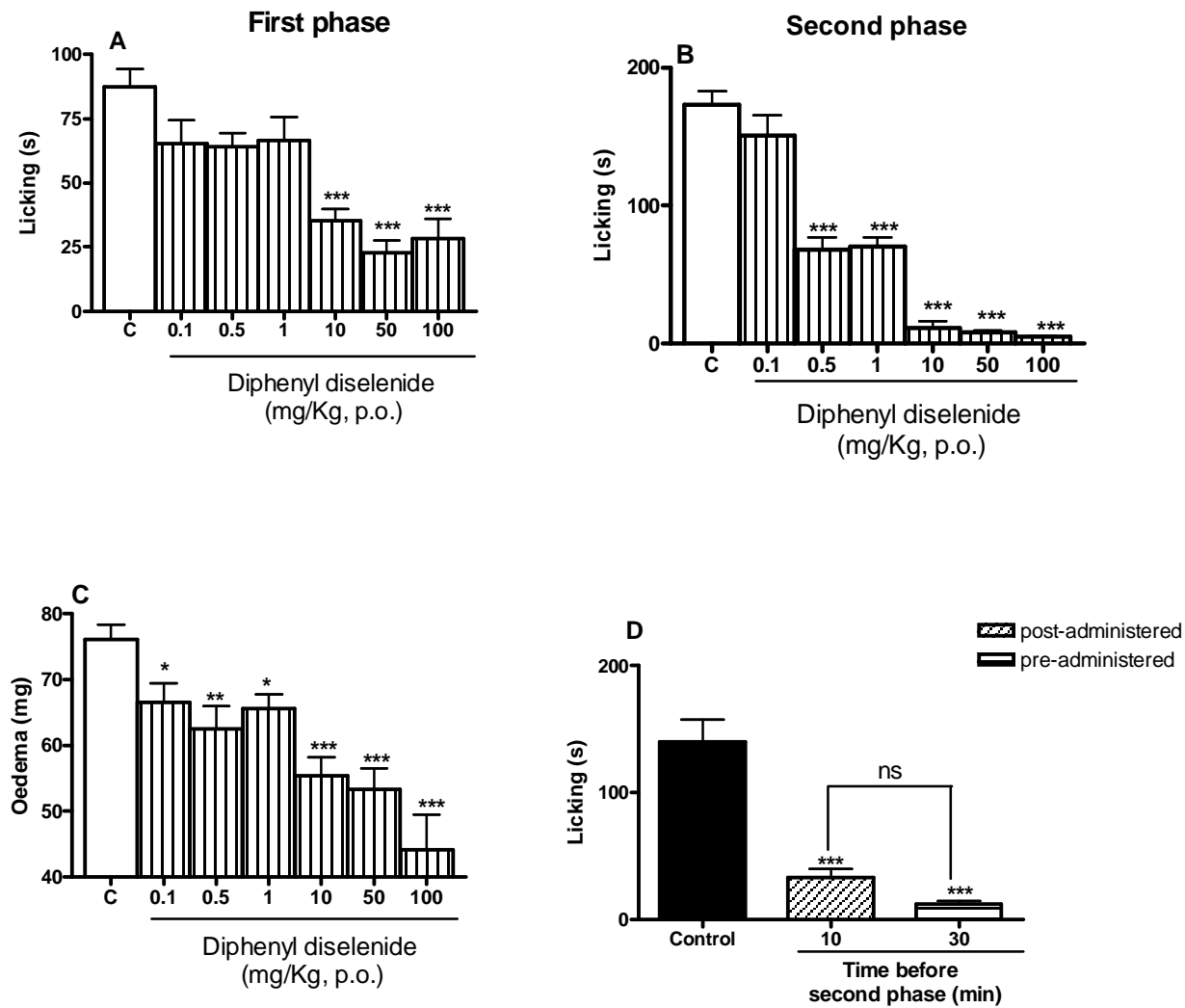


Fig 2

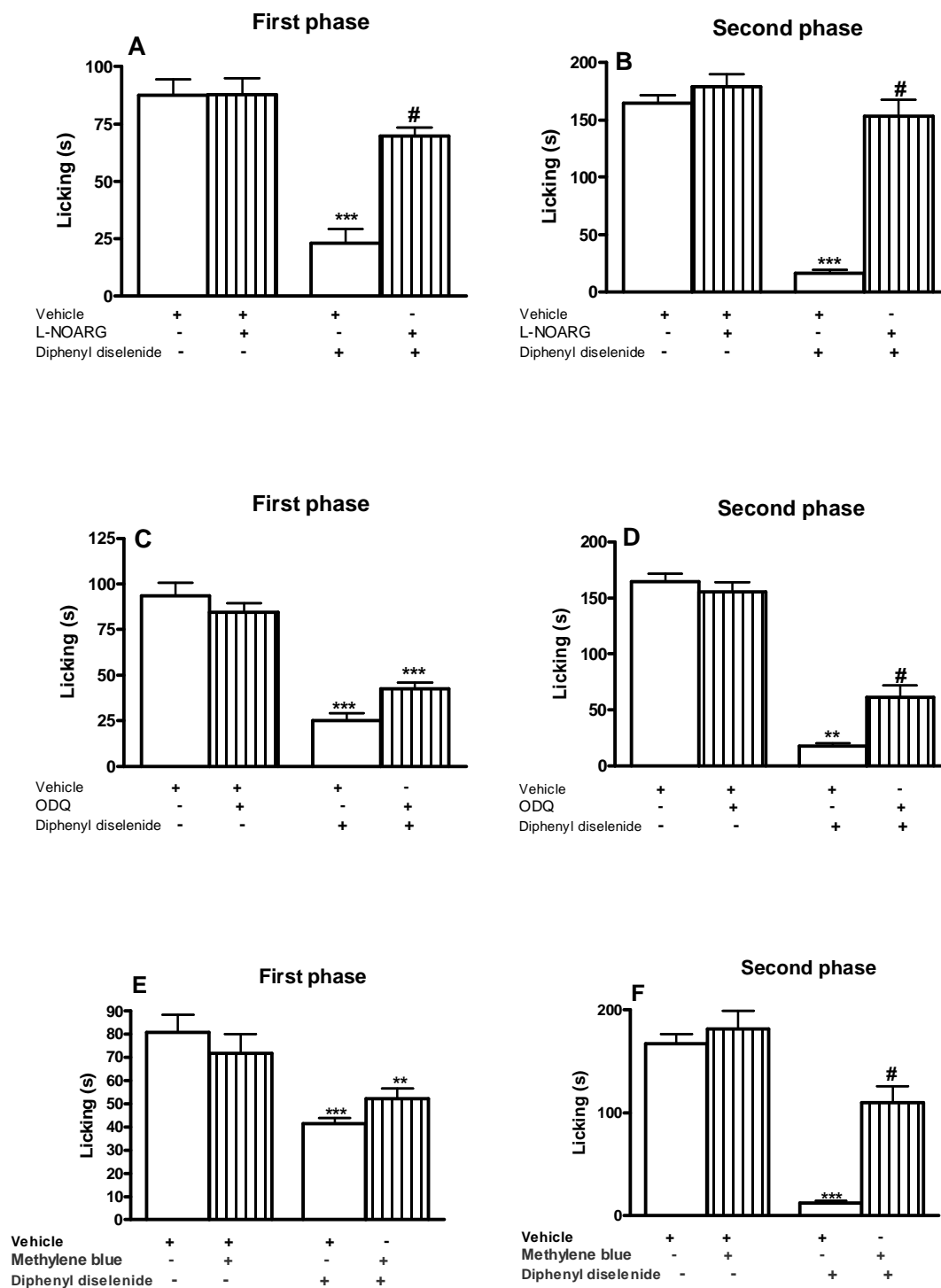
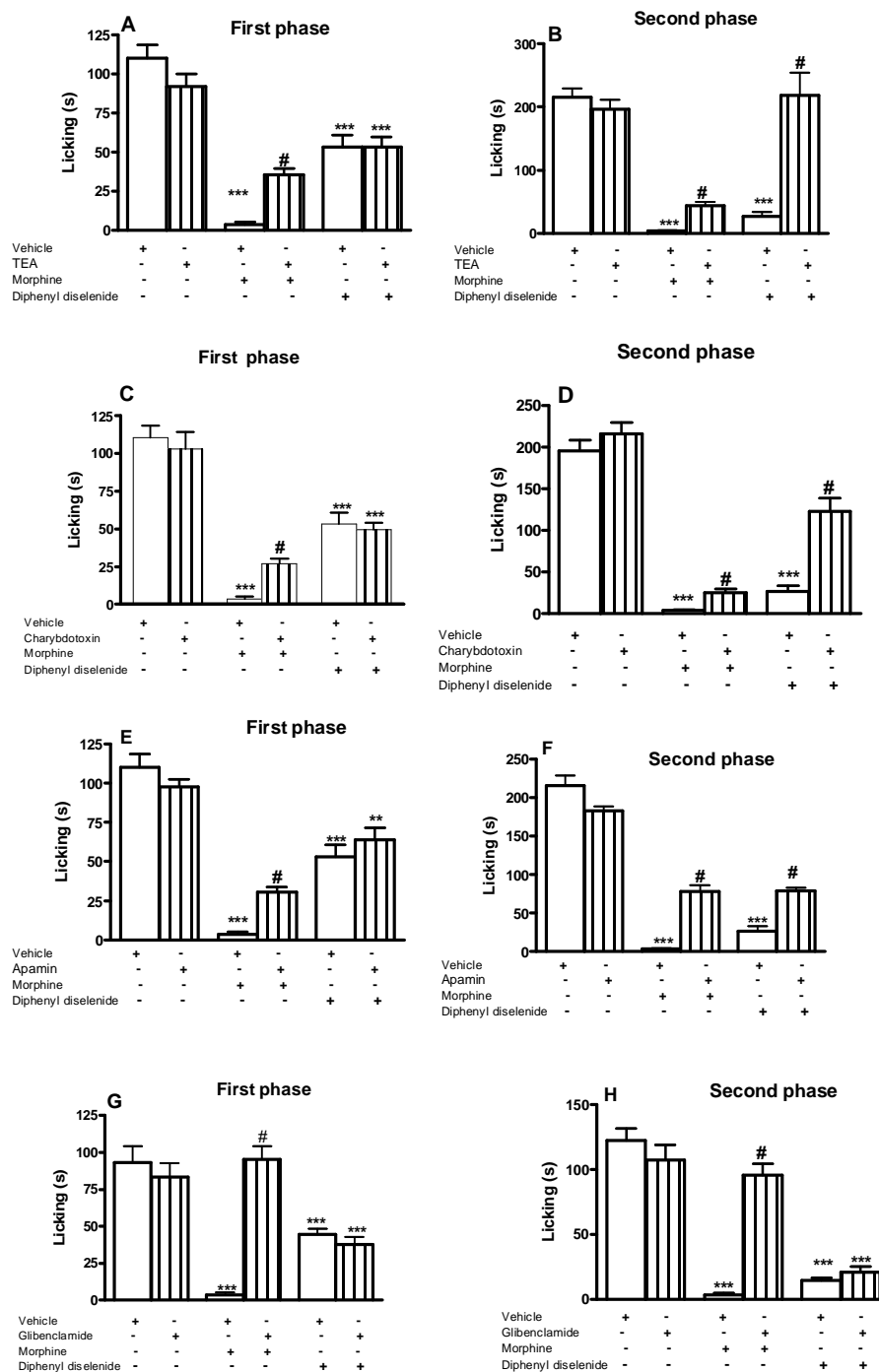


Fig.3.



#### **4.4 Disseleneto de difenila atenua a hiperalgesia térmica e o comportamento de dor inflamatória persistente e neuropática em camundongos.**

##### 4.4.1 Artigo 4

#### **Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice**

Lucielli Savegnago, Cristiano R. Jesse, Larissa G. Pinto, Joao B. T. Rocha,  
Cristina W. Nogueira\*

*Aceito na Revista Brain Research*

**Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice**

Lucieli Savegnago, Cristiano R. Jesse, Larissa G. Pinto, Joao B. T. Rocha,  
Cristina W. Nogueira\*

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

Abbreviated title: Diphenyl diselenide exerts antinociceptive properties

number of text pages: 17

number of figures: 06

number of tables: 00

\*Correspondence should be sent to:

Cristina Nogueira

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

Phone: 55-55-32208140

FAX: 55-55-32208978

E-mail: [criswn@quimica.ufsm.br](mailto:criswn@quimica.ufsm.br)



**Abstract**

Experiments were designed to address whether diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> has antiallodynic and antihyperalgesic properties. The neuropathic pain was caused by a partial tying (2/3) of sciatic nerve and the inflammatory pain was induced by an intraplantar (i.pl.) injection of 20 µl of Freund's Complete Adjuvant (CFA) in mice. Seven days after sciatic nerve constriction and 24 h after CFA intra-plantar (i.pl.) injection, mouse pain threshold was evaluated through tactile allodynia, using Von Frey Hair (VHF) filaments. The acute thermal hyperalgesia was induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), bradykinin (BK) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and the nociceptive response was assessed using hot-plate test. (PhSe)<sub>2</sub> administered by oral route (p.o.) (10 mg/kg) decreased the paw withdrawal response on the ipsilateral side of the partial sciatic nerve ligation 30 min after drug administration (64 ± 7%) and this effect was kept for 1h after treatment. (PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg, p.o.) produced a reduction in mechanical allodynia induced by CFA started 30 min after (PhSe)<sub>2</sub> administration (71 ± 5%) and this effect was maintained for up 4 hours. (PhSe)<sub>2</sub> (0.1 – 50 mg/Kg, p.o.) caused a significant inhibition of glutamate-, NMDA-, BK- (PGE<sub>2</sub>)- induced acute thermal hyperalgesia in mice. Together, the present results indicate that (PhSe)<sub>2</sub> produces systemic anti-allodynic action when assessed in mechanical stimulus (VHF) in the hindpaw and also attenuates acute thermal hyperalgesia. Thus, this compound might be potentially interesting in the development of new clinically relevant drugs for the management of pain.

*Key words:* selenium, diphenyl diselenide, neuropathic pain, inflammatory pain, hyperalgesia

## 1. Introduction

Pain is a condition that will affect everyone at some point in their lifetime. For most of us, the pain has been temporary. However, for patients with pathological pain, the hurt experience is unending, with little hope for therapeutic relief. On a coarse scale, four major forms of pain can be distinguished. The nociceptive pain (physiological pain) requires intense, high-threshold stimulation and is typically transient, pathological pain (clinical pain), associated with inflammation of peripheral tissue that arises from the initial damage (inflammatory pain) or from lesions to the nervous system (neuropathic pain), is often persistent (Woolf and Mannion, 1999; Zimmermann, 2001; Ji and Strichartz, 2004). Although considerable effort has been devoted to understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in the genesis of acute and chronic pain syndromes, there is not much improvement observed. Because of these, there has a global interest to develop safer and more effective drugs to treat of pain.

Taking this into account, our group of research has reported the powerful antiinflammatory and antinociceptive activities of diphenyl diselenide, an organoselenium compound (Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007a). We recent demonstrated that the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide on the peripheral sites have been mainly attributed to its interaction with redox modulatory sites of glutamate receptors, nitrergic system and protein kinase C (PKC) (Savegnago et al., 2007a). Additionally, data from our group have shown that diphenyl diselenide elicits antiinflammatory effect when assessed in models of inflammation in rats such as carrageenin-, arachidonic acid-induced paw oedema

(Nogueira et al., 2003). Interestingly, there are no data reporting the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide on the central sites.

Moreover, this compound is also known by its antioxidant, neuroprotective, anti-hyperglycemic, hepatoprotective, antidepressant-like and anti-ulcer actions (Rossato et al., 2002; Santos et al., 2006; Borges et al., 2006; Savegnago et al., 2006; Barbosa et al., 2006, Savegnago et al., 2007b).

Considering the previous findings reporting that diphenyl diselenide has antiinflammatory and antinociceptive properties, we might suggest this compound as a good candidate for relieve of neuropathic and inflammatory pain and acute thermal hyperalgesia. In this concern, the present study was designed to determine whether diphenyl diselenide has oral anti-allodynic property in two models of persistent pain, the inflammatory pain caused by Complete Freund's Adjuvant (CFA) and the neurophatic pain caused by partial ligation of the sciatic nerve. Additionally, we evaluated antihyperalgesic effects of diphenyl diselenide in a model of acute thermal hyperalgesia using hot-plate test.

## **2. Results**

To evaluate the effect caused by diphenyl diselenide on neurophatic pain model, we made a partial sciatic nerve ligation in mice. This injury produced a marked development of allodynia on the ipsilateral side seven days after nerve injury procedure (Fig. 1). The acute treatment with diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) significantly decreased the paw withdrawal response on the ipsilateral side of the partial sciatic nerve ligation 30 min after drug administration ( $64 \pm 7\%$ ) and this effect was kept for 1 h after diphenyl diselenide treatment (Fig. 1).

We also investigated the effect caused by diphenyl diselenide on inflammatory pain model, through immunological reaction induced by i.pl. injection of CFA. The i.pl. injection of CFA produced a profound mechanical allodynia, which were kept during all test. The animals that received diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) demonstrated a reduction on mechanical allodynia induced by CFA. This hypersensitivity reduction started 30 min after diphenyl diselenide administration ( $71 \pm 5\%$ ) and was maintained for up 4 hours (Fig. 2).

The results of fig.3A show that diphenyl diselenide (10 and 50 mg/Kg, p.o.) caused a significant inhibition of glutamate (100 nmol/site) induced acute thermal hyperalgesia in mice. The  $\Delta$  latency (%) value caused by glutamate was - 43.5 and mice treated with diphenyl diselenide 10 and 50 mg/Kg by oral route presented values of  $\Delta$  latency (%) of - 13.5 and - 5.0 respectively. The calculated mean  $ID_{50}$  value (and its respective 95% confidence limits) was 1.22 (0.3 - 5) mg/kg.

As can be seen in fig. 3B, the acute hyperalgesic effect caused by NMDA (1ng/site) was significantly inhibited by diphenyl diselenide at the doses of 1, 10 and 50 mg/kg, the mean  $ID_{50}$  value (and its respective 95% confidence limits) was 8.35 (2.2 - 31.1) mg/kg. The  $\Delta$  latency (%) value of NMDA was - 35.9 and mice treated with diphenyl diselenide 1, 10 and 50 mg/Kg presented values of  $\Delta$  latency (%) of - 17, -7 and - 4, respectively.

In addition, the hyperalgesia induced by intra-techal administration of  $PGE_2$  (0.3  $\mu$ g/site) was significantly inhibited by diphenyl diselenide (1 and 10 mg/kg, p.o.) with a mean  $ID_{50}$  value (and its respective 95% confidence limits) was 4.81 (2.0 - 11.4) mg/kg. The  $\Delta$  latency (%) value of  $PGE_2$  was - 38 and mice treated with diphenyl diselenide 1 and 10 mg/Kg presented values of  $\Delta$  latency (%) of - 16 and - 10, respectively (Fig. 3C).

Moreover, oral administration (by gavage) of diphenyl diselenide (1 and 10 mg/kg, p.o.) significantly reduced the duration of nociceptive response induced by i.t injection of bradykinin (5 nmol/site), the calculated mean ID<sub>50</sub> value (and its respective 95% confidence limits) was 1.39 (0.5 - 3.2) mg/Kg. The  $\Delta$  latency (%) value of bradykinin was - 39 and mice treated with diphenyl diselenide 1 and 10 mg/Kg presented values of  $\Delta$  latency (%) of - 11 and - 2, respectively (Fig. 3D).

### 3. Discussion

This study presents, for the first time, that diphenyl diselenide orally administered attenuates acute thermal hyperalgesia and inhibits of tactile allodynia induced by both persistent pain models: sciatic nerve partial constriction and chemical ACF-induced inflammation in mice.

Peripheral injection of CFA or sciatic nerve partial constriction causes persistent pain, which leads to the release of multiple inflammatory and nociceptive mediators. These mediators increase long-lasting discharge of primary sensory fibers that modifies neuronal, neuro-glial and neuro-immune cell phenotype and function in the central nervous system. These alterations can occur at translational or post-translational levels and achieve receptors, ion channels, soluble mediators and molecules played in cell signalling (Woolf and Mannion, 1999; Ji and Strichartz, 2004; Li et al., 2005). Therefore, we can speculate that effects caused by diphenyl diselenide on the nerve injury and CFA-induced inflammation are probably associated to its possible ability to interfere in cell signalling, particularly that related to PKC and NO. This assertion is supported by the fact that antinociceptive action

caused by diphenyl diselenide in models of acute pain is related to PKC and L-arginine -nitric oxide pathways (Savegnago et al., 2007a).

Another interesting finding in the present study is the demonstration that acute thermal hyperalgesia induced by glutamate, NMDA, bradykinin and PGE<sub>2</sub> in the hot-plate test was significantly attenuated by oral injection of diphenyl diselenide. Hyperalgesia is a complex cascade of events, which induces the spinal release of substance P and glutamate causing activation of spinal neurokinins-1 and NMDA receptors. The activation of these receptors stimulated spinal phospholipases and cyclooxygenases activities leading to the synthesis and release of spinal prostanoids (Esbersberger et al., 1999). Moreover, Meller et al. (1996) have reported that the acute thermal hyperalgesia is produced by activation of PKC, NMDA and neuropeptides receptors, and production of NO. In fact, excitatory amino acids and neuropeptides play a crucial role in the transmission of pain signals in the spinal cord and their spinal applications elicit behaviors which resemble the hyperalgesia and allodynia that characterize several states of spinal hyperexcitability (central sensitization). In this context, recent study of our research group reported that antinociceptive action caused by diphenyl diselenide in models of acute pain is related to PKC, L-arginine - nitric oxide pathways and via interaction with redox modulatory sites of glutamate receptors (Savegnago et al., 2007a). Savegnago and collaborators (2007c) have also reported that antinociception caused by diphenyl diselenide at spinal sites involves NMDA receptors, peptidergic or vanilloid systems. Thus, based on these results, we can strongly suggest that antinociception induced by diphenyl diselenide may account for an inhibitory effect on the nociceptive transmission which is related to inflammatory mediators, such as prostaglandins, BK, excitatory amino acids, PKC and/or NO.

Collectively, these results support convincing evidence that diphenyl diselenide, an organoselenium compound, produces systemic anti-allodynic action in two models of persistent inflammatory (CFA-i.pl. injected) and neuropathic (sciatic nerve injured) pain, when assessed in mechanical stimulus (VHF) in the hindpaw. Besides, diphenyl diselenide attenuates acute hyperalgesia induced by glutamate, NMDA, bradykinin and PGE<sub>2</sub> in mice. The beneficial effects of diphenyl diselenide seem to involve molecular mechanisms such as the inhibition of PKC and NO cell signalling, and inflammatory mediators, such as prostaglandins, bradykinin and excitatory amino acids. Together, the present results indicate that diphenyl diselenide might be of potential interest in the development of new clinically relevant drugs for the management of pain. Additional studies are, however, necessary to confirm this hypothesis.

#### **4. Experimental procedures**

##### **4.1 Animals**

Male Swiss mice (25 - 35g) maintained at 22–25°C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00). The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

#### **4.2 Intrathecal (i.t.) injection**

I.t. injections were made in conscious mice using the method described by Hylden and Wilcox (1980). The lumbar puncture was made through the intact skin between the lumbar 5 and lumbar 6 vertebra, using a 30-gauge needle connected to a 25-ml Hamilton syringe with polyethylene tubing, and a volume of 5  $\mu$ l of vehicle (phosphate buffer saline: PBS; mmol/l: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer 10) or drugs was injected. Injections were given over a period of 5 s. The accurate placement of the needle was evidenced by a quick “flick” of the mouse’s tail.

#### **4.3 Mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury**

To evaluate (PhSe)<sub>2</sub> effects on neuropathic pain model, we made a partial sciatic nerve ligation in mice. To this end, mice were anaesthetized with 7% chloral hydrate (6 ml/kg, i.p.). A partial ligation of the sciatic nerve was performed by tying the distal (2/3) of the sciatic nerve, according to the procedure described for rats (Seltzer et al, 1990) and adapted to mice (Malmberg and Basbaum, 1998).

The mechanical allodynia was measured as described before (Bortolanza et al., 2002). Mice were further acclimatized in individual clear Plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the ventral surface of the hind paw. To assess the nerve injury in each animal, basal withdrawal response frequency of the right hindpaw was measured following 10 applications (duration of 1 s each) of 0.6g von Frey hair Filaments (VFH, Stoelting, Chicago, USA), that produces a mean withdrawal frequency of about 15%, which is considered to be an



adequate value for the measurement of mechanical allodynia. The mice that presented mean withdrawal frequency >15% were excluded of the study. After this selection, the animals were operated and the development of injury to the sciatic nerve was verified after seven days of surgery, as the withdrawal response frequency of the right hindpaw following 10 applications (duration of 1 s each) of 0.6 g von Frey hairs. The animals that produced a mean withdrawal of the right hindpaw frequency of about 70% were considered adequate for this experiment. Mice with injured nerve did not present paw drooping or autotomy. Therefore, mice that presented injury in the sciatic nerve received vehicle or compound (10 mg/kg; p.o.) and the withdrawal response frequency was recorded after (0.5, 1, 2, 4, and 6 h) diphenyl diselenide treatment. In sham-operated mice, the nerve was exposed using the same procedure, but without ligation. The frequency of withdrawal was determined before nerve injury (baseline), in order to obtain data purely derived from nerve injury-induced allodynia.

#### **4.4 CFA-induced inflammation and mechanical allodynia**

We also investigated the effect caused by (PhSe)<sub>2</sub> on inflammatory pain model, through immunologic reaction induced by intraplantar (i.pl.) injection of CFA-complete Freund's adjuvant. Briefly, mice were lightly anaesthetized with ether (by inhalation) and received 20 µL of CFA (1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannide monooleate) subcutaneously in the intraplantar surface of the right hind paw.

The mechanical allodynia was measured as described by Bortolanza et al., 2002 and detailed in 4.3. section. Excepting that, the inflammatory response was

verified 24 hours after CFA injection in the intraplantar surface of the right hind paw in mice. Therefore, mice that presented allodynia received vehicle or compound (10 mg/kg; p.o.) and the withdrawal response frequency in VHF was recorded after (0.5, 1, 2, 4, and 6 h) diphenyl diselenide treatment. The frequency of withdrawal was determined before (baseline) CFA injection, in order to obtain data purely derived from the treatments in CFA allodynia.

#### 4.5 Acute thermal hyperalgesia

The acute thermal hyperalgesia response was assessed using hot-plate test (Ugo Basile, model-DS 37) maintained at  $50 \pm 1^\circ \text{C}$ . Animals were placed in a glass cylinder of 24-cm diameter on the heated surface, and the time between placement and shaking or licking of the paws, or jumping, were recorded as the index of response latency. A cut-off of 45 s was used to prevent paw damage. Each animal was tested before administration of drugs in order to obtain baseline. Mice received  $(\text{PhSe})_2$  (p.o.) (dose range: 0.1 – 50 mg/Kg) 30 min before i.t. injection of 5  $\mu\text{l}$  of glutamate (an excitatory amino acid, 100 nmol/site), NMDA (a selective agonist of NMDA-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 1 ng/site), bradykinin (BK; 5 nmol/site) and prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ; 0.3  $\mu\text{g}/\text{site}$ ). Following i.t. injections of each agonist the nociceptive response was measured at 5, 15, 10 and 15 min after glutamate, NMDA, BK and  $\text{PGE}_2$ , respectively. Thermal withdrawal latencies are expressed as a percentage difference from time 0 (pre-drug) according to the formula:

$$\Delta \text{ latency (\%)} = \frac{\text{postdrug} - \text{baseline}}{\text{baseline}} \times 100$$

The  $\Delta$  latency (%) was estimated for each mouse. The doses of each agonist used in the hot plate test were based on Ferreira et al. (1999), Menéndez et al (2002) and Santos et al. (2005).

#### 4.6 Drugs

The following substances were used: L-glutamic acid hydrochloride (glutamate), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), Freund's complete adjuvant (CFA), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and bradikinin (Sigma, St. Louis, USA).

Diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described (Paulmier, 1986). Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (99.9%) was determined by GC/HPLC. Diphenyl was dissolved in canola oil and administered by gavage [oral route (p.o.)]. The mice received diphenyl diselenide in a constant volume of 10 ml/kg body weight.

#### 4.7 Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., except the ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of diphenyl diselenide necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID<sub>50</sub> value was determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Comparisons between experimental and

control groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' test when appropriated. *P* values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered as indicative of significance.

### **Acknowledgements**

The financial support by UFSM (FIPE), FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. J.B.T.R., L.S., C.R.J. and C.W.N. are the recipients of CNPq fellowships.

### **References**

- Barbosa, N.B.C., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemical Biological Interactions* 163, 230 - 238.
- Borges, L.P., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2006. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chemical Biological Interactions* 160, 99 - 107.
- Bortolanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology* 453, 203 - 208.
- Esbersberger, A., Grubb, B.D., Willingale, H.I., Gardiner, N.J., Nebe, I., Schaible, H.G., 1999. The intraspinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> in a model of acute arthritis

- is accompanied by an up-regulation of cyclooxygenases-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93, 1080 - 1087.
- Ferreira, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-Cgmp pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38, 835 - 842.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *European Journal of Pharmacology* 67, 313 - 316.
- Ji, R.R., Strichartz, G., 2004. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. *Science* 252, 1-19.
- Li, M., Shi, J., Tang, J., Chen, D., Ai, B., Chen, J., Wang, L., Cao, F., Li, L., Lin, C., Guan, X., 2005. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1 $\beta$  and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. *Acta Pharmacol Sin.* 26, 192 -198.
- Malmberg, A.B., Basbaum, A.I., 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76, 215 - 222.
- Meller, S. T., Dykstra, C., Gebhart, G. F., 1996. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase c and production of nitric oxide. *Neuroscience* 71, 327 - 335.
- Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., 2002. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods* 113, 91 - 97.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflammation Research* 52, 56 - 63.

- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups, In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1 ed. Pergamon Press, Oxford, 25–51.
- Rossato, J.I., Ketzer, L.A., Centuriao, F.B., Silva, S.J.N., Lüdtkke,D.S., Zeni, G. Braga, A.L., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T., 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research* 27, 297- 303.
- Santos, A.R.S., Trentin, A.P., Ferreira, J., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2003. Mechanisms involved in the antinociceptive caused by compound MV8612 isolated from *Mandevilla velutina* in mice. *Brain Research* 96, 269 - 276.
- Santos, F.W., Graca, D.L., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Weis, S. N., Favero, A. M., Nogueira, C.W., 2006. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reproductive Toxicology* 22, 546 - 550.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Zeni, G., 2006. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 86 - 92.
- Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J. B.T., Nogueira, C. W. Zeni, G., 2007a. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* 555, 129 - 138.
- Savegnago, L., Jesse, C. R., Pinto, L. G., Rocha, J. B.T., Nogueira, C. W. Zeni, G., 2007b. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Progress Neuro-Psichopharmacology & Biological Psychiatry*, *in press*.

Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Rocha, J. B.T., Nogueira, C. W. Zeni, G., 2007c. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. *Brain Research*, *in press*.

Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. *Pain* 43, 205 - 218.

Woolf, C., Mannion, R., 1999. Neuropathic pain, *The Lancet* 354, 953 - 954.

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

Zimmermann, M., 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal Pharmacology* 429, 23 - 37.

## Legends

**Fig.1.** Effect of diphenyl diselenide administered orally (10 mg/kg) on mechanical allodynia induced by sciatic nerve injury in response to 10 applications of 0.6 g VFH. The assessment was carried out in mice sham-operated (◆), operated and treated with vehicle (▲) operated and treated with diphenyl diselenide (●). The baseline (■) was recorded before nerve injury. The results represent the mean  $\pm$  S.E.M. of eight animals. The symbols denote significant difference  $*p < 0.05$  between operated mice plus vehicle and operated mice plus diphenyl diselenide by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test.

**Fig.2.** Effect of diphenyl diselenide administered orally (10 mg/kg) on mechanical allodynia in response to 10 applications of 0.6 g VFH induced by CFA in mice. The animals received vehicle (●) or diphenyl diselenide (Δ) 24h after CFA injection. The

baseline ( $\square$ ) was recorded before CFA injection. The measure following was 24 hours after ACF-injection (0) and (0.5, 1, 2, 4, 6h) subsequent to diphenyl diselenide (10 mg/kg, p.o.) treatment. The results represent the mean  $\pm$  S.E.M. of eight animals. The symbols denote significant difference \*\*\* $p < 0.001$  and \* $p < 0.05$  between vehicle treated and diphenyl diselenide treated mice by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test.

**Fig.3.** Effect of diphenyl diselenide administered orally (0.1 - 50 mg/Kg) on the glutamate (100 nmol/site, panel A)-, NMDA (1ng/site, panel B)-, PGE<sub>2</sub> (0.3  $\mu$ g/site, panel C) or BK (5 nmol/site, panel D)- induced nociceptive response in mice. The changes in thermal withdrawal latencies are represented on the y-axis as percentage change calculated by the formula (trial latency – baseline latency)/ (baseline latency) x 100 expressed as a percentage. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for six to eight animals. PBS means phosphate buffer saline. Asterisks denote the significance levels \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the control group values (C) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).



Fig. 1

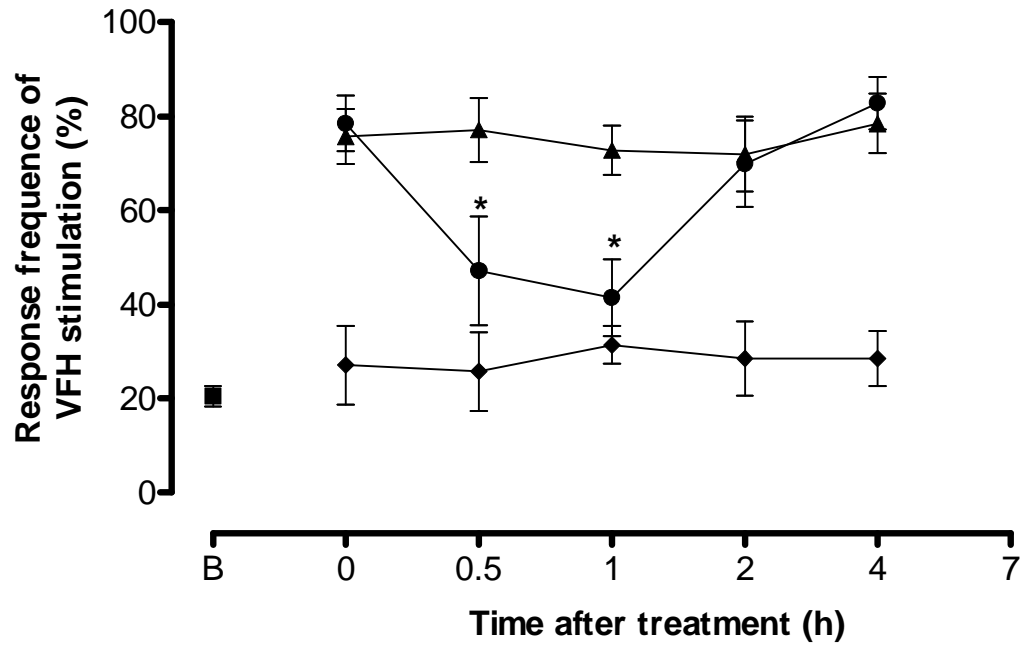


Fig. 2.

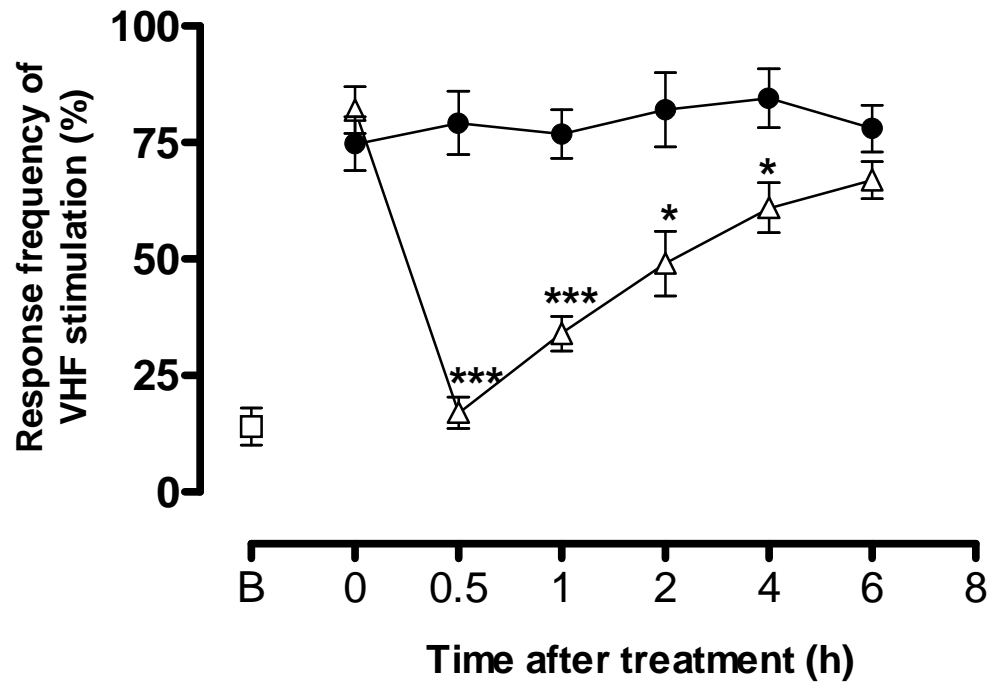
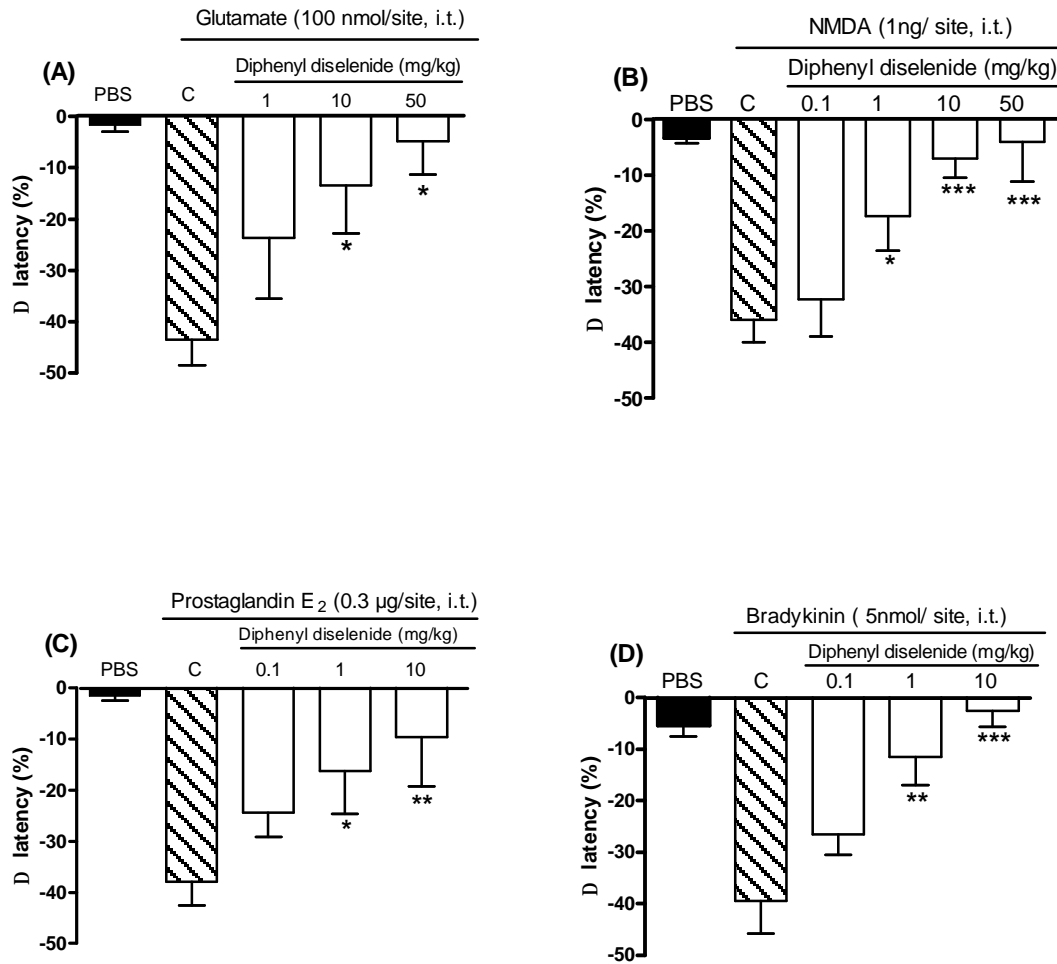


Fig. 3.



## 5- DISCUSSÃO

O interesse em identificar novos alvos para o tratamento da dor tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Apesar dos avanços recentes ocorridos na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da dor, as terapias disponíveis atualmente possuem apenas resultados parciais e a maior parte das drogas analgésicas apresenta importantes efeitos colaterais, o que dificulta o uso contínuo. Diante deste contexto, vários modelos de nocicepção em animais de laboratório têm sido propostos, a fim de avaliar a ação antinociceptiva de várias drogas. No entanto, de maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como sua simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos. Deve-se ressaltar ainda, que os modelos de dor inflamatória e neuropática podem ser extremamente úteis para a identificação de drogas potentes e efetivas, que possam vir a ser utilizadas na clínica (Walker et al., 1999).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a administração sistêmica, pela via oral, do disseleneto de difenila apresentou baixa toxicidade e produziu efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios nos diferentes modelos de nocicepção e inflamação em camundongos.

Os resultados obtidos no ARTIGO 1 indicaram que o disseleneto de difenila quando administrado pela via oral, pois apresentou mínimos efeitos toxicológicos e causou antinocicepção em vários modelos de dor em camundongos. A ausência de toxicidade do disseleneto de difenila, administrado pela via oral, foi evidenciada pelo índice de mortalidade, de fato, a  $DL_{50}$  obtida foi  $> 312$  mg/Kg (ou  $1000$   $\mu$ mol/Kg). Embora, a administração desse composto, não tenha alterado os parâmetros hepáticos (AST e ALT) e renais (uréia e creatinina) dos animais, o ganho de peso dos camundongos foi reduzido, o qual pode indicar toxicidade sistêmica.

Neste estudo, foi demonstrado que a administração oral do disseleneto de difenila causou uma inibição significativa nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. O efeito antinociceptivo do disseleneto oral iniciou 30 minutos após sua administração e permaneceu por duas horas (dados não mostrados). O modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral,

sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (Collier et al., 1968). Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátion não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias (Julius e Basbaum, 2001). Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como PG, BK, SP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 entre outros (Collier et al., 1968; Vinegar et al., 1979; Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001), os quais estimulam neurônios aferentes primários, aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cerebroespinal (Feng et al., 2003).

Com o intuito de avaliar o efeito do disseleneto de difenila frente a diferentes estímulos nociceptivos, foi utilizado como modelo de nocicepção térmica, o teste da imersão da cauda a 55 °C (Tail-immersion). Os nossos dados mostram claramente que o disseleneto de difenila foi capaz de aumentar a latência dos animais ao estímulo térmico, mas, esse efeito não foi prevenido pelo naloxona. Isso demonstra que não há envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo causado pelo disseleneto de difenila no teste da imersão da cauda a 55 °C. Este modelo é verdadeiramente eficiente para prever o efeito analgésico em humanos (Grumbach, 1966).

Outro fato interessante do presente estudo (ARTIGO 1) foi a demonstração que o disseleneto de difenila administrado pela via oral, causou redução significativa da nocicepção neurogênica induzida pela ativação de receptores vanilóides por utilização da capsaicina na pata de camundongos (Caterina e Julius, 2001). A capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) é uma substância álgica obtida da pimenta vermelha, "*chilli pepper*", disponível como ferramenta farmacológica para o estudo dos subtipos de fibras sensoriais primárias do tipo C e A $\delta$ , incluindo os nociceptores polimodais e termocetores (Holzer, 1991; Jancso, 1992). Além disso, tem sido proposto que a nocicepção induzida pela capsaicina é mediada pela ativação de seu receptor específico, conhecido como receptor vanilóide (VR) (TRPV1), um canal catiônico não seletivo ativado por ligante encontrado em neurônios sensoriais primários e a ativação deste receptor induz a despolarização da membrana com aumento do influxo de cátions, levando ao estímulo nocivo (Julius e Basbaum, 2001; Szallasi e Blumberg, 1993; Caterina et al., 1997). Estudos têm demonstrado que a capsaicina libera neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, NO

e outros mediadores pró-inflamatórios a partir das fibras C, transmitindo a informação nociceptiva aos neurônios do corno dorsal, sendo que a sensibilização central, ocorre, entre outros meios, através da ativação de proteínas quinase A e C (Calixto et al., 2005). Além disso, inibidores de PKC previnem a fosforilação do TRPV1, reduzindo a sensibilização deste receptor, tornando-o menos responsivo à ação do agonista (Prekumar e Ahern, 2000, Ferreira et al., 2004, Calixto et al., 2005). Corroborando com isso, os resultados do presente estudo também sugerem o envolvimento da PKC na ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila. Isto se deve ao fato que a administração sistêmica do disseleneto de difenila inibiu eficientemente a nocicepção e o edema induzido pela administração i.pl. de PMA (ativador de PKC) e da bradicinina (BK). Estudos prévios sugerem que a BK, ao se ligar nos seus receptores leva a uma ativação direta da PKC, porém, indireta da PKA, sendo esta última, ativada após a síntese de prostaglandinas, a qual acontece em decorrência da ativação de PKC (Ferreira et al., 2004).

Nossos resultados também evidenciaram o envolvimento do sistema glutamatérgico na antinocicepção causada pelo disseleneto de difenila. De fato, a administração oral do disseleneto de difenila produziu uma inibição significativa no tempo de lambida e no edema causado pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. A nocicepção induzida pelo glutamato parece envolver sítios de ação periférica, espinhal e supra-espinhal. Além disso, a ação do glutamato sobre seus receptores aumenta a produção de NO e substâncias relacionadas à ativação deste mediador (Beirith et al., 2002). Somando-se a isso, a administração local de disseleneto de difenila induziu antinocicepção e inibiu a formação de edema quando co-injetado com glutamato na pata de camundongos. De acordo com esses resultados, nosso grupo anteriormente demonstrou que o disseleneto de difenila causou efeito antinociceptivo local na segunda fase do teste da formalina (Zasso et al., 2005) em camundongos.

Outro objetivo do ARTIGO 1 foi demonstrar os mecanismos pelos quais o disseleneto de difenila exerce antinocicepção local. O presente estudo confirmou que a via da L-arginina-óxido nítrico está envolvida na ação antinociceptiva local do disseleneto de difenila. Esta conclusão deriva do fato que o pré-tratamento dos animais com o substrato para a NOS, a L-arginina, em uma dose na qual não produziu nenhum efeito *per se* no modelo do glutamato, mas que reverte significativamente a antinocicepção causada pelo inibidor da sintase do NO, L-

NAME, também inibiu significativamente a atividade antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila. Por isso, considerando esses resultados pode-se sugerir que o disseleneto de difenila exerce seu efeito antinociceptivo local, provavelmente por inibir a atividade da NOS. Alguns estudos sugerem que o óxido nítrico aumenta a síntese e/ou a liberação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas, as EROs e os prostanóides, o que resulta na formação de uma reposta inflamatória. Além disso, a liberação periférica de NO contribui para o desenvolvimento do edema e da hiperalgesia no tecido lesado com inflamação (Marcinkiewicz et al., 1995; Sautebin et al., 1995; Peana et al., 2006).

Além do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico, a ação antinociceptiva local causada pelo disseleneto de difenila parece também envolver uma interação com os sítios redox modulatórios dos receptores glutamatérgicos, principalmente o receptor NMDA. Essa conclusão deriva do fato de que, o pré-tratamento dos animais com o DTT, um agente redutor, preveniu significativamente a antinocicepção local causada pelo DTNB, um agente oxidante, e pelo disseleneto de difenila no teste da injeção de glutamato na pata de camundongos. Neste contexto, Reynolds et al (1990) elucidaram que agentes redutores potencializam o aumento de cálcio induzido pelo receptor NMDA, e esse efeito é bloqueado pelo DTNB. De fato, a função do receptor NMDA é altamente regulada por vários sítios incluindo o sítio redox (Rock e McDonald, 1995; Laughlin et al, 1998). Portanto, esses resultados indicam que o disseleneto de difenila causou antinocicepção local por atuar modulando os receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA e inibindo a sintase do óxido nítrico (ARTIGO 1).

Observando os resultados do ARTIGO 1 surgiu a seguinte questão: será que o disseleneto de difenila pode exercer seu efeito antinociceptivo por interagir com o sistema nervoso central? Baseando-se nessa hipótese desenvolveu-se o ARTIGO 2.

Segundo os resultados obtidos nesse artigo (ARTIGO 2) a administração oral do disseleneto de difenila foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato (agonista não seletivo de receptores glutamatérgicos) e do NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA). Porém, o disseleneto de difenila não inibiu a nocicepção induzida pelo AMPA e cainato (agonistas seletivos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA e cainato) e pelo trans-ACPD (agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos). Esses resultados

confirmam que a atividade antinociceptiva do disseleneto de difenila ocorre em nível central e mostram que os receptores NMDA, em nível espinhal, estão envolvidos no efeito antinociceptivo desse composto. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no artigo 1, que demonstram que o disseleneto de difenila induz antinocicepção local via interação com os sítios modulatórios de receptores glutamatérgicos, principalmente NMDA. Portanto, tendo em vista os dados obtidos no ARTIGO 1, em conjunto com o presente resultado, pode-se sugerir fortemente que a ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila depende de sua seletiva interação com o receptor NMDA. Somando-se a isso, o tratamento prévio com disseleneto de difenila administrado pela via oral inibiu eficientemente a nocicepção induzida pela administração i.t. da SP e capsaicina. De fato, a SP, capsaicina e glutamato interagem sinergisticamente durante a ativação de neurônios sensoriais no corno dorsal da medula para processarem a sensação de dor, a qual acontece, dentre outros mecanismos, através da produção de NO (Sakurada et al., 1996; Liu e Sandkuhler, 1997; Caruso et al., 2005).

Outro importante resultado obtido nesse artigo, foi a demonstração que o disseleneto de difenila reduziu significativamente a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal da bradicinina. Esses resultados, juntamente com os obtidos no artigo 1, sugerem a participação da PKC na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila.

No ARTIGO 2, também foi demonstrado que a administração oral do disseleneto de difenila produziu inibição sobre o comportamento de “biting” causado pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). Interessante, está bem estabelecido que a ligação da IL-1 $\beta$  ao seu receptor IL-1RI ativa a PKC independentemente de cálcio (Obreja et al., 2002), efeito o que justifica a ação inibitória do disseleneto de difenila sobre a nocicepção induzida pela IL-1 $\beta$ . O disseleneto de difenila também inibiu nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- $\alpha$ . Schäfers e colaboradores (2003) descrevem que a nocicepção induzida pelo TNF- $\alpha$  envolve a fosforilação de MAPKs como a p38. De acordo com estes resultados, o efeito antinociceptivo obtido pelo disseleneto de difenila pode estar associado a um decréscimo na fosforilação das MAPKs.

Portanto, com base nos resultados obtidos no artigo 2, conclui-se que o disseleneto de difenila pode exercer sua ação antinociceptiva por interagir com o



sistema nervoso central modulando de forma direta ou indireta o sistema glutamatérgico, os receptores vanilóides e os peptidérgicos e as citocinas pró-inflamatórias

Tendo em vista os resultados do ARTIGO 2, no qual o disseleneto de difenila administrado pela via oral exerce efeito antinociceptivo por modular alguns sistemas em nível central, sentiu-se a necessidade de investigar outros mecanismos centrais que podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo do disseleneto de difenila. Dessa forma, desenvolveu-se o ARTIGO 3.

Os resultados obtidos no artigo 3 demonstraram que o disseleneto de difenila, quando administrado pela via oral, foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção de origem neurogênica e inflamatória causada pela injeção i.pl. de formalina. Porém, o disseleneto de difenila foi mais efetivo em inibir a dor de origem inflamatória do que a de origem neurogênica. Estas observações estão de acordo com dados prévios obtidos no nosso laboratório (Nogueira et al., 2003, Zasso et al., 2005). A dor de origem neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto a dor de origem inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e mecanismos de sensibilização central na medula espinhal (Hunskar e Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992). Tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores produz aumento significativo nos níveis espinais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, taquicininas, PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico, cininas e outros peptídeos (Tjølsen et al., 1992; Malmberg e Yaksh 1995, Santos e Calixto, 1997). Além disso, a administração sistêmica, espinhal e supraespinhal de antagonistas dos receptores NMDA, inibidores da NOS, antagonistas de receptores para as cininas, opióides, agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos e anti-inflamatórios não-esteroidais foram eficazes em inibir a nocicepção induzida pela formalina (Tjølsen et al., 1992; Malmberg e Yaksh, 1993, 1995; Moore et al., 1993; Chaplan et al., 1997; Sawamura et al., 1999; Santos e Calixto, 1997). Adicionalmente, o disseleneto de difenila inibiu o edema causado pela injeção i.pl. de formalina, confirmando assim que o disseleneto de difenila foi mais efetivo em inibir a dor de origem inflamatória.

Os resultados do ARTIGO 3 também demonstraram que a disseleneto de difenila causou não apenas efeito profilático (tratamento antes do estímulo nocivo), mas também efeito terapêutico (administrada depois da injeção de formalina) neste modelo de nocicepção. Uma possível explicação para tal efeito vem do fato que, o

disseleneto de difenila por ser lipossolúvel alcança rapidamente o SNC, modulando assim a dor inflamatória causada pela injeção de formalina via neurônios aferentes do tipo C. Assim, estes resultados fornecem dados adicionais para uma possível aplicação do disseleneto de difenila no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das dores inflamatórias.

O presente artigo também demonstrou que não há participação da proteína Gi/o na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila, isso é confirmado pelo fato que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis, em dose capaz de inibir a proteína Gi/o, não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo causado pelo disseleneto de difenila no modelo da formalina em camundongos. Dados da literatura mostram claramente que toxina pertussis causa inativação da proteína Gi/o por ribosilação da sua subunidade catalítica (De Bock et al., 2003; Wen et al., 2003; Savinainen e Laitinen, 2004). A ativação da proteína Gi/o esta associada ao bloqueio dos canais de cálcio dependente de voltagem e ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal (Pertwee, 1999; Schultz e Gross, 2001).

Nos últimos anos, estudos na literatura têm dado destaque à importância dos canais de cálcio dependente de voltagem (CCDVs) no controle e transmissão da dor (Saegusa et al., 2002). Além disso, bloqueadores de diferentes tipos de CCDVs foram eficazes em inibir a nocicepção em modelos de dor inflamatória e neuropática (Vanegas e Schaible, 2000; Saegusa et al., 2001; 2002). O influxo de íons  $Ca^{2+}$  através dos CCDVs, controla inúmeras funções celulares, pois é capaz de converter sinais elétricos em sinais bioquímicos intracelulares responsáveis pelo controle de inúmeras atividades neuronais, tais como a liberação de neurotransmissores, a modulação da excitabilidade da membrana, a ativação de proteínas intracelulares e expressão gênica (Hofmann et al., 1999; Catterall, 2000; Ward, 2004). Desta forma, este íon é um dos principais envolvidos na transmissão nociceptiva (Prado, 2001; Cervero e Laird, 2003) e drogas que evitam essa transmissão possuem efeito antinociceptivo. Neste sentido, o presente estudo confirmou que os canais de cálcio estão envolvidos, pelo menos em parte, na ação antinociceptiva induzida pelo disseleneto de difenila, pois o pré-tratamento dos animais com cloreto de cálcio foi capaz de prevenir a antinocicepção induzida pelo disseleneto de difenila em ambas as fases do teste da formalina. Esses dados são fortalecidos com os resultados que demonstram a ação antinociceptiva causada pelo disseleneto de difenila na

nociceção induzida pelo TNF- $\alpha$  (artigo 2), uma vez que, o TNF- $\alpha$  causa mobilização de Ca<sup>2+</sup> em cultura de neurônios sensoriais e substâncias que inibem a nociceção induzida pelo TNF- $\alpha$ , pode ser devido a uma inibição dos canais de cálcio (Pollock et al., 2002). Somando-se a isso, no artigo 3, também foi elucidado a participação dos canais de K<sup>+</sup> no efeito antinociceptivo causado pelo disseleneto de difenila. Os resultados indicaram que o efeito antinociceptivo do disseleneto de difenila na segunda fase do teste de formalina foi prevenido pela injeção intratecal de TEA (bloqueador de diferentes tipos de canais de potássio, inclusive os dependentes de voltagem), de apamina (bloqueador de canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio) e de caribidotoxina (bloqueador de canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio), mas não foi revertido pela glibenclamida (bloqueador de canais de K<sup>+</sup> dependente de ATP). Desta forma, o efeito antinociceptivo causado pelo do disseleneto de difenila parece envolver abertura de canais de potássio e bloqueio dos canais de cálcio.

Além disso, os resultados apresentados no artigo 3 demonstraram evidências farmacológicas do envolvimento da via da L-arginina/óxido nítrico/GMPc no efeito antinociceptivo do disseleneto de difenila no teste da formalina. De fato, a administração de L-NOARG (inibidor da NOS), de azul de metileno e de ODQ (inibidores da guanilato ciclase) significativamente bloquearam a antinociceção causada pelo disseleneto de difenila, o que pode ser atribuído a ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc. Esses resultados foram surpreendentes, uma vez que no ARTIGO 1, a ação antinociceptiva local do disseleneto de difenila foi atribuída a inibição na formação do NO. Essa divergência pode estar relacionada à diferença no modelo de dor experimental, como também quanto do nível de NO tecidual, ao conteúdo intracelular de GMPc, as diferentes vias de administração e dosagens de drogas. Corroborando com isso, as ações antagônicas do NO em situações patológicas, como na dor, são atualmente, bem discutidas na literatura. Assim, coletivamente, os dados do artigo 3 sugerem a participação da via da L-arginina/óxido nítrico/cGMP e canais de Ca<sup>++</sup>/K<sup>+</sup> no efeito antinociceptivo causado pelo disseleneto de difenila no teste da formalina.

Considerando as atividades até aqui descritas para o disseleneto de difenila, o último objetivo dessa tese foi investigar uma possível ação deste composto sobre a nociceção crônica, uma vez que, esta última, se diferencia substancialmente da nociceção aguda em termos de persistência e alterações adaptativas (Besson,

1997; Woolf e Mannion, 1999; Zimmermann, 2001). Além disso, as drogas disponíveis até o momento com o intuito de aliviar as dores crônicas são efetivas somente em uma pequena parcela dos pacientes e grande parte delas apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais (Woolf e Mannion, 1999; Mendell e Sahenk, 2003).

O estudo da dor crônica tem sido amplamente investigado através do uso de animais de laboratório, os quais podem ser submetidos a lesões de nervo, tanto periférico, quanto central; estes modelos mimetizam a sensibilização e alterações plásticas ocorridas na dor neuropática (Zimmermann, 2001). Outro modelo de dor persistente consiste, por exemplo, em um modelo de dor inflamatória induzida pela administração periférica de agentes indutores de resposta imunológica como o ACF (*Mycobacterium tuberculosis* morta e ressuspensa em óleo mineral) (Larson et al., 1986).

Neste trabalho, a ligadura parcial de nervo ciático e a injeção i.pl. de ACF tornaram os animais hipersensíveis e responsivos frente a estímulos inócuos aos animais falso-operados ou não injetados (alodínia) (Seltzer et al., 1990). Apesar disso, o tratamento com disseleneto de difenila após sete dias da ligadura do nervo ou vinte quatro horas após a administração de ACF inibiu a alodínia tátil em ambos os modelos.

A dor persistente, resultante da injeção periférica de ACF ou da constrição parcial do nervo ciático, resulta em liberação de múltiplos mediadores inflamatórios e nociceptivos, causando um aumento na duração e intensidade do potencial de ação em fibras sensoriais primárias. Esta atividade leva a alterações no fenótipo de células neuronais, neurogliais e neuroimunes no SNC. Estas mudanças podem ocorrer em nível transcripcional ou pós transcripcional e atingem receptores, canais iônicos, mediadores solúveis e outras moléculas envolvidas na sinalização celular (Woolf e Mannion, 1999; Ji e Strichartz, 2004; Li et al., 2005). Além disso, a dor persistente de origem inflamatória apresenta mecanismos de sensibilização periférica e central, predominantemente distinto da dor persistente de origem neuropática (Scholz e Woolf, 2002). Yajima e colaboradores (2003) evidenciaram em seu estudo, papéis distintos da PKC e PKA na dor de origem inflamatória e neuropática em camundongos. Em outro trabalho realizado por Zhang et al (2003) observou-se o aumento na expressão de receptores canabinóides CB2 na medula espinhal em modelos de lesão nervosa, porém, não em modelos de inflamação

periférica persistente induzida pelo ACF, apontando novamente mecanismos distintos.

Neste contexto, o efeito causado pelo disseleneto de difenila contra a lesão do nervo e a inflamação induzida pelo ACF estão, provavelmente, associados à capacidade deste composto em interferir com a sinalização celular, particularmente, as vias relacionadas com PKC, PKA, NO,  $Ca^{2+}$  e  $K^+$ .

Nesse estudo foi também elucidado que o disseleneto de difenila atenua a hiperalgisia térmica induzida pelo glutamato, NMDA e BK. Esses dados estão de acordo com os artigos 1 e 2 que demonstram um envolvimento do sistema glutamatérgico e da PKC no efeito antinociceptivo causado pelo disseleneto de difenila em camundongos. Adicionalmente a esses resultados, pode-se sugerir o envolvimento da PKA na ação do disseleneto de difenila, uma vez que a administração sistêmica do disseleneto de difenila inibiu a hiperalgisia térmica causada pela injeção i.t. de  $PGE_2$ .

Em conclusão, o presente trabalho demonstra que o disseleneto de difenila causou atividade antinociceptiva e antiinflamatória quando avaliado em modelos de nocicepção aguda e crônica e alguns dos mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e antiinflamatória também foram elucidados e estão demonstrados na figura 7.

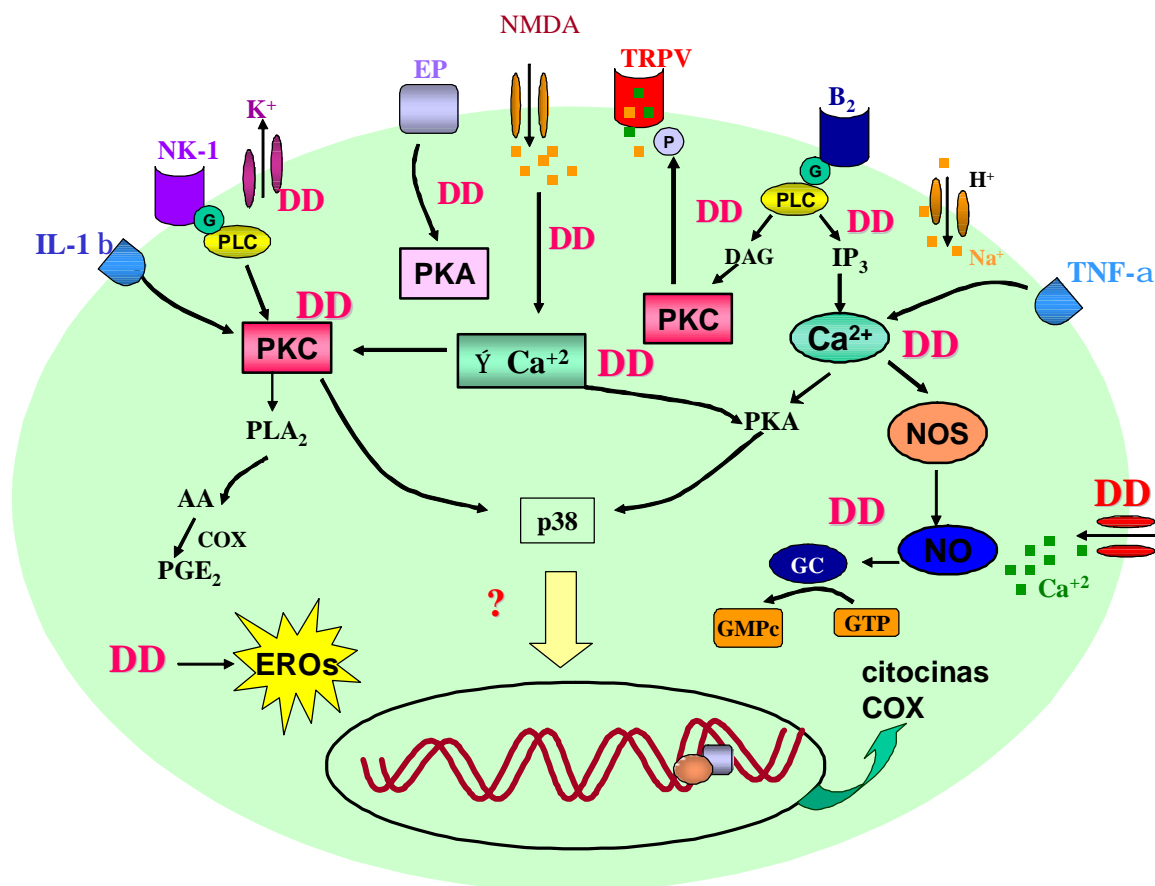


Figura 7: Prováveis sítios de ação do disseleneto de difenila com conseqüente redução na nocicepção e inflamação. DD (disseleneto de difenila); IL-1 $\beta$  (receptor para interleucina 1 $\beta$ ); TNF- $\alpha$  (receptor para o fator de necrose tumoral  $\alpha$ ); NK-1 (receptor para neurocinina 1); K<sup>+</sup> (canal de potássio); EP (receptor para prostaglandina E<sub>2</sub>); TRPV (receptor vanilóide); B<sub>2</sub> (receptor metabotrópico para a bradicinina - B<sub>2</sub>); H<sup>+</sup> (canal catiônico sensível a ácidos); PLC (fosfolipase C); PLA<sub>2</sub> (fosfolipase A<sub>2</sub>); AA (ácido araquidônico); COX (ciclooxigenase); PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>); PKC (proteína quinase C); PKA (proteína quinase A); AMPc (adenosina monofosfato cíclico); DAG (diacilglicerol); NOS (óxido nítrico sintase); NO (óxido nítrico); GC (guanilato ciclase); GMP<sub>c</sub> (guanosina-3'5'-monofosfato cíclico); GTP (guanosina-5'-trifosfato); EROs (espécies reativas de oxigênio); p38 (proteína quinase ativadas por mitógenos).

## 6- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese podemos inferir que:

- ü A administração oral do disseleneto de difenila apresentou baixa toxicidade apresentando segurança no uso desse composto em camundongos.
- ü A administração oral do disseleneto de difenila causou antinocicepção no modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. do ácido acético em camundongos.
- ü A administração oral do disseleneto de difenila foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, glutamato, formalina, PMA e bradicinina; e a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA, SP, capsaicina, bradicinina e citocinas pró-inflamatórias em camundongos.
- ü A administração oral do disseleneto de difenila foi capaz de prevenir a nocicepção térmica, no modelo da imersão da cauda a 55 °C (Tail-immersion) em camundongos.
- ü A administração oral do disseleneto de difenila foi capaz de diminuir o efeito hiperalgésico induzido pela BK, PGE<sub>2</sub>, pelo glutamato e NMDA no teste da placa quente ("Hot plate") em camundongos.
- ü A administração oral do disseleneto de difenila reduziu a alodínia causada pela ligadura parcial do nervo ciático e pela injeção i.pl. de ACF em camundongos.
- ü Os mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila envolvem: interação com os sistemas glutamatérgicos, peptidérgicos e vanilóides; inibição da PKC e PKA; modulação da atividade das enzimas óxido nítrico sintase e guanilato ciclase solúvel; aumento do influxo de K<sup>+</sup> e alterações no transporte de Ca<sup>2+</sup>.

ü Os mecanismos de ação que parecem não estarem relacionados com a atividade antinociceptiva do disseleneto de difenila incluem o sistema opióide; os mecanismos dependentes da proteína  $G_{i/o}$  e receptores glutamatérgicos metabotrópicos e os ionotrópicos do tipo cainato e AMPA.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aanonsen, L.M., Wilcox, G.L. 1987. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1: 9 - 19.
- Aanonsen, L.M., Wilcox, G.L. 1990. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain* 41: 309 - 321.
- Abacioglu, N., Tunçtan, B., Akbulut, E., Çakici, I. 2000. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/ cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. *Life Sciences* 67: 1127 - 1137.
- Aderem, A., Smith, K.D. 2004. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. *Sem. Immunol.*16: 55 - 67.
- Aguirre-Bañuelos, P., Granados - Soto, V. 2000. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 395: 9 - 13.
- Aley, K.O., McCarter, G., Levine, J.D. 1998. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neuroscience* 18: 7008 - 7014.
- Aley, K.O., Messing, R.O., Mochly-Rosen, D., Levine, J.D. 2000. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isoform of protein kinase C. *J. Neurosci.* 20: 4680 - 4685.
- Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.* 1000: 40 - 56.
- Appleton, I. 1997. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: Dickenson, A.; Besson, J. M. *The pharmacology of pain*, Germany: Springer, 43 - 54.

- Arteel, G.E., Sies, H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10: 153 - 158.
- Averil, S., McMahon, S.B., Clarly, D.O.L., Reichardt, L.F., Priestley, J.V. 1995. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1484 - 1494.
- Babbedge, R.C., Hart, S.L., Moore, P.K. 1993. Anti-nociceptive activity of nitric oxide inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 77 - 79.
- Barbosa, N.B.C., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W. 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 163: 230 - 238.
- Basbaum, A., Jessel, T.M. 2000. The perception of pain. In *Principles of neural science* 4<sup>a</sup> ed, Kandel, Schwartz e Jessel; McGraw Hill. 472 - 491.
- Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M.G., Mbikay, M., Chretien, M., Saidah, N.G. 1991. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 30: 1628 - 1635.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A. 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 173: 1143 - 1149.
- 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.
- Bennet, A.D., Everhart, A.W., Hulsebasch, C.E. 2000. Intrathecal administration of NMDA or non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodinia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res.* 859: 72 - 82.

- Benoliel, R., Tanaka, M., Caudle R.M., Iadarola, M.J. 2000. Co-localization of *N*-methyl-D-aspartate receptors and substance P (neurokinin-1) receptors in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 291: 61 - 64.
- Benton, D., Cook, R. 1991. The impact of selenium supplementation on mood. *Biol Psychiatry* 29: 1092 - 1098.
- Berzelius, J.J. 1818. *Afhandl. Fys. Krmi Mineralogi* 6: 42.
- Besson, J.M., Chaouch, A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* 67: 67 - 85.
- Besson, J.M. 1997. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs* 53: 1 - 9.
- Besson, J.M. 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353: 1610 - 1615.
- Bhoola, K.D., Fugrerao, C.D., Worthy, K. 1992. Bioregulation of kinins: kalikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1 - 44.
- Bock, M.G., Longmore, J. 2000. Bradykinin antagonists: new opportunities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 401 - 406.
- Borges, V.C., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2004. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. *Neurochem. Res.* 29: 1505 - 1509.
- Borges, L.P., Borges, V.C., Moro, A.V., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Zeni, G. 2005a. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210: 1 - 8.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2005b. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215: 191 - 197.

- Borges, L.P., Nogueira, C.W., Panatieri, R.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G. 2006. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem. Biol. Inter.* 160: 99 - 107.
- Brito, V.B., Folmer, V., Puntel, G.O., Fachineto, R., Soares, J.C.M., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. 2006. Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. *Brain Res. Bull.* 68: 414 - 418.
- Burch, R.M., Axelrod, J. 1987. Dissociation of bradykinin-stimulated arachidonic acid and release of inositol phosphate in Swiss 3T3 fibroblasts. Evidence for G-protein coupled phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6374 - 6378.
- Burger, M.E., Fachineto, R., Calegari, L., Paixão, M.W., Braga, A.L., Rocha, J.B.T. 2004. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res. Bull.* 64: 339 - 345.
- Burger, M.E., Fachineto, R., Wagner, C., Perottoni, J., Pereira, R.P., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2006. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res. Bull.* 70: 165 - 170.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87: 15.
- Calixto, J.B., Kassuya, C.A.L., André, E., Ferreira, J. 2005. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol. Ther.* 106: 179 - 208.
- Campos, M. M., Calixto J. B. 2000. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides* 34: 314 - 322.
- Campos, M.M., Leal P. C., Yunes, R. A., Calixto, J.B. 2007. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 646 - 651.

- Campos, R.O.P., Alves, R.V., Ferreira, J., Kyle, D.J., Chakravarty, S., Mavunkel, B.J., Calixto, J.B. 1999. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360: 278 - 286.
- Campos, R.O.P., Henriques, M.G.M.O., Calixto, J.B. 1998. Systemic treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin (BCG) potentiates kinin B1 receptor agonist-induced nociception and oedema formation in the formalin test in mice. *Neuropeptides* 32: 393 - 403.
- Caruso, C., Durand, D., Watanobe, H., Lasaga, M. 2005. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. *Neurosci. Lett.* 393: 60 - 64.
- Cashman, J.N. 1996. The mechanisms of action of NSAIDS in analgesia. *Drugs* 52: 13 - 23.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389: 816 - 824.
- Caterina, M.J., Julius D. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev. Neurosci.* 24: 487 - 517.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. *Cell. Calcium* 24: 307 - 323.
- Cervero, F., Laird, J.M.A. 2003. Role of ions channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 608 - 612.
- Chaplan, S.R., Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. 1997. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 829 - 838.

- Chapman, C.R., Gavrin, J. 1999. Suffering: the contributions of persistent pain. *The Lancet*. 353: 2233 - 2237.
- Clatworthy, A.L., Illich, P.A., Castro, G.A., Walters, E.T. 1995. Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett*. 184: 5 - 8.
- Coderre, T.J. 1993. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol. Neurobiol*. 7: 229 - 246.
- Coderre, T.J., Katz, J., Vaccarino, A.L., Melzack, R. 1993. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259 - 285.
- Coggeshall, R.E., Carlton, S.M. 1997. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res. Rev*. 24: 28 - 66.
- Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev*. 46: 205 - 229.
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A. Schneider, C. 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother*. 32: 295 - 310.
- Corrêa, C.R.; Calixto, J.B. 1993. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol*. 110: 193 - 198.
- Cotgreave, I.A., Duddy, S.K., Kass, G.E.N., Thompson, D., Moldeus, P. 1989. Studies on the anti-inflammatory activity of Ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C? *Biochem. Pharmacol*. 38: 649 - 656.

- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J.C., Le Bars, D. 2005. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72: 359 - 371.
- Craig, A.D., Dostrovsky, J.O. 1999. Medulla to thalamus. In: Wall, P.D.; Melzack, R. *Textbook of pain*. Churchill Livingstone : Londres, 1 - 8.
- Cuello, A.C., Ribeiro-da-Silva, A., Ma, W., De koninck, Y., Henry, J.L. 1993. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. *Regul. Pept.* 46: 155 - 164.
- Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1 - 105.
- Davis, M.T., Bartay, W.J. 2004. Ebselen decrease oxygen free radical production and iron concentrations in the hearts of chronically iron-overloaded mice. *Biol. Res. Nursing* 6: 37 - 45.
- De Bock, F., Kurz, J., Azad, S.C., Parsons, C.G., Hapfelmeier, G., Zieglgansberger, W., Rammes, G. 2003. Alpha2-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of Gi/o-protein-mediated modulation of Ca<sup>2+</sup>-channels and inwardly rectifying K<sup>+</sup>-channels in LTD. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1411 - 1424.
- Dichter, M.A., Wilcox, K.S. 1997. Excitatory synaptic transmission. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. J. Engel, Jr. and T.A. Pedley. Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Dickenson, A. 1997. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: Dickenson, A.; Besson, J.M. *The pharmacology of pain*. Springer: Berlin 167 - 209.
- Dingledine, R.; Mcbain, C.J. 1994. Excitatory amino acid transmitters. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Molinoff, P.B. *Basic neurochemistry*. Raven Press: New York, p. 367 - 387.

- Dogrul, A., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Tulunay, F.C., Lai, J., Porreca, F. 2003. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105: 159 - 168.
- Dray, A., Urban, L., Dickenson, A. 1994. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 190 - 197.
- Dray, A., Perkins, M. 1997. Kinins and pain. In: Farmer SG. *The handbook of immunopharmacology: the kinin system.* Academic press: London, p. 157 - 172.
- Dray, A. 1997. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. *The Pharmacology of Pain.* Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin, p. 21 - 41.
- Duarte, I., Lorenzetti, B., Ferreira, S. 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186: 289 - 293.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1304 - 1343.
- Fantone, J.C., Ward, P.A. 1990. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. *Patologia.* Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan 34 - 58.
- Favero, A.M., Weis, S.N., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2005. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod. Toxicol.* 20: 561 - 568.
- Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2006. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotoxicol. Teratol.* 28: 607 - 616.
- Favero, A.M., Weis, S.N., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2007. Adult male rats sub-chronically exposed to diphenyl diselenide: Effects on their progeny. *Reprod. Toxicol.* 23: 119 - 123.



- Feng, Y., Cui, M., Willis, W. 2003. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiol.* 98: 729 - 733.
- Ferreira, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B. 1999. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intratechal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology* 38: 835 - 842.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B. 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41: 1006 - 1012.
- Ferreira, J., Silva, G.L., Calixto, J.B. 2004. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 141: 787 - 794.
- Ferreira, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. 1972. *Nature* 240: 200 - 203.
- Ferreira, S.H., Nakamura, M.I. 1979. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins* 18: 179 - 190.
- Fields, H.L., Heinricher, M.M., Mason, P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 219 - 245.
- Fields, H.L., Basbaum, A.I. 1999. 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.
- Finley, J.W., Penland, J.G. 1998. Adequacy or deprivation of selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. *J. Trace Elem. Experim. Med.* 11: 11 - 27.

- Finnerup, N.B., Jensen, T.S. 2004. Spinal Cord Injury Pain - Mechanisms and Treatment. *Eur. J. Neurol.* 11: 73 - 82.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H. 1973. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. *FEBS Lett.* 32: 132 - 134.
- Fox, A., Kaur, S., Li, B., Panesar, M., Saha, U., Davis, C., Dragoni, I., Colley, S., Ritchie, T., Bevan, S., Burgess, G., McIntyre, P. 2005 Antihyperalgesic activity of a novel nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist in transgenic mice expressing the human B1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 144: 889 - 899.
- Fundytus, M.E. 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs.* 15: 29 - 58.
- Fürst, S. 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 48: 129 - 141.
- Garcia, T.J. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 353: 429 - 430.
- Ge, K., Yang, G. 1993. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* 57: 259S - 263S.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L. O., Cimarosti, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza, D.O. 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.* 986: 196 - 199.
- Gilroy, D. W.; Lawnce, T.; Perretti, M.; Rossi, A. G. 2004. Inflammatory solution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev.* 3: 104 - 416.
- Goslan, H., Ben-Ari, Y. 1995. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 368 - 374.

- Goto, T., Nakao, K., Gunjigake, K.K., Kido, M.A., Kobayashi, S., Tanaka, T. 2007. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides* 41: 25 - 31.
- Granados-Soto, V.; Rufino, M.O.; Lopes, L.D.G.; Ferreira, S.H. 1997. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 340: 177 - 180.
- Griffis, C.A., Compton, P., Doering, L. 2006. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biol. Res. Nurs.* 7: 297 - 312.
- Grubb, B.D. 1998. Peripheral and central mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 81, 1: 8 - 11.
- Grumbach, L., 1966. The prediction of analgesic activity in man by animal testing. In: Knighton RS, Dumke PR, editors. *Pain*. Boston: Little Brown and Co. 163 - 182.
- Haddad, E-B., Mccluskie, K., Birrell, M.A., Dabrowski, D., Pecoraro, M., Underwood, S., Chen, B., Sanctis, G.T., Webber, S.E., Foster, M.L., Belvisi, M.G. 2002. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *J. Immun.* 169: 974 - 982.
- Haley, J.E., Dickenson, A.H., Schachter, M. 1992. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacol.* 31: 251 - 258.
- Hall, J.M. 1992. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* 56: 131 - 190.
- Harrison, S., Geppetti, P. 2001. Substance P. *Int. J. Biochem. Cel. Biol.* 33: 555 - 575.

- Hattori R., Inoue R., Sase K., Eizawa H., Kosuga K., Aoyama T., Masayasu H., Kawai C., Sasayama S., Yui Y. 1994. Preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase by ebselen. *Eur. J. Pharmacol.* 267: R1 - R2.
- Hawkes, W.C., Hornbostel, L. 1996. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol. Psych.* 39: 121 - 128.
- Herin, G.A., Du, S., Aizenman, E. 2001. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. *J. Neurochem.* 78: 1307 - 1314.
- Hill, R.G. 2001. Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist.* 7: 282 - 292.
- Hoffman, J.L., McConnell, K.P. 1986. Periodate-oxidized adenosine inhibits the formation of dimethylselenid and trimethylselenium ion in mice treated with selenite. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 534 - 540.
- Hofmann, F., Lacinova, L., Klugbauer, N. 1999. Voltage-dependent calcium channel: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 139: 33 - 87.
- Holden, J.E., Pizzi, J.A. 2003. The Challenge of Chronic Pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 935 - 948.
- Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 237 - 271.
- Holzer, P. 1991. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298: 3 - 16.
- Hudspith, M.J. 1997. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *Br. J. Anaesth.* 78: 731 - 747.
- Hunnskaar, S., Hole, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103.

- Hunt, S.P., Rossi, J. 1985. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 308: 283 - 289.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Ohishi, S. 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci.* 69: 2911 - 2919.
- Imai, H., Masyasu, H., Dewar, D., Graham, D.I., Macrae, I.M. 2001. Ebselen protects both gray and White matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 32: 2149 - 2154.
- Islas-Cadena, M., Aguirre-Bañuelos, P., Granados-Soto, V. 1999. Evidence for the participation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J. Pharmacol. Toxicol.* 42: 87 - 92.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T. 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. 2001. *Pharmacol. Toxicol.* 88: 119 - 125.
- Jain, N.K., Patil, C.S., Singh, A., Kulkarni S.K. 2001. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.* 909: 170 - 178.
- Jancso, G. 1992. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. *Exp. Physiol.* 77: 405 - 431.
- Ji, R.R., Woolf, C.J. 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* 8: 1 - 10.
- Ji, R.R., Strichartz, G. 2004. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. *Science* 252: 1 - 19.

- Julius, D., Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203 - 210.
- Kamiya, H., Nakamura, J., Hamada, Y., Nakashima, E., Naruse, K., Kato, K., Yasuda, Y., Hotta, N. 2003. Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 19: 131 - 139.
- Kanda, T., Engman, L., Cotgreave, I.A., Powis, G. 1999. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. *J. Org. Chem.* 64: 8161 - 8169.
- Kawabata, A., Umeda, N., Takagi, H. 1993. L-Arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.* 109: 73 - 79.
- Khasar, S.G., Mccarter, G., Levine, J.D. 1999. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J. Neurophysiol.* 81: 1104 - 1112.
- Kingery, W.S. 1997. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* 73: 123 - 139.
- Klayman, D.L., Günther, W.H. (eds.). 1973. Organic selenium compounds: their chemistry and biology. New York: John Wiley and sons, 68 - 157.
- Kondoh, S., Negasawa, S., Kawabishi, M., Yamagushi, K., Kajimoto, S., Ohta, T. 1999. Effects of ebselen on cerebral ischemis and reperfusion evaluated by microdialysis. *Neurol. Res.* 21: 682 - 686.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535 - 537.
- Lai, J., Hunter, J.C., Porreca, F. 2003. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 291 - 297.

- Larson, A.A., Brown, D.R., El-Atrash, S., Walser, M.M. 1986. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 49 - 53.
- Laughlin, T.M., Kitto, K.F., Wilcox, G.L. 1998. Redox manipulation of NMDA receptors in vivo: alteration of acute pain transmission and dynorphin-induced allodynia. *Pain* 80: 37 - 43.
- Lee, K.M, Toscas, K., Villereal, M.L. 1993. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  entry by tyrosine kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 268: 9945 - 9948.
- Levine, J.D., Reichling, D.B. 1999. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. (eds) *Textbook of pain*; Fourth edition, London: Churchill Livingstone, 59 - 84.
- Levine, J.D., Taiwo, Y. 1994. Inflammatory Pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. *Textbook of Pain*, 3<sup>a</sup> Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 45 - 56.
- Li, M., Shi, J., Tang, J., Chen, D., Ai, B., Chen, J., Wang, L., Cao, F., Li, L., Lin, C., Guan, X. 2005. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1 $\beta$  and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 192 - 198.
- Liebeskind, J.C., Guilbaud, G., Besson, J.M., Oliveiras, J.L. 1973. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observation and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Res.* 50: 441 - 446.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng. J. Med.* 330: 613 - 622.
- Liu, X., Sandkuhler, J. 1997. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J. Neurophysiol.* 78: 1973 - 1982.

- Loeser, J.D., Melzack, R. 1999. Pain: an overview. *Lancet* 353: 1607 - 1609.
- Loeser, J.D. 2000. Pain and suffering. *Clin. J. Pain* 16: S2 - S6.
- Lograsso, P., Mckelvy, J. 2003. Advances in pain therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 452 - 456.
- Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. 1996. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflammation Research* 45: 308 - 311.
- Lotsch, J., Geisslinger, G. 2001. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin. Pharmacokinet.* 40: 485 - 499.
- Lutfy, K., Cai, S.X., Woodward, R.M., Weber, E. 1997. Antinociceptive effects of NMDA and non- NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. *Pain.* 70: 31 - 40.
- Macfarlane, B.V., Wright, A., O'Callaghan, J., Benson, H.A. 1997. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol. Ther.* 75: 1 - 19.
- Machwate, M., Harada, S., Leu, C. T., Seedor, G., Labelle, M., Gallant, M., Hutchins, S., Lachance, N., Sawyer, N., Slipetz, D., Metters, K. M., Rodan, S. B., Young, R., Rodan, G. A. 2001. Prostaglandin receptor EP4 mediates the bone anabolic effects of PGE<sub>2</sub>. *Mol. Pharmacol.*, 60: 36-41, 2001. Erratum in: *Mol. Pharmacol.* 64: 192.
- Maciel, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T. 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14: 310 - 319.
- Maciel, E. N., Flores, E. M. M., Rocha, J. B.T. Folmer V. 2003. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 470 - 476.



- MacMahon, S.B., Cafferty, W.B.J., Marchand, F. 2005. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.* 192: 444 - 462.
- Malcangio, M., Fernandes, K., Tomlinson, D.R. 1998. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 125: 1625 - 1626.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. 1993. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 54: 291 - 300.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. 1995. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acid evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J. Neurosci.* 14: 2768 - 2776.
- Mao, J., Price, D.D., Hayes, R.L., Lu, J., Mayer, D.J. 1992. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 598: 271 - 278.
- Marceau, F, Regoli, D. 2004. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 845 - 852.
- Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Chain, B. 1995. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 25: 947 - 951.
- Martin, J.L., Gerlack, M.L. 1972. Selenium metabolism in animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 192: 193 - 199.
- Martin, T.J., Eisenach, J.C. 2001. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 811 - 817.

- Mattos, W.M., Campos, M.M., Fernandes, E.S., Richetti, G.P., Niero R., Yunes R., Calixto, J.B. 2006 Anti-edematogenic effects of velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*: Evidence for a selective inhibition of kinin B1 receptor-mediated responses. *Regul. Pept.* 136: 98 - 104
- Matthews, E.A., Dickenson, A.H. 2001. Effects of ethosuximide, a T-type  $\text{Ca}^{(2+)}$  channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 415: 141 - 149.
- McLeod, A.L., Ritchie, J., Cuello, A.C., Julien, J.P., Ribeiro-da-Silva, A., Henry, J.L. 1999. Transgenic mice over-expressing substance P exhibit allodynia and hyperalgesia which are reversed by substance P and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuroscience* 89: 891 - 899.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, A.G. 1999. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 36: 189 - 204.
- Meller, S.T., Gebhart, G.F. 1993. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52: 127 - 136.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z. 2003. Painful sensory neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 348: 1243 - 1255.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T. and Nogueira, C.W. 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. *Toxicol. Lett.* 143: 9 - 16.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94: 276 - 282.
- Meotti, F.C., Luiz, A., Pizzolatti, M. G., Kassuya, C.A.L., Calixto, J.B., Santos, A.R.S. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for

a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase c pathways. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 316: 780 - 796.

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, T., Nishihara, I., Uda, R., Ito, S., Hyoto, M., Hayaishi, O. 1994. Characterization of EP receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin to mice. *Br. J. Pharmacol.* 112: 735 - 740.

Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbedge, R.C., Wallace, P., Hart, S.L. 1991. L-N<sup>G</sup> - nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 102: 198 - 202.

Moore, P.K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S.L., Babbedge, R.C. 1993. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* 110: 219 - 224.

Mozier, N.M., McConnell, K.P., Hoffman, J.L. 1988. S-adenosyl-L-methionine: thioether S-methyltransferase, a new enzyme in sulfur and selenium metabolism. *J. Biol. Chem.* 263: 4527 - 4531.

Moussaoui, S., Obinu, M.C., Daniel, N., Reibaud, M., Blanchard, V., Imperato, A. 2000. The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology* 166: 235 - 245.

Mugesh, G., Du Mont, W.W., Sies, H. 2001. Chemistry of biologically important Organoselenium compounds. *Chem. Rev.* 101: 2125 - 2179.

- Muller, A., Cadenas, E., Graf, P., Sies, H. 1984. A novel biologically active seleno-organic compound I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33: 3235 - 3239.
- Murray, S.R., Chao, J., Lin, F., Chao, L. 1990. Kallikrein multigenes families and the regulation of their expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15: 7 - 15.
- Navarro-Alarcón, M., López-Martinez, M.C. 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Tot. Environ.* 249: 347 - 371.
- Neugebauer, V. 2002. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavioral. *Pain.* 98: 1 - 8.
- Neve, J., Henry, M., Peretz, A., Mareschi, J.P. 1987. L'importance nutritionnelle du sélénium. *Cach. Nutr. Diet.* 22: 145 - 162.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T. 2001. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.* 906: 157 - 163.
- Nogueira, C.W., Rotta, L.N., Zeni, G., Souza, D.O., Rocha, J.B.T. 2002. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 27: 283 - 288.
- Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2003a. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183: 29 - 37.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2003b. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52: 56 - 63.
- Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., and Rocha, J.B.T. 2003c. Organochalcogens affect on delta-aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191: 169 - 178.

- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104: 6255 - 6285.
- Nowak, P.M, Saluk-Juszczak, J., Olas, B., Kolodzieczyk, J., Wachowicz, B. 2006. The protective effects of selenoorganic compounds against peroxyxynitrite-induced changes in plasma proteins and lipids. *Cel. Mol. Biol. Lett.* 11: 1 - 11.
- Obreja, O., Rathee, P.K., Lips, K.S., Distler, C., Kress, M. 2002. IL-1 $\beta$  potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase and protein kinase C. *FASEB J.* 16: 1497 - 1503.
- Okamoto, Y., Günther, W.H. 1972. Organic selenium and tellurium chemistry. *Ann. NY Acad Sci Part Ilii. Biological aspects of organic selenium and tellurium compounds – metabolic interrelationship and adaptations in selenium toxicity.*
- Okuse, K. 2007. Pain signaling pathways: from cytokines to ion channels. *Intern. J. Biochem. Cel. Biol.* 39: 490 - 496.
- Ortiz, M.I., Granados-Soto, V., Castañeda-Hernández, G. 2003 The NO-cGMP- K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenaco, but not of indomethacin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76: 187 - 195.
- Ortiz, M.I., Tato, D.A.M., Sarmiento-Heredia, D., Palma-Martínez, J., Granados-Soto, V. 2006. Possible activation of the NO-cyclic GMP –protein kinase G- K<sup>+</sup> channels pathway by gabapentin on the formalin test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 83: 420 - 427.
- Ortuño, J., Ros, G., Priago, M., Martinez, C., Lopez, G. 1996. Selenium bioavailability and methods of evaluation. *Food Sci. Technol. Intern.* 2: 135 - 150.
- Ozaki, M., Nakamura, M., Teraoka, S., Ota, K. 1997. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl. Int.* 10: 96 - 102.

- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581 - 18.
- Parada, C.A., Yeh, J.J., Reichling, D.B., Levine, J.D. 2003. Transient attenuation of protein kinase C $\epsilon$  can terminate a chronic hyperalgesia state in the rat. *Neuroscience* 120: 219 - 226.
- Parnham, M.J., Graf, E. 1987. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 36: 3095 - 3102.
- Parnham, M.J., Graf, E. 1991. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog. Drug. Res.* 36: 10 - 47.
- Peana, A.T., Marzocco S., Popolo, A., Pinto, A. 2006. (-)Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci.* 78: 718 - 723.
- Perkins, N.M., Tracey, D.J. 2000. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neurosci.* 101: 745 - 757.
- Pertwee, R.G. 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6: 635 - 664.
- Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Silva, J.A. Jr., Walter, T., Oliveira, S.M., Pesquero, J.L., Paiva, A.C., Calixto, J.B., Lewin, G.R., Bader, M. 2000. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8140 - 8145.
- Petersen, K.L., Rowbotham, M.C. 2000. Will ion-channel blockers be useful for management of nonneuropathic pain? *J. Pain* 1: 23 - 34.
- Petersen-Zeitl, K.R., Basbaum, A.I. 1999. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain.* 6: 5 - 12.

- Pleuvry, B.J., Lauretti, G.R. 1996. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol. Ther.* 71: 313 - 324.
- Pollock, J., Macfarlane, S.M., Connell, M.C., Zehavi, U., Vandenberghe, P., Macewan, D.J., Scott, R.H. 2002. TNF- $\alpha$  receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurons. *Neuropharmacology* 42: 93 - 106.
- Porciúncula, L., Rocha, J.B.T., Boeck, C.R., Vendite, D.A., Souza, D.O.G. 2001. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 299: 217 - 220.
- Porciúncula, L.O., Schmidt, A.P., Coitinho, A.S., Vinade, L., Izquierdo, I., Rocha, J.B., Souza, D.O. 2002. Intrahippocampal infusion of ebselen impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 451: 165 - 169.
- Porciúncula, L., Rocha, J.B.T., Cimarosti, H., Vinadé, L., Ghisleni, G., Salbego, C.G., Souza, D.O.G. 2003. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci. Lett.* 346: 101 - 104.
- Porciúncula, L.O., Rocha, J.B.T., Ghisleni, G., Tavares, R.G., Souza, D.O. 2004. The effects of ebselen on [<sup>3</sup>H] glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Brain Res.* 1027:192 - 195.
- Porreca, F., Ossipov, M.H., Gebhart, G.F. 2002. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* 25: 319 - 325.
- Posser, T., Moretto, M. B., Dafre, A. L., Farina, M., Rocha, J. B., Nogueira, C. W., Zeni, G., Ferreira, J. D., Leal, R. B., Franco, J. L. 2006. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation. *Chem. Biol. Inter.* 164: 126 - 135.

- Prado, W.A. 2001. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 449 - 461.
- Premkumar, L.S., Ahern, G.P. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408: 985 - 989.
- Quintao, N.L., Balz, D., Santos, A.R., Campos, M.M., Calixto, J.B. 2006. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology* 50: 614 - 620.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.* 46: 551 - 599.
- Reilly C. 1996. Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 139 - 142.
- Reynolds, I.J., Rush, E.A., Aizenman, E. 1990. Reduction of NMDA receptors with dithiothreitol increases [<sup>3</sup>H] MK-801 binding and NMDA-induced Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Br. J. Pharmacol.* 101: 178 - 182.
- Reynolds, I.J., Hastings, T.G. 1995. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 15: 3318 - 3327.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.V., Thomazzi, S.M, Paschoalato, A.B.P., 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.
- Rivot, J.P., Sousa, A.; Montagne-Clavel, J.; Besson, J.M. 1999. Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: *na in vivo* electrochemical approach in the rat. *Brain Res.* 821: 101 - 110.



- Rocha and Silva, M.O. Brief history of inflammation. 1978. In: VANE, J.R.; Ferreira, S.H.. Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer-Verlag, 6 - 25.
- Rock, D.M., MacDonald, R.L. 1995. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 463 - 482.
- Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A.P., Roesler, R. 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.* 341: 217 - 220.
- Rossato, J., Keltzer, L. A., Centurião, F. B. 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* 318: 137 - 140.
- Russo, C.M, Brose, W.G., 1998. Chronic pain. *Annu. Rev. Med.* 49: 123 - 133.
- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsumada, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H., Tanabe, T. 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type  $Ca^{2+}$  channel. *Embo J.* 20: 2349 - 2356.
- Saegusa, H., Matsuda, Y., Tanabe, T. 2002. Effects of ablation of N- and R-type  $Ca^{2+}$  channels on pain transmission. *Neurosci. Res.* 43: 1 - 7.
- Sah, D.W., Ossipo, M.H., Porreca, F. 2003. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 460 - 472.
- Saito, Y., Hashimoto, T., Sasaki, M., Hanaoka, S., Sugai, K. 1998. Effect of selenium deficiency on cardiac of individuals with severe disabilities under long-term tube feeding. *Devel. Med. Child. Neurol.* 40: 743 - 748.
- Sakurada, S., Orito, T., Sakurada, C., Sato, T., Hayashi, T., Mobarakeh, J.I., Yanai, K., Onodera, K., Watanabe, T., Sakurada, T. 2002. Possible involvement of

tachykinin NK1 and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 434: 29 - 34.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tanno, K., Sakurada, S., Kisara, K., Hara, A., Abiko, Y. 1996. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural response in the mouse. *Neurochem. Int.* 29: 271 - 278.

Santos, A.R.S., Calixto, J.B. 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 31: 381 - 389.

Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, A.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.

Santos, F.W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Nogueira, C.W. 2004. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol. Lett.* 152: 255 - 263.

Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nascimento, P.C., Marques, M.S., Nogueira, C.W. 2005. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1723 - 1730.

Sautebin, L., Lalenti, A., Ianaro, A., Di Rosa, M. 1995. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 114: 323 - 328.

Savaskan, N.E., Bräuer, A.U., Kühbacher, M., Eyüpoglu, I.Y., Kyriakopoulos, A., Ninnemann, O., Behne, D., Nitsch, R. 2003. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *Faseb J.* 17: 112 - 114.

- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. 2006. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21: 86 - 92.
- Savinainen, J.R., Laitinen, J.T. 2004. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-activated membranes and autoradiography sections of rat retina. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24: 243 - 256.
- Sawamura, S., Fujinaga, M., Kingery, W.S., Belanger, N., Davies, M.F., Maze, M. 1999. Opioidergic and adrenergic modulation of formalin-evoked spinal c-fos mRNA expression and nociceptive behavior in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 379: 141 - 149.
- Schäfers, M., Svensson, C., Sommer, C., Sorkin, L.S. 2003. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 23: 2517 - 2521.
- Schewe, T. 1995. Molecular actions of selenium – an anti-inflammatory antioxidant. *Gen. Pharmac.* 26: 1153 - 1169.
- Scholz, J., Woolf, C.J. 2002. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci. Suppl.* 5; 1062 - 1067.
- Schultz, J.J., Gross, G.J. 2001. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol. Ther.* 89: 123 - 137.
- Schwartz, K., Foltz, P.J. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 200 - 214.
- Sekizawa, S.I., French, A.S., Torkkeli, P.H. 2000. Low-voltage-activated calcium current does not regulate the firing behavior in paired mechanosensory neurons with different adaptation properties. *J. Neurophysiol.* 83: 746 - 753.

- Seltzer, Z., Dubner, R. Shir, Y. 1990. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. *Pain* 43: 205 - 218.
- Shelley, A., Cross, M.D. 1994. Pathophysiology of pain. *Mayo. Clin. Proc.* 69: 375 - 383.
- Sherwood, E.R.; Toliver-Kinsky, T. 2004. Mechanisms of the inflammation response. *Best Pract. Res. Clin Anaesthesiol.* 18: 385 - 405.
- Sies, H., Artee, G.E. 2000. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1451 - 1455.
- Singh, P., Mann, K.A., Mangat, H.K., Kaur, G. 2003. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. *Mol. Cell. Biochem.* 243: 139 - 145.
- Skerry, T.M., Genever, P.G. 2001. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 174 - 181.
- Souza, A.M., Prado, W.A. 2001. The dual effect of nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 897: 9 - 19.
- Spallholz, J. E. 1993. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad Biol. Med* 20: 131 - 143.
- Stadtman, T.C. 1980. Selenium-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 93 - 110.
- Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H. 2003. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature Med.* 9: 1003 - 1008.
- Sufka, K.J., Roach, J.T. 1996. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists in rats. *Pain* 66: 99 - 103.

- Suzuki, K.T., Somekawa, L., Suzuki, N. 2006. Distribution and reuse of 76 Se-selenoaçúcar in selenium-deficient rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216: 303 - 308.
- Svirbely, J.L. 1938. Vitamin C studies in the rat. The effect of selenium dioxide, sodium selenate and tellurate. *Biochem. J.* 32: 467.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. 1993. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). *Adv. Pharmacol.* 24: 123 - 155.
- Takasago, T., Peters, E.E., Graham, D.L., Masayasu H., Macrae I.M. 1997. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br. J. Pharmacol.* 122: 1251 - 1256.
- Tan, Y.X., Li, W.H., Tao, X.B., Jiang, Y.Y., Chen, W.P., Zhou, B. 1997. Protection of ebselen against anoxic damage of culture neurons of cerebral cortex. *Chung. KuoYao Li Hsueh. Pao.* 18: 201 - 203.
- Tang, L.H., Aizenman E. 1993. The modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurons in vitro. *J. Physiol.* 465: 303 - 323.
- Thomas, R.J. 1995. Excitatory amino acids in health and disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 43: 1279 - 1289.
- Tippmer, S., Qwitterer, U., Kolm, V., Faussener, A., Roscher, A.A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W., Häring, H. 1994. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , and  $\zeta$ . *Eur. J. Biochem.* 225: 297 - 304.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5 - 17.

- Tjølsen, A., Hole, K. 1997. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. The Pharmacology of Pain. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1 - 20.
- Trotti, D., Rizzini, B.L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A. 1997. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1236 - 1243.
- Urban, L., Nagy, I. 1997. Is there a nociceptive carousel? *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 223 - 224.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L. 1990. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393 - 1396.
- Valentine, J.L., Kang, H.K., Spivey, G.H. 1978. Selenium levels in human blood, urine and hair in response to exposure via drinking water. *Environ. Res.* 17: 347 - 355.
- Vanegas, H., Schaible, H.G. 2000. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 85: 8 - 19.
- Vanegas, H.; Schaible, H.G. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progr. Neurobiol.*, 64: 327 - 363.
- Vanegas, H., Schaible, H.G. 2004. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Rev.* 46: 295 - 309.
- Veneroni, O., Maj, R., Calabresi, M., Faravelli, L., Fariello, R.G., Salvati, P. 2003. Anti-allodynic effect of NW-1029, a novel Na<sup>(+)</sup> channel blocker, in experimental animal models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 102: 17 - 25.

- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., Jonhston, P.R. 1979. Antagonism of pain and Hyperalgesia. *Anti-inflammatory Drugs*. Em: Vane, J.R., Ferreira, S.H. (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 50/II, Springer: Verlag, Berlin. Pp. 208 - 222.
- Walker, K., Fox, A.J., Urban, L.A. 1999. Animal models for pain research. *Mol. Méd. Today*. 5: 319 - 321.
- Wall, P.D. 1967. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. *J. Physiol. (Lond)* 188: 403 - 423.
- Wall, P.D. 1999. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. Churchill Livingstone: Londres. 1 - 8.
- Walther, M., Holzhutter, H., Kuban, R.J., Wiesner, R., Rathmann, J., Kuhn, H. 1999. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenase by the anti-inflammatory drug Ebselen: Dual type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *J. Pharmac. Exp. Therap.* 56: 196 - 203.
- Wang, L.X., Wang, Z.J. 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 949 - 965.
- Wanger, P.D., Pedersen, N.D., Hatfield, J., Weswing, P.H. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. 1976. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153: 295 - 295.
- Ward, D.T. 2004. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* 35: 217 - 228.
- Watkins, L.R., Maier, S.F. 2002. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol. Rev* 82: 981 - 1011.
- Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., Black, J.A. 1999. Sodium channels and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7635 - 7639.

- Weis, S.N., Favero, A.M., Stangherlin, E.C., Manarin, F.G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. 2007. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. *Reprod. Toxicol.* 23: 175 - 181.
- Wen, Z.H., Chang, Y.C., Wong, C.S. 2003. Implications of intrathecal pertussis toxin animal model on the cellular mechanisms of neuropathic pain syndrome. *Acta Anaesthesiol. Sin.* 41: 187 - 196.
- Wendel, A., Fausel, M., Safayi, H., Otter, R. 1984. A novel biologically active seleno-organic compound II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3241 - 3245.
- Wiech, K., Kiefer, R.T., Topfner, S., Preissl, H., Braun, C., Unertl, K., Flor, H., Birbaumer, N. 2004. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-Daspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. *Anesth. Analg.* 98: 408 - 413.
- Wilber, C.G. 1980. Toxicology of selenium: a review. *Clinical Toxicology* 17: 171 - 230.
- Wirth, K., Breipohl, G., Stechl, J., Knolle, J., Henke, S., Scholkens, B. 1991. DesArg9-D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]- bradykinin (desArg10-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 205: 217 - 218.
- Wood, J.N., Docherty, R. 1997. Chemical activators of sensory neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 457 - 482.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Pain* 353: 1959 - 1964.
- Woolf, C.J., Salter, M.W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765 - 1769.



- Xiao, H.S., Huang, Q.H., Zhang, F.X., Bao, L., Lu, Y.J., Guo, C., Yang, L., Huang, W.J., Fu, G., Xu, S.H., Cheng, X.P., Yan, Q., Zhu, Z.D., Zhang, X., Chen, Z., Han, Z.G., Zhang, X. 2002. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8360 - 8365.
- Xu, J.H., Hu, H.T., Liu, Y., Qian, Y.H., Liu, Z.H., Tan, Q.R., Zhang, Z.J. 2006. Neuroprotective effects of ebselen are associated with the regulation of Bcl-2 and Bax proteins in cultured mouse cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 399: 210 - 214.
- Yajima, Y., Narita, M., Shimamura, M., Narita, M., Kubota, C., Suzuki, T. 2003. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. *Brain Res.* 992: 288 - 293.
- Yamaguchi, T., Sano, K., Takakura, K., Saito, I., Shinohara, Y., Asano, T., Yasuhara, H. 1998. Ebselen in acute ischemic stroke. A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Stroke* 29: 12 - 17.
- Yamamoto, T.; Shimoyama, N; Mizuguchi, T. 1993. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. *Anesth. Anal.* 77: 886 - 890.
- Yoshizumi, M., Kogame, T., Suzaki, Y., Fujita, Y., Kyaw, M., Kirima, K., Ishizawa, K., Tsuchiya, K., Kagami, S., Tamaki, T. 2002. Ebselen attenuates oxidative stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signalling pathway in PC12 cells. *Br. J. Pharmacol.* 136: 1023 - 1032.
- Yoshizumi, M., Fujita, Y., Izawa, I., Suzaki, Y., Kyaw, M., Ali N., Tsuchiya, K., Kagami, S., Yano, S., Sone, S., Tamaki, T. 2004. Ebselen inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced c-Jun N-terminal kinase activation and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 292: 1 - 10.
- Young, V.R., Nahapetiau, A., Jonghorboni, M. 1981. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1076 - 1088.

- Zasso, F.B., Gonçalves, C.E.P., Jung, E.A.C., Araldi, D., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environm. Toxicol. Pharmacol.* 19: 283 - 289.
- Zeilhofer, U.H. 2007. Prostanoids in nociception and pain. *Biochem. Pharmacol.* 73: 165 - 174.
- Zhang, J.Z., Hoffert, C., Vu, H.K., Groblewski, T., Ahmad, S., O'donnell, D. 2003. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatoru chronic pain models. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2750 - 2754.
- Zimmermann, M. 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 23 - 37.

## 8- DEMAIS TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO (07/05 – 08/07)

- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. **Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 31, 1261 - 1269, 2007.

- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. **Diphenyl Diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, *submetido*.

- Jesse, C.R., Savegnago, L., Nogueira, C.W. **Role of Nitric Oxide/cyclic GMP/K<sup>+</sup> Channel Pathways in the Antinociceptive Effect Caused by 2, 3-Bis(mesitylseleno)propenol** . Life Sciences, *submetido*.

- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Savegnago, L., Nogueira, C.W. **Repeated Administration of Diphenyl Ditelluride Induces Hematological Disorders in Rats.** Food and Chem. Toxicol. 45, 1453 - 1458, 2007.

- Savegnago, L., Jesse, Cristiano Ricardo, Moro, Angélica Venturine, Borges, Vanessa Corralo, Santos, Francielli Weber, Rocha, João Teixeira da, Nogueira, Cristina Wayne. **Bis -Selenide Alkene Derivatives: A Class of Potential Antioxidant and Antinociceptive Agents.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 83, 221 - 229, 2006.

- Borges, Vanessa C., Dadalt G, Savegnago, L., Moro, Angélica, Rocha, João B. T., Nogueira, Cristina W. **1,1,2-Tris-organoselenide alkene derivatives, but not 1,2-bis-organoselenide alkene derivatives, inhibited delta-aminolevulinatase dehidratase activity from human erythrocytic cells in vitro.** Toxicology in Vitro, 3, 387 - 391, 2007.

- Savegnago, L., Borges, Vanessa C., Alves, Diego, Jesse, Cristiano R., ROCHA, Joao B. T., Nogueira, Cristina W. **Evaluation of Antioxidant Activity and Potential Toxicity of 1-Buthyltelurenyl-2-methylthioheptene.** Life Sciences. 79, 1546 - 1552, 2006.
  
- Stefani, H.A., Oliveira, C.B., Almeida, R.B., Pereira, C.M.P., Braga, R.C., Cella, R., Borges, V.C., Savegnago, L., Nogueira, C.W. **Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents.** European Journal of Medical Chemistry. 41, 513 - 518, 2006.
  
- Prediger, Patrícia, Moro, Angélica V, Nogueira, Cristina W, Savegnago, L., Menezes, Paulo Henrique, Rocha, João B T, Zeni, Gilson. **Palladium-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling of 2-Haloselenophenes: Synthesis of 2-Arylselenophenes, 2,5-Diarylselenophenes and 2-Arylselenophenyl Ketones.** Journal of Organic Chemistry., 71, 3786 - 3792, 2006.