



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

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS
NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO
SELENETO VINÍLICO BIS SUBSTITUÍDO (SVBS)
EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiano Ricardo Jesse

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA
AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO SELENETO
VINÍLICO BIS SUBSTITUÍDO (SVBS) EM
CAMUNDONGOS**

por

Cristiano Ricardo Jesse

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2009

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Naturais e Exatas

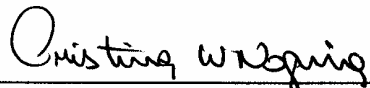
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica
Toxicológica**

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

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO
ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO SELENETO VINÍLICO BIS
SUBSTITUÍDO (SVBS) EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por
Cristiano Ricardo Jesse
como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em
Bioquímica Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Cristina Wayne Nogueira (Orientador)



Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (UFSM)



Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro (UFSM)

Santa Maria, março de 2009

AGRADECIMENTOS

A Deus por reproduzir em cada um de nós sua manifestação criadora.

A minha família, pelo apoio incondicional, amor, paciência, força e otimismo.

Aos meus orientadores Cristina e Gilson, agradeço pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de perseverança incansável ao ensino e a ciência. Cris e GZ, muito obrigado!

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica e Farmacologia, que contribuíram para a minha formação.

Agradeço em especial a “Lu” pelos ensinamentos no laboratório.

Aos colegas do Laboratório do Prof. Gilson, Félix e João pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório da Prof^a Cristina, por aguentarem algumas brincadeiras “sem graça”. Agradeço-os pela amizade, auxílio, compreensão, conhecimento e companheirismo compartilhados diariamente. Agradeço a todos por darem sentido a minha vida acadêmica. Agradeço em especial a Crisinha e a Ethel pela ajuda direta em muitos trabalhos realizados durante o mestrado.

Aos funcionários Angélica, Márcia, Rinaldo, Brondane, Elton e Maneco pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

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

RESUMO

Dissertação de mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas - Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA CAUSADA PELO SELENETO VINÍLICO BIS SUBSTITUÍDO (SVBS) EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Cristiano Ricardo Jesse
ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira
CO-ORIENTADOR: Gilson Zeni
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, março de 2009.

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 seleneto vinílico bis substituído (SVBS) 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 os efeitos farmacológicos é importante para a sua aplicação terapêutica. Desta forma, no presente trabalho investigou-se as propriedades antinociceptivas do SVBS, bem como os possíveis mecanismos envolvidos em tal processo. A administração oral do SVBS preveniu a nocicepção induzida pela injeção intratecal (i.t.) de glutamato, cainato, ácido (\pm)-1- aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), capsaicina, substância P (SP), fator de necrose alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), mas não bloqueou significativamente a nocicepção causada pela injeção i.t. do ácido α - amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionico (AMPA) e ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDA). Além disso, a administração oral do SVBS foi capaz de prevenir a nocicepção térmica, no modelo da chapa quente a 55°C. A antinocicepção causada pela administração oral do SVBS no teste da chapa quente foi revertida pelo pré-tratamento com

tetraetilamônio (TEA; bloqueador de diferentes tipos de canais de potássio, inclusive os dependentes de voltagem) e glibenclamida (bloqueador de canais de K⁺ dependente de ATP), mas não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com 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). De acordo com o presente trabalho pode-se concluir que os mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva causada pelo SVBS em camundongos envolvem a participação dos sistemas glutamatérgicos, peptidérgicos e vanilóides e canais de potássio.

Palavras-chave: selênio, nocicepção, mecanismos, glutamato, canais de potássio.

ABSTRACT

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

Evaluation of mechanisms involved in the antinociceptive action of bis selenide in mice

AUTHOR: Cristiano Ricardo Jesse
ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira
CO-ADVISOR: Gilson Zeni

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, March, 2009

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, bis selenide is known as a safe drug when administered acutely to mice at doses that have antiinflammatory and antinociceptive activities. Therefore, the search for 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 antinociceptive properties, as well as the possible mechanisms involved in this process. The oral administration of bis selenide caused significant inhibition of the biting behavior induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate, kainate, (\pm)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (*trans*-ACPD), capsaicin, substance P (SP), interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) but completely failed to affect the nociception induced by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA). In addition, the oral administration (p.o.) of bis selenide caused a significant increase in hot plate (55 °C) response latency. The antinociceptive effect caused by bis selenide in the hot plate test was reversed by i.t. injection of several K⁺ channel blockers tetraethylammonium (TEA, non-selective voltage-dependent K⁺ channel inhibitor) and glibenclamide (ATP-sensitive K⁺ channel inhibitor) but was not significantly reversed by pre-treatment of animals with apamin and charybdotoxin (large- and small-conductance Ca²⁺- activated K⁺ channel inhibitors, respectively). These results suggest the participation of glutamatergic, peptidergic and vanilloid systems and potassium channel in the antinociceptive action caused by bis selenide in mice.

Key words: selenium, nociception, mechanisms, glutamate, potassium channel.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1:** Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônio sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. 9
- Figura 2:** Representação esquemática dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos. + significa estimula e – significa inibe. 10
- Figura 3:** 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. 11
- Figura 4:** Estrutura química do ebselen 25
- Figura 5:** Estrutura química do disseleneto de difenila 25
- Figura 6:** Estrutura química dos derivados selenetos bis alcenos 27
- Figura 7:** Estrutura química do composto 1c 28

DISCUSSÃO

- Figura 8:** Possíveis sítios de ação do SVBS 43

ARTIGO 1

- Figure 1:** Chemical structure of (Z)-2,3-bis(4-chlorophenylselenanyl)prop-2-en-1-ol 32
- Figure 2:** Effect of bis-selenide administered orally (5–50 mg/kg) against glutamate (175 nmol/site, i.t., A), AMPA (135 pmol/site, i.t., B) NMDA (450 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. 32
- Figure 3:** Effect of bis-selenide administered orally (5–25 mg/kg, p.o.) on the nociceptive behavior induced by TNF- α (0.1 pg/site, i.t., A) or IL-1 β (1 pg/site, i.t., B). 33
- Figure 4:** Effect of bis-selenide (5–25 mg/kg, p.o.) on the biting 34

response caused by injection of substance P (SP, 135 ng/site, i.t., A) or capsaicin (30 ng/site, i.t., B).

Figure 5: Effect of bis-selenide administered orally on the hot plate test in mice. Animals were pre-treated orally with bis-selenide at various doses (from 1 to 50 mg/kg) for 30 min prior to hot plate at 55 °C.

34

Figure 6: Effect of pre-treatment of mice with tetraethylammonium (TEA; 1 µg/site, i.t.; panel A), apamin (50 ng/site, i.t.; panel B), charybdotoxin (250 pg/site, i.t., panel C) and glibenclamide (100 µg/site, i.t.; panel D) on the antinociceptive profiles by bis selenide (50 mg/kg, p.o) on the hot plate test in mice.

35

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: The mean ID₅₀ and maximal inhibition values for the antinociceptive action of bis-selenide in intrathecal injection of different algogen agents in mice

33

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µmol/kg	micromol por quilograma
AINEs	antiinflamatórios não esteroidais
AMPA	ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolo-propiónico
AMPC	adenosina monofosfato-cíclico
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BK	bradicinina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
DI ₅₀	dose que inibe a resposta em 50%
GMPc	guanosina monofosfato-3'-5'-cíclico
GTP	guanosina trifosfato
ICAM-1:	molécula de adesão intercelular
i.c.v.	intracerebroventricular
iGluRs	receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL-1β	interleucina-1 beta
iNOS	sintase do óxido nítrico induzida
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	inositol trifosfato
i.t.	intratecal
L-NAME	N ^ε -nitro-L-arginina metil éster
L-NOARG	N ^ω -nitro-L-arginina
LOX	lipoxigenase
m/s	metros por segundo
mg/Kg	miligramas por quilograma
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
mGluRs	receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mm	milímetros
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NK	neurocinina
NK ₁	neurocinina 1
NK ₂	neurocinina 2
NK ₃	neurocinina 3
NKA	neurocinina A
NMDA	ácido N-metil-D-aspártico
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PAG	substância cinzenta periaquedutal
P2X ₃	receptor purinérgico ionotrópico 3
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
p.o	<i>per oral</i>
RVM	medula rostroventromedial
s.c.	subcutânea
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SP	substância P
SVBS	seleneto vinílico bis substituído
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
trans-ACPD	ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
TEA	tetraetilamônio
TRPV1	receptor vanilóide transiente do tipo 1

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

APRESENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Dor	5
3.1.1 Transmissão da dor	7
3.1.2 Processamento central da dor	11
3.1.3 Mediadores químicos e canais iônicos	14
3.1.3.1 Glutamato	14
3.1.3.2 Substância P	16
3.1.3.3 Receptor vanilóide potencial transitório tipo 1 – TRPV1	17
3.1.3.4 Interleucina – 1 β (IL-1 β)	18
3.1.3.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	19
3.1.3.6 Canais de potássio (K ⁺)	20
3.2 Selênio	22
3.2.1 Características químicas	22
3.2.2 Biodisponibilidade do selênio	22
3.2.3 Atividade biológica	23
3.3 Compostos orgânicos de selênio	24
3.3.1. Ebselen	24
3.3.2 Disseleneto de difenila	25
3.3.2.1 Propriedades farmacológicas	26
3.3.3 Seleneto vinílico bis substituído	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO	29

4.1 Mecanismos espinhais do efeito antinociceptivo	30
causado pela administração oral do bis-seleneto em camundongos	
4.1.1 Artigo 1: Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused	31
by oral administration of bis-selenide in mice	
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	44
7. PERSPECTIVAS	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item ARTIGO CIENTÍFICO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no ARTIGO CIENTÍFICO e representam a íntegra deste estudo. Os itens, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico neste trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A dor é o principal sintoma clínico que leva os indivíduos a procurar serviços primários de saúde. Embora a dor seja fundamental para a manutenção da integridade física, gera conseqüências desagradáveis tais como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas (ex: isolamento social, ausência no trabalho), portanto, deve ser rapidamente e efetivamente tratada (Loeser e Melzack, 1999; Brennan et al., 2007).

Dentre os diversos sistemas de “vigilância” da homeostase do organismo, a dor tem papel de destaque por despertar nossa atenção imediata. 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 desses propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de resolver 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).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. As 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 (Millan, 1999; 2002). 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 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). Nesse contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória são empregadas no tratamento da dor. Na verdade, a

grande maioria dos fármacos presentes no mercado, que são utilizados para o controle da dor, possui 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.

As duas principais classes de analgésicos utilizadas na terapia atual para o tratamento da dor são os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), que, embora eficazes, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (Negus et al., 2006; Woodcock et al., 2007). Dentre os efeitos adversos apresentados pelos analgésicos opióides, o principal fator limitante é o aparecimento da tolerância analgésica, já entre os AINEs, o problema mais frequente está relacionado às complicações gastrintestinais (Henry et al., 1996; Collett et al., 1998; Mercadante, 1999; Whittle, 2003).

Desta forma, os compostos orgânicos que contem selênio são uma nova alternativa terapêutica. Dentre estes podemos destacar o ebselen, o qual apresenta atividades antinociceptiva e antiinflamatória, as quais podem ser resultantes da capacidade de neutralizar o peroxinitrito e inibir a proteína quinase C (PKC), a óxido nítrico sintase (NOS) e a 5-lipoxigenase (LOX-5) (Parnhan e Graf, 1987; Cotgreave et al., 1989; Schewe, 1995; Walther et al., 1999; Mugeshe et al., 2001). Estudos 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). O disseleneto de difenila, administrado pela via subcutânea (s.c), intraperitoneal (i.p.) ou oral (p.o) apresenta propriedades farmacológicas tais 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, 2007a, b, c; Burger et al, 2004, 2006).

O composto seleneto vinílico bis substituído (SVBS), foco deste trabalho, foi escolhido a partir de um estudo realizado com a classe dos derivados bis selenetos (Savegnago et al., 2006). Neste estudo, compostos pertencentes a classe dos bis selenetos foram avaliados em ensaios *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, dois compostos foram escolhidos para a realização de testes de nocicepção em camundongos. Os compostos denominados **1c** (o qual apresenta três grupos metil ligados ao anel benzênico) e **1d** (o qual apresenta um átomo de cloro em cada anel benzênico) injetados pela via subcutânea em camundongos, demonstraram efeitos antinociceptivos em modelos químicos (contorções abdominais induzidas por ácido acético e capsaicina) e térmico (imersão da cauda em água a 55°C) de nocicepção. Tendo em vista que até o momento as atividades farmacológicas atribuídas ao SVBS foram obtidas a partir da administração pela via subcutânea, tornou-se importante investigar se o composto SVBS possuía efeito antinociceptivo em modelos que envolvem estruturas do sistema nervoso central (SNC) quando administrado pela via oral.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a ação antinociceptiva do composto SVBS, administrado pela via oral, através da injeção intratecal de agentes flogísticos e bloqueadores de canais de potássio em camundongos.

Objetivos Específicos

Considerando os aspectos já mencionados, os objetivos específicos deste trabalho compreenderam:

- § Avaliar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do SVBS através da injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos, citocinas, substância P e capsaicina em camundongos.
- § Investigar o possível efeito antinociceptivo do SVBS no modelo térmico de nocicepção da chapa quente (hot plate) em camundongos.
- § Determinar o possível envolvimento dos canais de potássio no efeito antinociceptivo do SVBS no modelo térmico de nocicepção em camundongos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 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 é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) 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). Portanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos no cérebro (Julius e Basbaum, 2001). Nesse sentido, a dor parece ser influenciada por fatores fisiológicos (sensoriais) e 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 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 (Loeser e Melzack, 1999; Lotsch e Geisslinger, 2001). 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 frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imunológica anormal ou lesão nervosa (Stein et al., 2003). Na dor crônica, muitos eventos ocorrem em associação com 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 frequência e duração dos impulsos aferentes. 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).

3.1.1 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, a qual normalmente não é responsivo a estímulos. Entretanto, quando influenciado por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresenta atividade espontânea ou torna-se sensibilizado e responde 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 μ m de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s); 2) fibras A α : médias (2 a 6 μ m de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s) e 3) fibras A δ : espessas (mais de 10 μ m de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (Julius e Basbaum, 2001) (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 α 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 P2X₃, o receptor para o fator neurotrófico derivado da glia Ret e sítios de ligação para a isolecitina B₄, 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 δ , 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 δ do tipo I, respondem a estímulos de calor intenso (até 53 °C) e fibras A δ 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 δ 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).




	Aα e Aβ 	Aδ (I e II) 	C 
Tipos de fibras			
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μm	2-6 μm	0,4-1,2 μm
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 neurônios sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001.

Neste 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. 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. Na transmissão nociceptiva, mediadores liberados a partir de células inflamatórias participam de um quadro crônico (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, taquicinas, CGRP, SP, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), serotonina, citocinas, óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), prótons, entre outros. Além desses, 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 transmissão da dor, tanto no SNP quanto SNC. 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 (IP3), diacilglicerol (DAG), aumento de cálcio intracelular e ativação de canais iônicos. Estes eventos iniciais induzem a ativação secundária de quinases intracelulares tais como a PKA e PKC.

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).

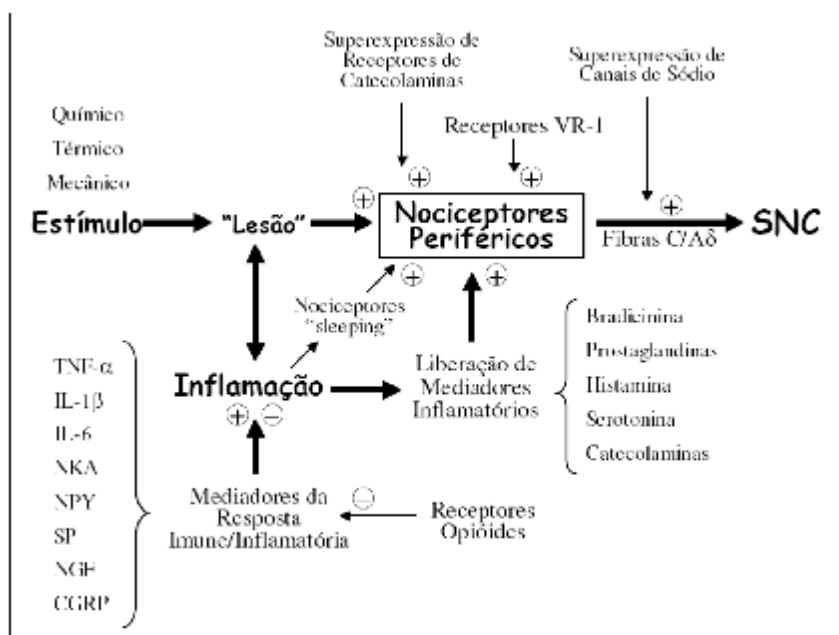


Figura 2: Representação esquemática dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos. + significa estimula e – significa inibe. Adaptado a partir de Hill, 2001.

3.1.2 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.

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 3) 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 δ têm suas terminações principalmente nas lâminas superficiais, mas também em lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinhal, onde liberam diversos neurotransmissores. Estudos mostram que as maiores das fibras associadas à 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).

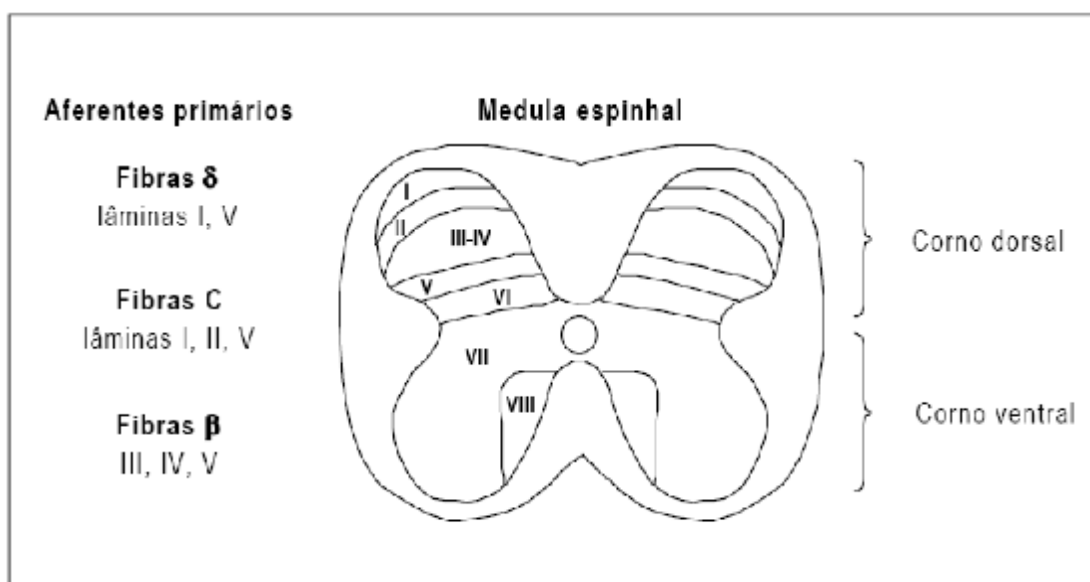


Figura 3: Diagrama esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal que recebem as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes. Adaptado a partir de Craig e Dostrovsky et al., 1999.

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 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, espinoparabraquiohipotalâmico, 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). 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 a ativação de múltiplos canais sensoriais, que irão convergir e interagir

com estruturas supra-espinhais, promovendo a sensação global de dor (Millan, 1999).

3.1.3 Mediadores químicos e canais iônicos

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, taquicinas, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo) entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no SNP quanto no SNC (Besson, 1999; Fürst, 1999; Millan, 1999; Calixto et al., 2000). Dentre os vários mediadores químicos e canais iônicos da dor e/ou inflamação, o glutamato, a SP, as citocinas e os canais de potássio e de cálcio desempenham papéis importantes.

3.1.3.1 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 SNC, 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 pela 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” (iGluRs) e os receptores glutamatérgicos “metabotrópicos” (mGluRs). Os iGluRs 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), ácido α -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 mGluRs dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com a sua homologia: o grupo I (mGluR 1 e 5), grupo II (mGluR 2 e 3) e grupo III (mGluR 4, 6, 7 e 8). Os mGluRs 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 (Tang e Aizenman, 1993; Goslan e Ben-Ari, 1995; Trotti et al., 1997). 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; Lipton e Rosenberg, 1994; Reynolds e Hastings, 1995; Singh et al., 2003). 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).

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 cetamina, produz efeitos colaterais importantes, tais como sedação, disforia e alucinação, que limitam sua utilização (Martin e Eisenach, 2001).

3.1.3.2 Substância P (SP)

A SP é um neuropeptídeo amplamente distribuído no organismo, onde atua como neurotransmissor e neuromodulador. Recentemente, receptores da SP (principalmente o subtipo NK_1) foram observados não somente em neurônios e células imunológicas como também em 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_1 , NK_2 e NK_3), preferencialmente no subtipo NK_1 , o qual se localiza preferencialmente na lâmina 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).

Estudos demonstram a interação que existe entre a SP e o glutamato na medula espinhal, de fato, os receptores NMDA pré-sinápticos localizados nas terminações das 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).

3.1.3.3 Receptor vanilóide potencial transitório tipo 1 – (TRPV1)

A descoberta de uma classe de canais de cálcio, a superfamília de receptores potenciais transitórios permitiu um maior entendimento dos mecanismos de influxo de cálcio em uma grande variedade de células. Canais TRP são expressos em células excitáveis e não excitáveis e representam vias primárias de entrada do íon. O primeiro receptor TRP foi identificado como um componente central do complexo de fototransdução da mosca drosófila (Cosenns et al., 1969). Atualmente, os receptores TRP são agrupados nas seguintes subfamílias TRPCs (clássicos ou canônicos), TRPVs (vanilóides), TRPMs (melastatínicos), TRPPs (policistínicos), TRPMLs (mucopolínicos), TRPAs (anquirínicos) e TRPNs (NOMP: no mechano-potential) (Nilius et al., 2005; Minke, 2006).

Devido às suas propriedades na transdução de estímulos sensoriais e não sensoriais, a subfamília TRPV (1 a 6) tem recebido crescente atenção. Os membros deste grupo apresenta sensibilidade a diversos estímulos ambientais, nocivos ou não, incluindo pimentas e outros derivados vegetais, mediadores inflamatórios, calor, prótons, estímulos osmo- e mecano-sensoriais.

A capsaicina, o princípio ardente da pimenta vermelha do gênero *Capsicum*, é um irritante natural, como o olvanil, o eugenol e a resiniferatoxina (coletivamente denominados vanilóides), que provocam dor ativando receptores específicos em terminações nervosas. A despolarização de nociceptores polimodais C em mamíferos, por influxo de cálcio através de

canais vanilóides, causa a liberação neuronal de SP e outros neuropeptídeos, como o CGRP, a somatostatina e o peptídeo intestinal vasoativo (Kalil-Gaspar, 2003).

Em mamíferos, o TRPV 1 funciona como um receptor primário para estímulos nocivos, apesar de outras funções poder existir. O TRPV1 é fortemente expresso em neurônios sensoriais, incluindo nos gânglios da raiz dorsal e trigeminais, com expressão moderada em fibras nervosas de outros tecidos. Um aspecto importante do funcionamento do TRPV1 é a sua sensibilização por um ou mais estímulos e/ou por compostos endógenos. A exposição de células que expressam TRPV1 a um meio ácido sensibiliza o receptor à ativação por calor, reduzindo seu limiar. Do mesmo modo, prótons sensibilizam o receptor aos efeitos da capsaicina (Calixto et al., 2005).

Apesar de sua presença no SNC de mamíferos, o TRPV1, sob condições fisiológicas, dificilmente é ativo por pH baixo ou calor, o que sugere uma regulação preferencial por ligantes endógenos, os chamados endovanilóides. Este grupo compreende a anandamida, N-araquidonoidopamina e produtos da lipoxigenase (15-HPETE e 12-HPETE) (Calixto et al., 2005). Esta habilidade de integrar vários estímulos faz com que o TRPV1 seja um importante receptor de modulação e um promissor sítio para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da dor. Esta expectativa é baseada em estudos recentes que demonstraram que há um aumento da expressão do TRPV1 em tecidos obtidos de pacientes afetados com condições patológicas como doenças inflamatórias, hiperalgesia e carcinoma (Calixto et al., 2005).

3.1.3.4 Interleucina - 1 β (IL-1 β)

A interleucina – 1 β é uma família composta por três diferentes peptídeos, estruturalmente relacionados, frutos da expressão de três genes distintos. São eles os dois agonistas, a interleucina-1 α e a interleucina -1 β e um antagonista, a proteína antagonista do receptor de interleucina -1 (Dhar et al., 2000).

A interleucina-1 afeta basicamente todos os tecidos e sistemas orgânicos; ela é o protótipo da citocina pró-inflamatória, já que induz a expressão de uma variedade de genes e a síntese de proteínas capazes de

induzir alterações inflamatórias crônicas e agudas. Ela é, ainda, a típica citocina de “alarme” na medida em que age sobre diversas células-alvo para induzir ou amplificar uma variedade de mecanismos de defesa, particularmente respostas hematológicas e imunológicas.

A interleucina foi originalmente descrita na década de 40 como uma proteína termo-lábil encontrada no exsudato granulocítico e que, quando injetada em humanos ou animais produzia febre; nesta época ela era chamada de pirógeno endógeno. Atualmente é conhecido seu amplo espectro de atividades tais como a estimulação de linfócitos *in vitro*; estimulação *in vitro* de condrócitos para produzir prostaglandina E₂ (PGE₂) (May et al., 1990) e produção de espécies reativas do oxigênio (Laurindo et al., 1997).

Dado o impacto dos eventos desencadeados pela ligação da IL-1 β a seu receptor, especial atenção foi dada aos eventos fisiológicos através dos quais ocorreria a regulação desta ligação nos tecidos. Esta regulação pode ocorrer através de mecanismos e fatores que antagonizam os efeitos da IL-1 β e estes possuem aplicação práticas nas enfermidades mediadas por ela como nos processos inflamatórios.

3.1.3.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é um importante mediador pró-inflamatório, pertencente ao grupo das citocinas. Esta citocina é uma glicoproteína da membrana plasmática celular, sintetizada na forma de um precursor de 223 aminoácidos, com peso molecular de 26 kDa e constituída por um domínio intracelular (Vassali, 1992). Após a síntese, o TNF- α é inicialmente estocado no complexo de Golgi, em regiões perinucleares, sendo transportado por pequenas vesículas, até a região transmembrânica das células, onde pode permanecer em sua forma precursora (imatura), acoplada à membrana ou ser clivado, enzimaticamente, entre os aminoácidos alanina 76 e valina 77, pela enzima TACE (TNF- α Converting Enzyme), resultando na liberação do TNF- α solúvel com 157 aminoácidos e peso molecular de 17 kDa, para o espaço extracelular (Pennica et al., 1984).

Diversos tipos celulares são capazes de produzir e secretar o TNF- α , após estimulação apropriada. No entanto, os monócitos e os macrófagos são as principais fontes, produzindo grandes quantidades desta citocina (Vassali et

al., 1992). Outros tipos celulares incluem os linfócitos T, os neutrófilos, as células endoteliais e os mastócitos, sendo estas últimas, ainda, capazes de estocar o TNF- α em grânulos citoplasmáticos (Gordon et al., 1990). Após estímulos físicos (luz ultravioleta, radiação-X), químicos e imunológicos, ocorre a liberação de TNF- α por essas células (Vassali et al., 1992).

Para exercer seus efeitos biológicos, o TNF- α é liberado no espaço extracelular e interage com dois tipos de receptores de superfície celular: o TNFR1 e o TNFR2. A interação do TNF- α com o receptor TNFR1 desencadeia uma sinalização intracelular que resulta em eventos pró-inflamatórios e apoptose, associados à lesão tecidual. Por outro lado, os eventos desencadeados pela interação do TNF- α ao receptor TNFR2 são pouco conhecidos e têm sido associados ao reparo de tecidos e à angiogênese (Bradley, 2008). Desse modo, a interação do TNF- α ao receptor TNFR1 é suficiente para induzir respostas citotóxicas e pró-inflamatórias, enquanto a interação ao receptor TNFR2 pode promover ativação, migração ou proliferação celulares.

As ações biológicas do TNF- α incluem um amplo espectro de efeitos. Sabe-se que o TNF- α está diretamente envolvido na patogênese do choque séptico, induzido por bactérias gram-negativas e na patogênese da caquexia (Dinarello, 1991). O TNF- α participa de vários eventos inflamatórios, como a ativação de neutrófilos e consequente desgranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio, aumento da citotoxicidade para certos patógenos e aumento da atividade fagocítica, quimiotaxia dessas células e de monócitos, bem como o aumento da expressão das moléculas de adesão P-selectina, E-selectina e ICAM-1. O TNF- α é reconhecido como mediador relevante nos processos inflamatórios e a terapia atual, para o tratamento da dor, durante esse processo, baseia-se no antagonismo do TNF- α e de seus receptores (Bradley, 2008).

3.1.3.6 Canais de potássio (K⁺)

A primeira evidência que canais mediavam o fluxo de K⁺ em células foi dada por experimentos conduzidos por Hodgkin e Keynes em 1955. Usando axônios, eles mostraram o fluxo de isótopo ⁴²K⁺ através de membranas dessas

células. Após duas décadas, foi demonstrado através de métodos eletrofisiológicos que íons cruzam as membranas celulares através de poros protéicos específicos cada cada tipo de íon (Hille, 1973).

Os canais de K^+ são membros de uma família de proteínas que permite a rápida difusão de íons K^+ pela membrana plasmática, a favor de um gradiente de concentração. Eles desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade neural e propagação de sinal pelo sistema nervoso. A abertura destes canais leva a uma hiperpolarização da membrana plasmática, resultando em uma redução na excitabilidade da célula (Hille, 1973). A diversidade entre os membros desta família esta relacionada principalmente com o tipo de estímulo capaz de causar a abertura do canal e difusão dos íons K^+ , processo que é regulado por uma variedade de estímulos como alterações na voltagem da membrana plasmática, níveis intracelulares de certos íons e moléculas orgânicas e proteínas (Ca^{2+} , ATP, AMPc, sub-unidades de proteínas G).

Os canais de K^+ são um alvo terapêutico para regulação da dor porque suprimem os neurônios nociceptivos pela hiperpolarização nestes neurônios (Wood et al., 2004). Muitos estudos demonstram a importância dos canais permeáveis ao potássio na modulação da percepção da dor principalmente no SNC (Ocaña et al., 2004). A administração intracerebroventricular de substâncias bloqueadoras dos canais permeáveis ao potássio reduziram a antinocicepção causada pela morfina (Ocaña et al., 1990). Além disso, há um grande número de estudos experimentais e clínicos que demonstram que a modulação dos canais permeáveis ao potássio é uma via importante no efeito antinociceptivo de drogas como os AINES, antidepressivos tricíclicos e drogas opióides (Ocaña et al., 2004). As idéias em relação dos canais permeáveis ao potássio foram reforçadas com estratégias utilizando a técnica “antisense” ou animais nocautes. Conseqüentemente, os canais permeáveis ao potássio tornaram-se um alvo terapêutico para novas drogas analgésicas e os estudos utilizando drogas que bloqueiam os canais iônicos são largamente empregados em modelos agudos e crônicos de nocicepção (Ocaña et al., 2004).

3.2 Selênio

3.2.1 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 (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (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), em que ocorre a substituição do átomo de S pelo átomo de Se (Klayman e Günther, 1973).

3.2.2 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 (Wanger et al., 1976).

Após a absorção, os maiores níveis de selênio estão localizados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unhas 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 gárfico 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).

3.2.3 Atividade biológica

O interesse em relação ao selênio tem aumentado 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 cambalejar (*blind staggers*), uma doença de caráter agudo que compromete o SNC (Martin e Gerlack, 1972).

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). 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).

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a antioxidante mais importante. 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 sítios ativos 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.

3.3 Compostos orgânicos de selênio

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm sido alvo 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; Nogueira et al., 2004). Dentre os compostos orgânicos de selênio estudados no nosso grupo de pesquisa destacam-se o ebselen e o disseleneto de difenila.

3.3.1 Ebselen

O ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) (Figura 4) 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; Imai et al., 2001).

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 (Parnham e Graf, 1987; 1991; 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 (Mugesh 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 (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). 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 lesões 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 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).

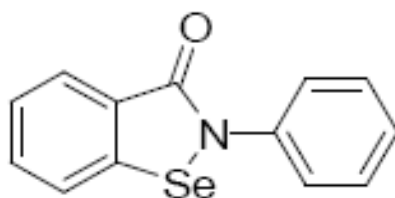


Figura 4: Estrutura química do ebselen

3.3.2 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (figura 5) 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 grupo de pesquisa tem investigado amplamente as propriedades farmacológicas e /ou toxicológicas do disseleneto de difenila.

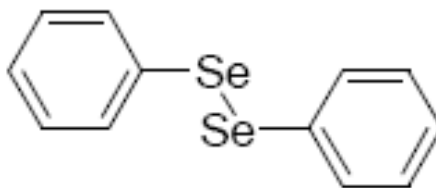


Figura 5 - Estrutura química do disseleneto de difenila

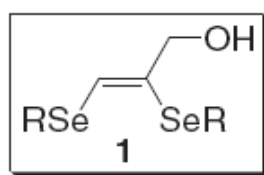
3.3.2.1 Propriedades farmacológicas

O disseleneto de difenila é conhecido por ser mais ativo como mimético da selenoenzima glutathione peroxidase (Meotti et al., 2004) que o ebselen. 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). Dados da literatura também indicam que esse composto orgânico de selênio apresenta várias propriedades farmacológicas, tais como anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), hepatoprotetor (Borges et al., 2006), antidepressivo (Savegnago et al., 2007d; 2008) e também protege contra a discinesia orofacial induzida por reserpina e haloperidol (Burger et al., 2004, 2006). Rosa et al (2006) demonstraram que o disseleneto de difenila administrado em camundongos induz à 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 ou pela via oral apresenta ação antinociceptiva, antiinflamatória e anti-hiperalgésica em camundongos e ratos (Zasso et al., 2005; Savegnago et al., 2007 a, b, c). Sendo que, o possível mecanismo envolvido na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila parece envolver a via glutamatérgica (receptores NMDA) adenosinérgica (receptores A_{2B}), canais de potássio, via do óxido-nítrico/l-arginina e serotoninérgica (Savegnago et al., 2007 a, b, c).

3.3.3 Seleneto vinílico bis substituído

Os derivados selenetos bis alcenos foram alvo de estudos para determinar as atividades antinociceptiva e antioxidante. Os compostos

denominados **1c**, **1d** e **1e** (Figura 6) demonstraram os melhores resultados nos estudos da atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica *in vitro* e o composto **1d** apresentou a menor CI_{50} . Os compostos mais promissores, **1c** e **1d**, foram administrados pela via subcutânea nas doses de 5 a 50 mg/kg e avaliados em testes nociceptivos (Savegnago et al., 2006). Os compostos apresentaram efeito antinociceptivo no teste das contorções induzidas por ácido acético, com DI_{50} de >50 e 14.61 mg/kg, respectivamente. Além disso, os compostos **1c** e **1d** inibiram de maneira significativa o tempo de lambida induzida pela capsaicina em camundongos. Os compostos também foram avaliados no teste de nocicepção térmica da imersão da cauda em água a 55°C e mostraram efeito antinociceptivo que não foi prevenido pela pré-administração de naloxona (antagonista opióide) (Savegnago et al., 2006).



1a - R = C₄H₉

1b - R = C₆H₅

1c - R = 2,4,6-Me₃C₆H₂

1d - R = 4-ClC₆H₄

1e - R = 4-MeOC₆H₄

Figura 6 - Estrutura química dos derivados selenetos bis alcenos

Após o trabalho de seleção dos compostos mais promissores, o grupo avaliou os compostos **1c** (figura 7) e **1d** (figura 6) em novas metodologias de testes nociceptivos. Assim, o composto **1c** foi administrado oralmente em modelos nociceptivos químicos em ratos e camundongos (Jesse et al., 2007). O composto apresentou atividade antinociceptiva na primeira e na segunda fase do teste da formalina em ratos. Este efeito foi bloqueado pela pré-administração de N^G-L-nitro-arginina-metil ester (inibidor da óxido nítrico sintase), azul de metileno (inibidor da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase) e glibenclamida (inibidor dos canais de potássio sensíveis ao ATP) e não pela atropina (antagonista muscarínico). Além disso, o composto inibiu o tempo de

lambida e diminuiu o edema de pata induzido por serotonina, histamina, composto 48/80 e glutamato.

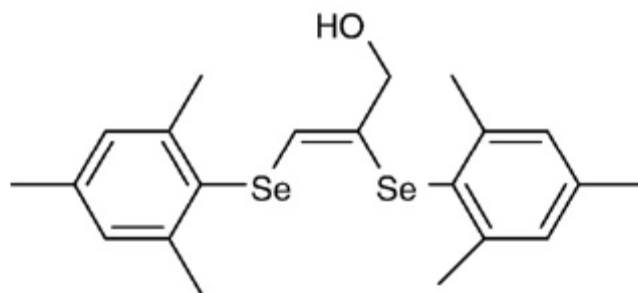


Figura 7 - Estrutura química do composto **1c**

4- ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo, estruturados de acordo com as normas da revista Brain Research.

4.1 Mecanismos espinhais do efeito antinociceptivo causado pela administração oral do bis-selenide em camundongos

4.1.1 Artigo 1

Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis-selenide in mice

Cristiano R. Jesse, Lucielli Savegnago, Cristina W. Nogueira

Brain Research 1231 (2008) 25-33



Research Report

Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis-selenide in mice

Cristiano R. Jesse, Lucielli Savegnago, Cristina W. Nogueira*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted: 26 June 2008

Available online 2 July 2008

Keywords:

bis-selenide

Selenium

Glutamatergic receptor

Cytokine/pro-inflammatory

K⁺ channels

Antinociception

Mice

ABSTRACT

The present study was designed to investigate further the mechanisms involved in the antinociception caused by bis-selenide in behavioral model of pain in mice. Bis-selenide (5–50 mg/kg), given orally, produced significant inhibition of the antinociceptive behavior induced by intrathecal (i.t.) injection of glutamate (175 nmol/site), kainate (110 pmol/site) and (4*S*)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD; 50 nmol/site) and the maximal inhibitions observed were 37.1%, 46.1% and 73.1%, respectively. Bis-selenide failed to affect the nociception induced by α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA; 135 pmol/site) and N-methyl-D-aspartate (NMDA; 450 pmol/site). This compound also reduced the nociceptive response induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 0.1 μ g/site), interleukin-1 α (IL-1 α ; 1 μ g/site), substance P (SP) (135 ng/site, i.t.) and capsaicin (50 ng/site) and the inhibitions observed were 81.7%, 83.1%, 77.1% and 67.1%, respectively. The oral administration of bis-selenide (25–50 mg/kg) in mice caused a significant increase in the reaction time to thermal stimuli in the hot plate test and the mean ED_{50} value (and the 95% confidence limits) was 20.37 (15.00–25.74) mg/kg. The antinociceptive effect caused by bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) on the hot plate test in mice was reversed by intrathecal (i.t.) injection of some K⁺ channel blockers such as tetraethylammonium (TEA, non-selective voltage-dependent K⁺ channel inhibitor) and glibenclamide (ATP-sensitive K⁺ channel inhibitor), but not spamin and charybdotoxin (large- and small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel inhibitors, respectively). Together, these results indicate that bis-selenide produces antinociception at spinal sites through the activation of ATP-sensitive and voltage-gated K⁺ channels and interaction with kainate and trans-ACPD receptors as well as vanilloid and neuropeptide receptors and pro-inflammatory cytokines.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The complex and multidimensional nature of pain necessitates consideration of numerous factors that contribute to this experience (emotional, motivational, psychological conditions) (Julius and Basbaum, 2001). The nociception involves

the activation of specific primary sensory neuron subpopulations that transmit the nociceptive information to the spinal cord from where it is relayed to supra spinal levels (Millan, 1998). Following tissue damage can result in activation of nociceptors through the release of several neurotransmitters and neuromodulator as substance P, glutamate, bradyki-

* Corresponding author. Fax: +55 51 32208978.

E-mail address: cristo@quimica.ufsm.br (C.W. Nogueira).

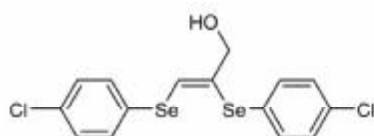


Fig. 1 – Chemical structure of (Z)-2,3-bis(4-chlorophenylselenanyl)prop-2-en-1-ol.

min, prostaglandin, histamine, serotonin, and cytokines such as TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β (interleukin-1 β) and interleukin-18 among others (Gilchrist et al., 1998). As a result, the sensitization of primary afferent fibers transmits pain messages to the dorsal-horn neurons and, subsequently, to the higher brain centre, resulting in the establishment of pain (Basbaum and Jessel, 2000; Julius and Basbaum, 2001).

Many studies indicated that the K⁺ channels play key roles in setting the resting membrane potential and in controlling neuronal activity and signal propagation throughout the nervous system (Hille, 2001). Many studies have focused on the role of K⁺ channels in pain. It has been reported that these channels contribute to the modulation of pain perception in central nerve system (Ocano et al., 2004). While K⁺ channel openers (i.c.v) result in an antinociception, K⁺ channel blockers reduce antinociception produced by morphine (Ornott et al., 1990). 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).

These seleno alkene derivatives are obtained at the first chalcogenation reaction of alkynes by a one-pot procedure to selectively prepare bis-vinyl chalcogenides, avoiding the previous preparation of chalcogen alkynes (Moro et al., 2005). Bis-selenide (Fig. 1) displayed antioxidant and antinociceptive

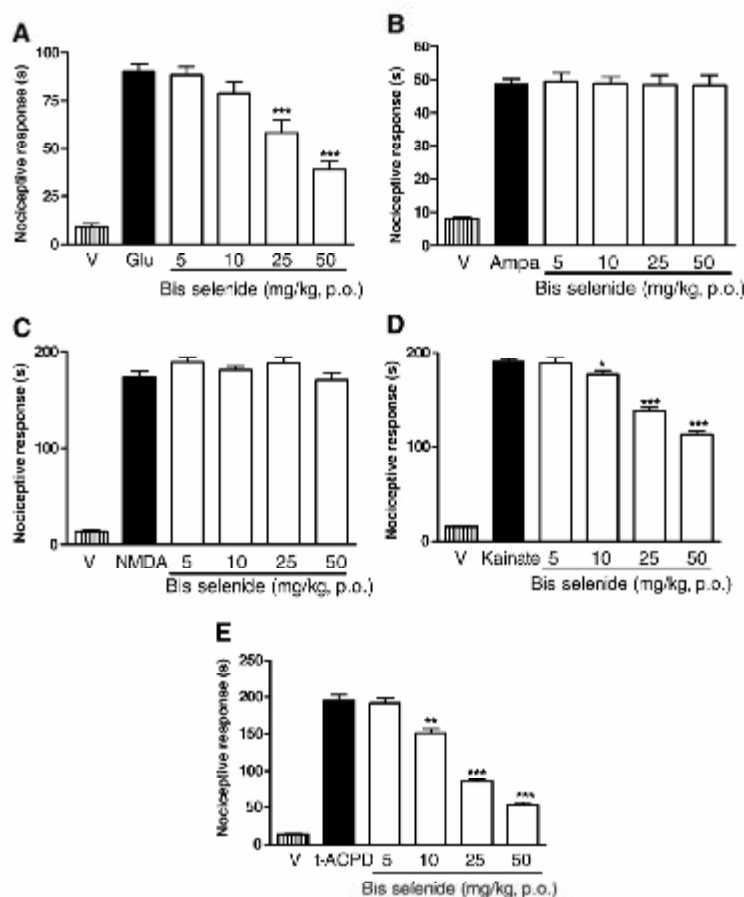


Fig. 2 – Effect of bis-selenide administered orally (5–50 mg/kg) against glutamate (175 nmol/site, i.t., A), AMPA (135 pmol/site, i.t., B) NMDA (450 pmol/site, i.t., C), kainate (110 pmol/site, i.t., D) or *trans*-ACPD (50 nmol/site, i.t., E) – induced biting in mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. 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).

properties in mice (Savegnago et al., 2006). Moreover, the antinociceptive action of bis-selenide is not influenced by opioidergic mechanism (Savegnago et al., 2006). Additionally, bis-selenide inhibited the licking and the oedema induced by glutamate, histamine, serotonin and compound 48/80 in the hindpaw of mice. The involvement of nitric oxide/cyclic GMP and K^+ channel pathways in the antinociceptive effect of bis-selenide in the formalin test in rats was also reported (Jesse et al., 2007).

Therefore, based on a previous study demonstrating that subcutaneous injection of bis-selenide elicits antinociceptive properties in mice (Savegnago et al., 2006), the purpose of the present study was to further investigate the role played by the spinal ionotropic and metabotropic glutamatergic receptors as well as substance P (SP), capsaicin (CAP), IL-1 β and TNF- α in the antinociception caused by oral administration of bis-selenide in mice. Additionally, we investigated the antinociceptive activity induced by bis-selenide in the hot plate test in mice and determined the possible participation of the K^+ channel pathway in the antinociception induced by bis-selenide in the hot plate test.

2. Results

2.1. Effect of bis-selenide on spinal excitatory amino acid (EAA)-induced nociceptive response

Figs 2(A, D and E) shows that bis-selenide (25–50 mg/kg) caused a significant and dose-related inhibition of the nociceptive response to glutamate, kainate and trans-ACPD. The maximal inhibition and ID_{50} values are demonstrated in Table 1. In contrast, bis-selenide had no significant effect against AMPA and NMDA-mediated nociceptive response in mice (Figs 2B and C).

2.2. Effect of bis-selenide on pro-inflammatory cytokine-induced nociceptive response

The results presented in Figs. 3(A, B) show that bis-selenide (5–25 mg/kg), given orally, produced pronounced inhibition of the nociceptive response induced by spinal injections of TNF- α and IL-1 β . The maximal inhibition and ID_{50} values are demonstrated in Table 1.

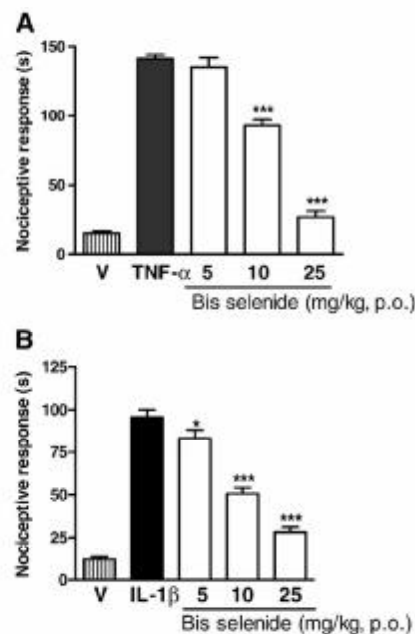


Fig. 3 - Effect of bis-selenide administered orally (5–25 mg/kg, p.o.) on the nociceptive behavior induced by TNF- α (0.1 μ g/site, i.t., A) or IL-1 β (1 μ g/site, i.t., B). Each column represents the mean \pm S.E.M. for six to eight animals. Asterisks denote the significance levels * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared to the control group value (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

2.3. Effect of bis-selenide on substance P or capsaicin-induced nociceptive response

Figs. 4(A, B) shows that bis-selenide, given by oral route (10–25 mg/kg), significantly inhibited the nociceptive response induced by i.t. injection of SP and capsaicin when compared to the control group. The calculated mean ID_{50} and maximal

Table 1 - The mean ID_{50} and maximal inhibition values for the antinociceptive action of bis-selenide in intrathecal injection of different algogen agents in mice

Algogen agents	Bis-selenide	
	ID_{50} ^a (mg/kg)	Maximal inhibition ^b (%)
Glutamate (10 μ mol/site)	58.75 (39.43–78.07)	57 \pm 5
Kainate (10 μ mol/site)	6.92	46 \pm 7
trans-ACPD (50 μ mol/site)	29.45 (25.68–33.52)	75 \pm 3
TNF- α (0.1 μ g/site)	15.99 (15.19–17.82)	81 \pm 3
IL-1 β (1 μ g/site)	16.02 (14.94–18.96)	86 \pm 1
Substance P (125 μ g/site, i.t.)	17.78 (16.39–19.39)	77 \pm 3
Capsaicin (30 μ g/site)	20.11 (18.58–21.78)	67 \pm 3

Each group represents the mean for 6 to 10 animals.

^a ID_{50} with their respective 95% confidence limits.

^b Maximal inhibition.

inhibition values for the antinociceptive effect of bis-selenide against SP and capsaicin are demonstrated in Table 1.

2.4. Effect of bis-selenide on the hot plate test

The oral administration of bis-selenide (25–50 mg/kg) in mice caused a significant increase in the reaction time to thermal stimuli as compared to the control group (Fig. 5). The calculated mean ED_{50} value (and the 95% confidence limits) for bis-selenide-induced antinociception in mice in the hot plate test was 20.37 (15.00–25.74) mg/kg.

2.5. Involvement of K^+ channels in the antinociceptive action caused by bis-selenide

Intrathecal administration of TEA (1 μ g/site) (Fig. 6A) prevented antinociception caused by bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) in the hot plate test in mice. ANOVA yielded significant interaction between groups [$F(2, 49)=41.12$, $P<0.001$] (Fig. 6A) shows that intrathecal administration of glibenclamide (100 μ g/site) prevented the antinociceptive effect caused by bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) in the hot plate test in mice. ANOVA showed significant interaction between groups [$F(1, 38)=36.60$, $P<0.001$].

Conversely, apamin (50 ng/site) (Fig. 6B) failed to affect the antinociceptive action of bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) in the hot plate test in mice. Intrathecal administration of thapsi-

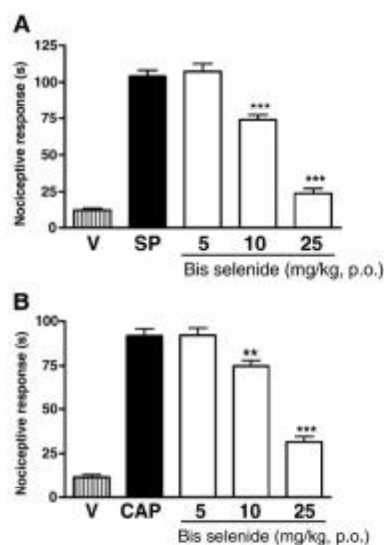


Fig. 4 – Effect of bis-selenide (5–25 mg/kg, p.o.) on the biting response caused by injection of substance P (SP, 130 ng/site, i.t., A) or capsaicin (30 ng/site, i.t., B). Each column represents the mean \pm S.E.M. for six to eight animals. Asterisks denote the significance levels ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ compared to the control group values (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

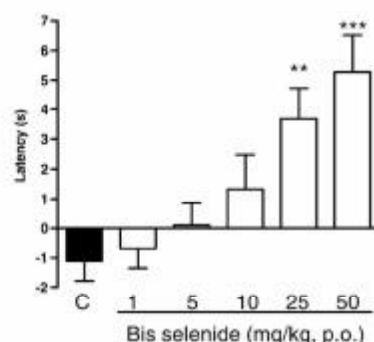


Fig. 5 – Effect of bis-selenide administered orally on the hot plate test in mice. Animals were pre-treated orally with bis-selenide at various doses (from 1 to 50 mg/kg) for 30 min prior to hot plate at 55 °C. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 6–10 mice in each group. Control (C) indicates the animal injected with canola oil. Asterisks denote the significance levels ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ compared to the control group value (closed columns) (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

doxin (250 μ g/site) (Fig. 6C) did not prevent the antinociceptive action of bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) in the hot plate test in mice.

3. Discussion

The results of the present study extend previous data from our research group (Savagnano et al., 2006) and clearly show that the glutamatergic system, more specifically via interaction with kainate and trans-ACPD receptors, plays a critical role in the antinociceptive effect caused by bis-selenide in mice. In fact, bis-selenide caused significant inhibition of glutamate, kainate and trans-ACPD-induced nociceptive response, but did not inhibit the nociceptive response caused by intrathecal injection of AMPA and NMDA. Thus, these findings strongly suggest that the antinociceptive action caused by bis-selenide depends on its interaction with kainate and trans-ACPD receptors.

Several lines of evidence suggest that kainate receptors contribute to transmission of nociceptive information in the spinal cord. Firstly, anatomical studies demonstrated that kainate receptors, or their subunits, are located on primary afferent fibers associated with small neurons in dorsal root (Partin et al., 1993; Sato et al., 1993; Sahara et al., 1997). Secondly, electrophysiological responses to kainate have been found in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons (Agrawal and Evans, 1986; Huettner et al., 1990). Kainate appears to initially depolarize and then desensitize GABAergic neurons that are also excited by capsaicin and alginate that produces nociceptive behaviors in rodents (GJenis et al., 1990) and pain in humans (Neugebauer et al., 1993). Although, NMDA and AMPA receptors are not involved in the antinociceptive response caused by bis-selenide, the activation of GABAergic

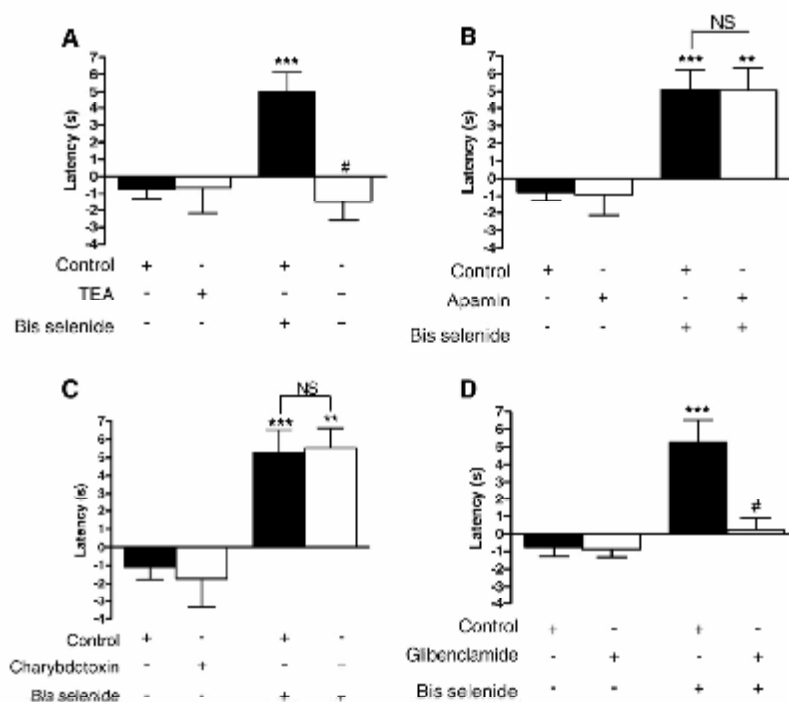


Fig. 6 – Effect of pre-treatment of mice with tetraethylammonium (TEA; 1 µg/site, i.t.; panel A), apamin (50 ng/site, i.t.; panel B), charybdotoxin (250 pg/site, i.t.; panel C) and glibenclamide (100 µg/site, i.t.; panel D) on the antinociceptive profiles by bis-selenide (50 mg/kg, p.o) on the hot plate test in mice. 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 bis-selenide (two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test).

receptor systems in the spinal cord, among them NMDA and AMPA receptors, seems to play a crucial role in the pain (Wills, 2001).

mGluRs are activated by excitatory amino acids (GAA) (glutamate and aspartate), and are coupled to guanine nucleotide regulatory (G) proteins that modulate intracellular messenger systems. For example, application of group I mGluR antagonists to the rat spinal cord attenuates dorsal-horn neuronal activity associated with knee joint inflammation (Nragebaner et al., 1994), carrageen-induced sensitization (Neugebauer et al., 1999) or by repetitive cutaneous application of the sensitive C-fiber activator mustard oil (Young et al., 1994; 1995). Moreover, the role of groups II and III mGluRs in persistent nociceptive processing is less well established. Groups I and II mGluR agonists have been shown to produce an inhibition of dorsal-horn neuronal responses after carrageenan injection to the rat hindpaw (Stanfa and Dickenson, 1988) and antinociceptive effects in the rat formalin test (Fisher and Codony, 1986a, b). It remains to be investigated in future studies whether or not bis-selenide interferes selectively with Group I, Group II or Group III or only in their intracellular second messenger mechanisms.

Evidence in the literature indicates an important cross-talk between glutamate and SP in pain at spinal level (Sieber et al., 2004). In fact, SP co-exists with glutamate in sensory fibres (Ehssi et al., 1988). It has also been reported that intrathecal injection of SP or glutamate in mice induced a behavioral response similar to that caused by noxious stimulation and showed a similar response, consisting of biting, scratching and licking the lumbar and caudal parts of the body. For these reasons, SP or glutamate injection has been widely used for pain models to study the nociceptive/antinociceptive mechanism (Choi et al., 2003a, b). In addition, the modulatory control of glutamatergic receptors on SP release occurs in the rat trigeminal nucleus slices (Cuesta et al., 1999) as well as in other sensory structures such as the spinal cord (Davies and Wajsbom, 1982), thalamus (Sal and Lator, 1995) and hippocampus (Koeberer and Gattman, 1981). In particular, SP may mediate signaling at the synapse between primary nociceptive afferent fibers and spinal dorsal-horn neurons, which are functionally important for the sensation of pain, or nociception (Szaleswary, 1972; Malmberg and Yaksh, 1992). Moreover, there is remaining experimental evidence showing that intrathecal injection of SP in rodents results in a nociceptive response, an

effect that is mediated by its interaction with NK₁ receptors (Clichrist et al., 1996) and, hence, active tachykinin NK₁ receptor antagonists have been shown to be active in the second phase of the formalin test, used as a model of inflammatory pain (Chapman and Dickenson, 1993; Kapnick et al., 1999). Thus, also relevant are the findings showing that bis-selenide, given by oral route, produced an inhibition of SP-induced nociceptive response in mice. On the basis of this finding, we may suggest that antinociceptive effect caused by bis-selenide involved a possible interaction with glutamate and SP receptors and/or with their signal transduction mechanisms.

Another interesting finding of the present study is the demonstration that bis-selenide caused significant antinociceptive effect on the capsaicin-induced nociceptive response. Capsaicin acts as a naturally derived ligand-gated ion channel receptor named vanilloid (TRPV1) which are located in the dorsal horn of the spinal cord (Kanevina et al., 1997; 2002). The activation of TRPV1 induces membrane depolarization and increases cation influx, leading noxious stimulus. In addition, capsaicin elicits a significant release of glutamate from dorsal cord *in vivo* (Skilling et al., 1993) and other neurotransmitters or neuromodulators, such as SP. Additionally, TRPV1 is activated by several inflammatory mediators, such as nerve growth factor (Chuang et al., 2001) and bradykinin (Chuang et al., 2001).

Studies have provided evidence that SP, capsaicin and glutamate interact synergistically in the excitation of dorsal horn nociceptive neurons (Sakurada et al., 1996; Liu et al., 1997) and the induction of glutamate and SP release from nerve terminals, through direct activation of pro-inflammatory cytokines (Tadano et al., 1999). The present study demonstrated that bis-selenide administered by oral route produces an inhibition of the nociceptive response caused by i.t. injection of cytokines, IL-1 α and TNF- α . 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, in part, the anti-inflammatory effect described for bis-selenide in mice. Cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IFN- γ , are capable of inducing nociceptive behavior when injected intrathecally, in the absence of peripheral nociceptive stimulation (Tadano et al., 1999; Choi et al., 2003a,b). Therefore, consistent evidence supports TNF- α and the development of IL-10 antagonists as therapeutic targets to control inflammatory pain states. In this context, different drugs have been developed for the treatment of inflammatory diseases such as infliximab, etanercept and adalimumab (Perceux et al., 1998; Yu et al., 2005).

One interesting finding in the present study was the observation that bis-selenide caused prolonged hot plate latency, indicating an increase in nociceptive threshold. These data are in accordance with previous data demonstrating that bis-selenide subcutaneously administered in mice caused dose-related increase in the latency for tail-flick response (Savogato et al., 2005).

Many studies have focused on the role of K⁺ channels in pain at the spinal level (Mixcoatl-Zecual et al., 2006; Ortiz et al., 2006). It is known that K⁺ channels play essential roles in setting the resting membrane potential and in controlling the excitability of neurons (Lille, 2001). The opening of K⁺

channels leads to hyperpolarization of cell membranes, which results in a decrease in cell excitability. Consequently, K⁺ channels themselves have begun to be considered as targets for the development of new antinociceptive drugs, and drugs that open K⁺ channels by directly interacting with them (K⁺ channel openers) have been tested in models of acute and chronic pain (Ocaro et al., 1990; Rodrigues and Duarte, 2000; Mixcoatl-Zecual et al., 2006; Ortiz et al., 2006). Our present data using selective antagonists of ATP-sensitive and voltage-gated K⁺ channels, namely glibenclamide and TIA, demonstrated a significant inhibition of the antinociception caused by systemic administration of bis-selenide in the hot plate test in mice. Such results support that antinociceptive effect caused by bis-selenide is, in fact, mediated by the action of ATP sensitive and voltage-gated K⁺ channels. On the other hand, when large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel sensitive to charybotoxin and apamin, did not prevent the antinociceptive action of bis-selenide in the hot plate test in mice.

In conclusion, the data presented here show that bis-selenide exerts significant antinociceptive action in the hot plate test in mice. Although, to date, its precise site of action remains unclear, the activation of the ATP-sensitive and voltage-gated K⁺ channels, seems likely to be responsible for the greater part of its antinociceptive action. Additionally, the present results show that antinociception caused by bis-selenide in mice depends on its direct and/or indirect interaction with glutamatergic system, especially kainate and trans-ACDP receptors, as well as vanilloid and neuropeptide receptors and pro-inflammatory cytokines.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

The behavioral experiments were conducted using female adult Swiss mice (25–35 g) maintained at 22–25 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle. Although the behavioral test is generally performed using male animals because the hormonal change may influence the animal behavior, the sex interference was circumvented in our experiments by using only female mice in all experiments performed. Mice were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout 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 animals using the method described by Hylden and Wilcox (1980). Briefly, the animals were restrained manually and a 26-gauge needle, attached to a 25- μ 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. The i.t. injection volume was 5 μ l, and the injection site was verified by injecting a similar volume of 1% methylene blue solution and determining the distribution of injected dye in the spinal cord. The success rate for the injections was consistently found to be 95% before the experiments were done (Takahashi et al., 2000; Choi et al., 2003a,b).

4.3. Effect of bis-selenide on spinal excitatory amino acid (EAA) induced nociceptive response

To test the hypothesis that EAAs might be involved in the bis-selenide antinociception, we evaluated the possible antinociceptive effect of bis-selenide on the EAAs-induced nociceptive response in mice. The nociceptive response, taken as evidence of nociception, was represented by the amount of time spent scratching/licking/flicking the caudal region and was evaluated at appropriate times following local injection of one of the agonists.

The animals received bis-selenide by oral route (p.o.) (dose range: 5–50 mg/kg) 30 min before the injection of 5 μ l of EAAs. The time-dependent results of bis-selenide in mice were previously reported by us (Savagnago et al., 2006; Jesse et al., 2004). The nociceptive response was elicited by glutamate (an excitatory amino acid, 12 μ mol/site, i.t.), NMDA (a selective agonist of NMDA subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 750 μ mol/site, i.t.) (Iino and Reigosauskas, 1988), AMPA (a selective agonist of AMPA-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 135 μ mol/site, i.t.) (Zambido et al., 1995), kainate (a selective agonist of kainate-subtype of glutamatergic ionotropic receptors, 130 μ mol/site, i.t.) and trans-ACPD (a metabotropic glutamate agonist, 50 nmol/site, i.t.) (Javal et al., 1988). A group of mice only received vehicle (saline 0.9%) by i.t. route. The amount of time the animal spent nociceptive response was evaluated following local post-injections of each agonist: glutamate (3 min), AMPA (1 min), NMDA (3 min), kainate (4 min) and trans-ACPD (15 min).

4.4. Pro-inflammatory cytokine induced nociceptive response

Vehicle (control) or various doses (5–25 mg/kg) of bis-selenide were pre-administered orally 30 min prior to performing an injection of pro-inflammatory cytokines (1 μ g/site of IL-1 β and 0.1 μ g/site of TNF- α) (Choi et al., 2003a, b). Immediately after the injection with pro-inflammatory cytokines, the mice were placed in an observation chamber and their nociceptive behavior responses were recorded during 15 min. The cumulative response scratching/licking/flicking episodes directed toward lumber and caudal region of spinal cord were measured with a stop-watch timer.

4.5. Substance P or capsaicin-induced nociceptive response

To test the hypothesis that SP and capsaicin might be involved in the bis-selenide antinociception, we examined the effect of bis-selenide against these algogens. Animals received an oral administration of bis-selenide (5–25 mg/kg) 30 min before the injection of 5 μ l of drug. The nociceptive response was elicited

by SP (105 μ g/site) (Sakurada et al., 1990) and capsaicin (30 μ g/site) (Salazar et al., 1996) with minor modifications. A group of mice received vehicle (saline) by i.t. route. The amount of time the animal spent nociceptive response was evaluated following local post-injections of one of the following agonists: SP and capsaicin (6 min).

4.6. Hot plate test

The hot plate test was performed in mice as described by Woolfe and MacDonald (1994). Mice were injected with bis-selenide (10 mg/kg p.o.) or vehicle (corn oil, 10 mg/kg p.o.), 30 min before the test. The time-dependent results of bis-selenide in mice were previously reported by us (Savagnago et al., 2006; Jesse et al., 2007). Animals were placed on a hot plate apparatus (Ugo Basile, model — DS 37) that was thermostatically maintained at 55 \pm 1 $^{\circ}$ C. Animals were placed on the heated surface, and the time interval (seconds) between placement and a paw flaring was recorded as the latency. The day before the experiment, the animals were trained on the apparatus. On any one determination was performed for each animal. The cut-off was of 30 s of exposure. Changes in the hot plate latency, Δt (s) was calculated for each animal according to the formula: Δt (s) = post-drug latency – pre-drug latency (Inardi et al., 2002).

4.7. Possible involvement of K⁺ channels in the antinociceptive effect of bis-selenide

For this purpose, mice were pre-treated with glibenclamide (100 μ g/site, intrathecal, i.t.), a blocker of ATP-sensitive K⁺ channels, spamin (50 μ g/site, i.t.), a blocker of small (or low)-conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channels, charybdotoxin (250 μ g/site, i.t.), a blocker of large (or fast)-conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channels, or with tetraethylammonium (TEA; 1 μ g/site, i.t.), a non-selective blocker of voltage-sensitive K⁺ channels, and after 15 min they received bis-selenide (50 mg/kg, p.o.) or vehicle. Other groups of animals received saline (p.a/site) by i.t. route, 15 min prior to the administration of bis-selenide or vehicle. The nociceptive responses to hot plate were recorded 30 min after the administration of bis-selenide. The animals were anesthetized and a volume of 5 μ l of saline solution (control) or drugs was injected between L5 and L6 using a microsyringe connected to polyethylene tube as described previously (Welch and Dunlow, 1993; Welch et al., 1993; Santos et al., 1999, 2003).

4.8. Drugs

The following substances were used: α -glutamic acid hydrochloride (glutamate), kainic acid (kainate), (2*S*)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (trans-ACPD), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), N -methyl D -aspartic acid (NMDA), capsaicin, cytokines (interleukin factor α and interleukin 1 β) and substance P (Sigma, St. Louis, USA).

Bis-selenide was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described (More et al., 2005). Analysis of the ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned

structure. The chemical purity of bis-selenide (99.9%) was determined by GC/PLC. Bis-selenide was dissolved in canola oil and administered by oral route (p.o.). The mice received bis-selenide 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, and gliobendamide, which was dissolved in 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). The final concentration of ethanol and DMSO never did not exceed 0.5% and did not cause any observable effects per se.

4.5. Statistical analysis

The results are presented as mean \pm S.E.M., except that the ED₅₀ values (i.e. the dose of bis-selenide necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value) were determined by nonlinear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The statistically significant difference between groups was calculated by means of one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test when appropriate. *P* values less than 0.05 (*P* < 0.05) were considered as indicative of significance.

REFERENCES

Agrawal, S.A., Evans, M.H., 1986. The primary afferent depolarizing action of capsaicin in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 97, 345-355.

Buzsáki, A.I., Jessell, T.M., 2000. *Principles of Neuroscience*. McGraw-Hill, New York, pp. 477-490.

Das, S., Rustioni, A., 1988. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7870-7874.

Dostal, S.J., Bernabeu, A., Tolle, T.S., Ziegansberger, W., Urban, L., 1998. InLok activation reveals a novel NMDA component in inflammatory hyperalgesia. *Neuroreport* 9, 1931-1933.

Escañillo, A., Tronchetti, A., Grappe, N., Borzini, F., 2005. Pharmacological characterization of NMDA-induced biting behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 505, 115-117.

García, M.J., Schumacher, M.A., Touchette, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 380, 816-824.

Guzmán, M.J., Keller, A., Malenka, A.D., Martin, W.J., Trotter, J., Peterson-Zeltz, S.K., Koltzenberg, M., Basbaum, A.I., Julius, D., 2003. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 299, 300-303.

Chavrych, V., Dickerson, A.H., 1998. The effect of intrathecal administration of TRP67580, a potent nonionotropic antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 257, 149-152.

Choi, S.S., Han, K.J., Lee, J.K., Lee, H.K., Kim, D.J., Kim, D.H., Suh, H.W., 2004a. Antinociceptive mechanisms of orally administered capsaicin in the mouse. *Life Sci.* 75, 471-485.

Choi, S.S., Lee, J.K., Suh, D.W., 2003b. Effect of glaucosides administered intrathecally on the antinociception induced by cold water swimming stress in the mice. *Phyt. Pharm.* 3(1), 20-25.

Chuang, H.H., Prescott, E.H., Long, H., Fields, H., and, S.G., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D., 2001. Trigeminal and nerve growth factor release the capsaicin receptor from TRPV4/VR1-mediated inhibition. *Nature* 411, 957-962.

Cuesta, M.C., Ansens, J.L., Cano, G., Sanchez, I., Melner, W., Suarez-Roca, L., 1998. Opposite modulation of capsaicin-evoked substance P release by glutamate receptors. *Neurochem. Int.* 35, 471-478.

Daves, J., Watkins, J.C., 1982. Actions of D- and L-forms of 2-amino-5-phosphonopentanoate and 2-amino-4-phosphorbutanoate in the rat spinal cord. *Brain Res.* 275, 379-385.

Dezobla, S.C., Lorenzetti, B.B., Bristow, A.T., Poole, S., 1988. Ibuprofen-like drugs as a potent hyperalgesic agent antagonized by a lipopase analogue. *Nature* 334, 698-700.

Eicher, Z., Codreanu, P., 1995a. The contribution of nonionotropic glutamate receptors (mGluR5) to formalin-induced nociception. *Pain* 68, 255-263.

Eicher, Z., Codreanu, P., 1995b. Comparison of nociceptive effects produced by intrathecal administration of mGluR5 agonists. *Neuroreport* 7, 2743-2747.

Fukuhara, N., Imai, Y., Sakakibara, A., Morita, K., Kinoshita, S., Terano, K., Tohi, T., 2002. Regulation of the development of oligodendrocytes by intracellular administration of glutamate agonists and antagonists in mice. *Neurosci. Lett.* 329, 21-28.

Gelbrist, H.D., Allard, B.J., Simone, D.A., 1988. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 37, 179-184.

Giles, F., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 2nd edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

Huettenlocher, J., 1993. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by L-glutamate and quisqualate and blockade of desensitization by Gln A. *Neuron* 11, 253-261.

Hyder, J.L., Wilcox, G.L., 1991. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Int. J. Pharmacol.* 57, 315-319.

Jiang, C.L., Saegusa, L., Nogueira, C.W., 2007. Role of nitric oxide/cyclic GMP/NO channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(4-oxocyclohexyl)propyl alcohol. *Life Sci.* 81, 1594-1702.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.

Koenner, L.T., Cotman, C.W., 1981. Microdialysis 2-amino-4-phosphorbutanoic acid selectively inhibits periaqueductal synapses from lateral entorhinal cortex. *Brain Res.* 216, 152-158.

Liu, M., Rothstein, J.D., Corkin, M.D., Kirchgessner, A.L., 1997. Glutamatergic enteric neurons. *J. Neurosci.* 17, 4766-4784.

Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1992. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor block by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 257, 1276-1278.

Miljan, M.J., 1993. The location of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1-66.

Mitsudomi-Yasuda, J., Iwasa-Muneta, T., Granada-Soto, V., 2006. The nitric oxide-gated GMP-protein kinase G-K_v channel pathway participates in the antihyperalgesic effect of spinal gabapentin. *Eur. J. Pharmacol.* 551, 87-95.

Mora, A.V., Nogueira, C.W., Barbosa, N.E.V., Mendes, F.L., Rocha, J.R.T., Zeri, G., 2005. Highly stereoselective and potent producers to prepare bis- and tri-oxazone alkenes via addition of dialdehydes and dienes to acrylonitriles. *J. Org. Chem.* 70, 5567-5564.

Nagatsuka, Y., Lucke, T., Schalka, P.S., 1993. Differential effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the response of rat spinal neurons with joint input. *Neurosci. Lett.* 155, 29-32.

Nagatsuka, Y., Lucke, T., Schalka, H.C., 1994. Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1179-1186.

Nagatsuka, Y., Chen, P.S., Willis, W.D., 1999. Role of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR5 in local nociception and central sensitization of primary SST cells. *J. Neurophysiol.* 81, 277-287.

Osada, M., Delgado, E., Barrios, M., Ebbels, L.J., Boeyens, J.M., 1980. An A₁ P-dependent potassium channel blocker antagonizes capsaicin analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 377-378.

- Jeans, M., Cerdán, C.M., Cobos, E.J., Estrera, J.M., Baeyens, J.M., 2004. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Acta J. Pharmacol.* 530, 203-219.
- Quiñ, M.L., Medina-Tate, D.A., Sánchez-Hernández, D., Palma-Martínez, J., González-Soto, V., 2006. Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway by gabapentin on the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 459-467.
- Kerrin, K.M., Farnham, D.K., Winters, C.A., Mayer, M.J., Kassam, A., 1993. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclizine and cyclohexanil. *J. Neurosci.* 13, 1050-1062.
- Firard, C., Siemilia, E., Vinanda, E.F., 2004. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 603-604.
- Rodríguez, A.R., Duarte, I.D., 2000. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 125, 110-114.
- Kupriak, N.M., Carlson, E., Boyce, S., Webb, J.K., HT, S.G., 1996. Enantioselective inhibition of the formalin paw-lick phase by the NK1 receptor antagonist, 1-733,500 in gerbils. *Pain* 67, 183-195.
- Sakata, Y., Noto, N., Iida, Y., Saito, K., Nakamura, Y., 1997. Opiate receptor subtypes (OR5 and KA2) are expressed in rat splanchnic ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17, 8611-8620.
- Sakurada, T., Maruoka, Y., Tan-No, K., Sakurada, S., Kasai, K., 1990. The effects of substance P analogues on the scratching, biting and licking responses induced by intracerebral injection of N-methyl-D-aspartate in mice. *Br. J. Pharmacol.* 101, 307-313.
- Sakurada, T., Sugiyama, G., Sakurada, S., Sakurada, S., Kasai, K., Hara, A., Abiko, Y., 1996. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural response in the mouse. *Neuroscience Int.* 28, 271-278.
- Selt, T.E., Ester, S.A., 1995. Do not presume presynaptic metabotropic receptors for L-AP5 and CGC II on CA1Aergic terminals: pharmacological evidence using novel alpha-methyl derivative nGluR antagonists MAP4 and MCP6, in the rat. *Neuroscience Int.* 27, 9-15.
- Santos, A.R.S., Campos, R.O.F., Miguel, O.G., Cechini-Filho, W., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. The involvement of K⁺ channels and G_{βγ} protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Br. J. Pharmacol.* 129, 7-17.
- Sato, K., Niyama, H., Park, H.T., Tohyama, M., 1993. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurons. *Neuroreport* 4, 1283-1285.
- Souza, L., Jasse, C.R., Moro, A.V., Borges, V.C., Santos, F.W., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Resorcinol diene derivatives: a class of potential antioxidant and antinociceptive agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 221-229.
- Szebel, J.S., Beirath, A., Celisato, 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.
- Skilling, S.R., Lawson, A.A., 1993. Capsaicin inhibits wheat germ agglutinin-permeabilized substance P-induced release of excitatory amino acids in the rat spinal cord *in vivo*. *Neurosci. Lett.* 150, 207-211.
- Sorriener, C., Kwasi, V., 2003. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 351, 184-187.
- Stark, L.C., Dickenson, A.H., 1998. Inflammation alters the effects of mGlu receptor agonists on spinal nociceptive neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 155-172.
- Joss, G., Balgorodsky, G., 1989. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 104, 917-922.
- Vila, A.T., Puig, L., Ferrnandez-Tigueras, M.T., Lala, A.M., Vidal, D., Alomar, A., 2003. Adverse cutaneous reactions to amikacin in patients with the anastomosis: clinicopathological study of five patients. *Br. J. Dermatol.* 148, 417-424.
- Tadano, T., Namioka, Y., Nakagawasa, O., Tan-No, K., Murasakima, K., Endo, Y., Kusun, K., 1995. Inactivation of nociceptive responses by intrathecal injection of meprobital in mice. *Life Sci.* 65, 155-161.
- Szoleszvá, J., 1977. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibers and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol.* 73, 251-259.
- Young, M.B., Fleetwood-Walker, S.M., Mitchell, R., Marro, P.L., 1994. Evidence for a role of metabotropic glutamate receptors in sustained nociceptive inputs to rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacol.* 33, 141-144.
- Young, M.B., Fleetwood-Walker, S.M., Mitchell, R., Dickinson, T., 1995. The involvement of metabotropic glutamate receptors and their postsynaptic signaling pathways in sustained nociceptive transmission in rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacol.* 34, 1033-1047.
- Welsh, S.F., Dunlop, L.D., 1993. Antinociceptive utility of intrathecally administered potassium channel openers and opiate agonists as a common mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 393-399.
- Welsh, S.F., Dunlop, L.D., Patrick, G.S., Farden, R.K., 1995. Characterization of rosmundamide and flunaridamide induced antinociception and cross-tolerance to DD⁺-THC after intrathecal administration to mice: blockade of 12/13-C induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 1250-1263.
- Wills, W. L., 2001. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 931, 142-156.
- Woolf, C.G., Macdonald, A.D., 1984. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 81, 900.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for liver ligations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

5- DISCUSSÃO

A dor é um sintoma que afeta milhares de indivíduos diariamente, sendo comum a muitas patologias. Embora exista uma ampla gama de analgésicos disponíveis no mercado, estes possuem efeitos adversos que acabam por limitar o tratamento terapêutico. Além disto, alguns tipos de dor são refratárias aos analgésicos disponíveis (Mendell e Sahenk, 2003). Portanto, é bem conhecido o grande interesse das companhias farmacêuticas no desenvolvimento de compostos mais efetivos e seguros para o tratamento da dor. Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura que revelam que compostos orgânicos de selênio são promissores para o tratamento da dor. O tratamento sistêmico dos animais com SVBS foi efetivo em inibir a nocicepção causada pela injeção intratecal de agentes flogísticos e no modelo de nocicepção induzido por estímulo nocivo térmico (placa-quente).

Os receptores glutamatérgicos são amplamente distribuídos no SNC e são divididos em: ionotrópicos e metabotrópicos. Estudos utilizando agonistas e antagonistas seletivos de receptores glutamatérgicos para investigar o papel de cada grupo de receptores na nocicepção aguda e crônica. Os resultados levaram à conclusão que todos os subtipos de receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato e receptores metabotrópicos (Grupos I, II e III) possuem papel relevante na estabilização ou manutenção destes estados dolorosos (Neugebauer, 2001; Carlton, 2001). Nossos resultados também evidenciaram o envolvimento do sistema glutamatérgico na antinocicepção causada pela administração oral do SVBS em camundongos. Os resultados obtidos nesta dissertação, demonstraram que a administração oral do SVBS foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato (agonista não seletivo de receptores glutamatérgicos), de cainato (agonista seletivo do receptor ionotrópico do subtipo cainato) e de trans-ACPD (agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos). Porém, o SVBS não inibiu a nocicepção induzida pelo AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA) e NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA). Esses resultados confirmam que a atividade antinociceptiva do SVBS ocorre em nível

central e mostram que os receptores AMPA e trans-ACPD, em nível espinhal, estão envolvidos no efeito antinociceptivo desse composto. Somando-se a isso, o tratamento prévio com SVBS, administrado pela via oral, inibiu eficientemente a nocicepção induzida pela administração i.t. da SP. De fato, a SP e o glutamato interagem sinergisticamente durante a ativação de neurônios sensoriais no corno dorsal da medula para processarem a sensação de dor (Sakurada et al., 1996).

A administração oral do SVBS causou redução significativa da nocicepção neurogênica induzida pela ativação de receptores vanilóides pela injeção de capsaicina na pata de camundongos. 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 δ , incluindo os nociceptores polimodais e termocetores (Caterina e Julius, 2001; Holzer, 1991). 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. A ativação deste receptor induz a despolarização da membrana com aumento do influxo de cátions, levando ao estímulo nocivo (Julius e Basbaum, 2001).

A administração oral do SVBS produziu inibição do comportamento de “biting” causado pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). O disseleneto de difenila também inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- α . Schäfers e colaboradores (2003) descreveram que a nocicepção induzida pelo TNF- α envolve a fosforilação de MAPKs como a p38. Portanto, com base nos resultados obtidos no artigo, conclui-se que o SVBS 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 próinflamatórias

A fim de obter a confirmação do efeito antinociceptivo do composto testado, avaliando-o frente a outro tipo de estímulo nocivo, utilizou-se o teste da placa-quente (55 °C). No teste da placa quente, o estímulo térmico ativa

nociceptores, que transmitem a informação nociceptiva aguda ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, a centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (Mogil e Adhikari, 1999). Por este motivo a placa quente é também um dos modelos mais utilizados no estudo de drogas analgésicas, principalmente de drogas que possuem ação no SNC, tais como opióides (Le Bars et al., 2001). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o SVBS aumentou significativamente o tempo de latência dos animais no teste de nocicepção térmica no teste da placa quente.

A participação dos canais de K^+ no efeito antinociceptivo causado pelo SVBS foi evidenciada nos resultados deste trabalho. Os resultados indicaram que o efeito antinociceptivo do SVBS, no teste da chapa quente, foi prevenido pela injeção intratecal de TEA (bloqueador de diferentes tipos de canais de potássio, inclusive os dependentes de voltagem) e glibenclamida (bloqueador de canais de K^+ dependente de ATP), mas foi revertido pela injeção 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). Desta forma, o efeito antinociceptivo causado pelo SVBS parece envolver a abertura de canais de potássio (dependente de ATP e de voltagem).

Analisados em conjunto, esses resultados permitem sugerir que o SVBS parece ser promissor para o desenvolvimento de uma nova droga analgésica terapeuticamente relevante. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados a fim de verificar o exato mecanismo de ação, características farmacocinéticas e possíveis efeitos tóxicos produzidos por este composto. Em conclusão, o presente trabalho mostra que o SVBS é dotado de atividade antinociceptiva quando avaliado em modelos de nocicepção aguda em camundongos. Os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do SVBS são mostrados na figura 8.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

ü A administração sistêmica do SVBS foi capaz de prevenir a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, cainato, trans-ACPD, SP, capsaicina e citocinas pró-inflamatórias em camundongos.

ü A administração oral do SVBS preveniu a nocicepção térmica, no modelo da chapa quente a 55 °C (Hot plate) em camundongos.

ü Os mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva e antiinflamatória do SVBS envolvem canais de potássio dependentes de voltagem e de ATP.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente estudo abrem novas perspectivas para a investigação do potencial efeito farmacológico do SVBS, dentre eles: suas ações sobre proteínas quinases ativadas por mitógenos, estudos de ligação específica, dosagem de neurotransmissores e a relação destes eventos com o processo de transmissão nociceptiva e de inflamação.

Além disso, o SVBS pode ser aplicado em modelos experimentais que reflitam condições patológicas relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo, como modelos de poliartrite, hiperalgesia, neuropatia e doenças neurodegenerativas, para avaliar o potencial efeito deste composto sobre estas situações, procurando intensificar a aplicabilidade terapêutica e científica deste composto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. 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. 1987.

AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, 41, 309-321. 1990.

ALMEIDA, T.F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000, 40-56. 2004.

ARTEEL, G.E., SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ.Toxicol. Pharmacol.**, 10, 153-158. 2001.

AVERIL, S., MCMAHON, S.B., CLARLY, D.O.L., REICHARDT, L.F., PRIESTLEY, J.V. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. **Eur. J. Neurosci.**, 7, 1484-1494. 1995.

BASBAUM, A., JESSEL, T.M. The perception of pain. In **Principles of neural science** 4ª ed, Kandel, Schwartz e Jessel; McGraw Hill. 472-491. 2000.

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

BENNET, A.D., EVERHART, A.W., HULSEBASCH, C.E. Intrathecal administration of NMDA or non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal alodínia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. **Brain Res.**, 859, 72-82. 2000.

BENOLIEL, R., TANAKA, M., CAUDLE R.M., IADAROLA, M.J. Co-localization of Nmethyl-D-aspartate receptors and substance P (neurokinin-1) receptors in rat spinal cord. **Neurosci. Lett.**, 291, 61-64. 2000.

BENTON, D., COOK, R. The impact of selenium supplementation on mood. **Biol Psychiatry**, 29, 1092-1098. 1991.

BESSION, J.M., CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, 67, 67-85. 1987.

BORGES, L.P., BORGES, V.C., MORO, A.V., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, 210, 1-8. 2005.

BORGES, L.P., NOGUEIRA, C.W., PANATIERI, R.B., ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Inter.**, 160, 99-107. 2006.

BRADLEY, J.R. TNF- mediated inflammatory disease. **J. Pathol.**, 214, 149-160. 2008.

BRENNAN, T.J., VANDERMEULEN, E.P., GEBHART, G. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, 64, 491-443. 1996.

BURGER, M.E., FACHINETTO, R., CALEGARI, L., PAIXÃO, M.W., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Res. Bull.**, 64, 339-345. 2004.

BURGER, M.E., FACHINETTO, R., WAGNER, C., PEROTTONI, J., PEREIRA, R.P., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. **Brain Res. Bull.**, 70, 165-170. 2006.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87, 15. 2000.

CALIXTO, J.B., KASSUYA, C.A., ANDRÉ, E., FERREIRA, J. Contribution of natural products of the Discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol. Ther.**, 106, 179-208. 2005.

CAMPOS, M. M., CALIXTO J. B. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*, 34, 314-322. 2000.

CATERINA, M.J., JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev. Neurosci.**, 24, 487-517. 2001.

CHAPMAN, C.R., GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet.**, 353, 2233-2237. 1999.

CLATWORTHY, A.L., ILLICH, P.A., CASTRO, G.A., WALTERS, E.T. 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. 1995.

CODERRE, T.J., KATZ, J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52, 259-285. 1993.

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

COLLETT, B. J. Opioid tolerance: the clinical perspective. **Br. J. Anaesth.**, 81, 58-68. 1998.

COSENS, D. Blindness in a *Drosophila* mutant. **J. Insect Physiol.**, 17, 285-302. 1971.

COTGREAVE, I.A., DUDDY, S.K., KASS, G.E.N., THOMPSON, D., MOLDEUS, P. 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. 1989.

CRAIG, A.D., DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, 1-8. 1999.

CUELLO, A.C., RIBEIRO-DA-SILVA, A., MA, W., DE KONINCK, Y., HENRY, J.L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regul. Pept.**, 46, 155-164. 1993.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, 65, 1-105. 2001.

DAVIS, M.T., BARTAY, W.J. Ebselen decrease oxygen free radical production and iron concentrations in the hearts of chronically iron-overloaded mice. **Biol. Res. Nursing**, 6, 37-45. 2004.

DHAR, A.K., THOMPSON, M.S., PARADIS, M.R., ACIVAR-WARREN, A. Determination of the cDNA sequence and mRNA expression of interleukin-1 receptor antagonist in horses. **Am. J. Vet. Res.**, 64, 920-924. 2000.

DICHTER, M.A., WILCOX, K.S. Excitatory synaptic transmission. *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. J. Engel, Jr. and T.A. Pedley. Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997.

DICKENSON, A. 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. 1997.

DINARELLO, C.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, 163, 1177-1184. 1991.

DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J. 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. 1994.

DOGRUL, A., GARDELL, L.R., OSSIPOV, M.H., TULUNAY, F.C., LAI, J., PORRECA, F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. **Pain**, 105, 159-168. 2003.

DRAY, A., PERKINS, M. Kinins and pain. In: Farmer SG. The handbook of immunopharmacology: the kinin system. Academic press: London, p. 157-172. 1997.

DRAY, A., URBAN, L., DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, 15, 190-197. 1994.

DUMONT, E., VANHAECKE, F., CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 385, 1304-1343. 2006.

FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M.I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, 18, 179-190. 1979.

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

FLOHÉ, L., GUNZLER, W.A., SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. **FEBS Lett.**, 32, 132-134. 1973.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs.**, 15, 29-58. 2001.

GHISLENI, G., PORCIÚNCULA, L. O., CIMAROSTI, H., ROCHA, J.B.T., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Res.**, 986, 196-199. 2003.

GORDON, J.R., BURD, P.R., GALLI, S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunol. Today**, 114, 458-463. 1990.

GOSLAN, H., BEN-ARI, Y. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? **Trends Pharmacol. Sci.**, 16, 368-374. 1995.

GOTO, T., NAKAO, K., GUNJIGAKE, K.K., KIDO, M.A., KOBAYASHI, S., TANAKA, T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. **Neuropeptides**, 41, 25-31. 2007.

GRIFFIS, C.A., COMPTON, P., DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol. Res. Nurs.**, 7, 297-312. 2006.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, 81, 8-11. 1998.

HARRISON, S., GEPETTI, P. Substance P. *Int. J. Biochem. Cel. Biol.*, 33, 555-575. 2001.

HAWKES, W.C., HORNBOSTEL, L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. **Biol. Psych.**, 39, 121-128. 1996.

HENRY, D.; LIM, L. L.Y.; GARCIA-RODRIGUES, L. A. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **BMJ**, 312, 1563-1566. 1996

HERIN, G.A., DU, S., AIZENMAN, E. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. **J. Neurochem.**, 78, 1307-1314. 2001.

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

HILLE, B. Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. **J.Gen. Physiol.**, 61, 669-686. 1973.

HOFMANN, F., LACINOVA, L., KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channel: from structure to function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, 139, 33-87. 1999.

HOLDEN, J.E., PIZZI, J.A. The Challenge of Chronic Pain. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 55, 935-948. 2003.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, 54, 237-271. 1985.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 298, 3-16. 1991.

HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, 78, 731-747. 1997.

HUNT, S.P., ROSSI, J. 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. 1985.

IMAI, H., MASYASU, H., DEWAR, D., GRAHAM, D.I., MACRAE, I.M. Ebselen protects both gray and White matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. **Stroke**, 32, 2149-2154. 2001.

JESSE, C.R., SAVEGNAGO, L., NOGUEIRA, C.W. Role of nitric oxide/cyclic GMP/ K⁺ channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesityseleno)propenol. **Life Sci.**, 81, 1694-1702. 2007.

JI, R.R., STRICHARTZ, G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. **Science**, 252, 1-19. 2004.

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

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **An. Bras. Dermatol.**, 78, 483-498. 2003.

KHASAR, S.G., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. Epinephrine produces a betaadrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J. Neurophysiol.**, 81: 1104-1112. 1999.

KLAYMAN, D.L., GÜNTHER, W.H. (eds.). Organic selenium compounds: their chemistry and biology. New York: John Wiley and sons, 68-157. 1973.

LAFON-CAZAL, M., PIETRI, S., CULCASI, M., BOCKAERT, J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. **Nature**, 364, 535-537. 1993.

LAI, J., HUNTER, J.C., PORRECA, F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 13, 291-297. 2003.

LAURINDO, I.M.M., MELLO, S.B.V., NOVAES, G.S., PALACIOS, F.A.S., YOSHINARI, N.H. Participação dos radicais livres na inflamação articular. **Revista do Hospital de Clínicas**, 52, 72-79. 1997.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, 53, 597-652. 2001.

LEVINE, J.D., TAIWO, Y. Inflammatory Pain. Em: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3^a Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 45-56. 1994.

LIEBESKIND, J.C., GUILBAUD, G., BESSON, J.M., OLIVEIRAS, J.L. 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. 1973.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New Eng. J. Med.**, 330, 613-622. 1994.

LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: An Overview. **Lancet**, 353, 1607-1609. 1999.

LOESER, J.D. Pain and suffering. **Clin. J. Pain**, 16, S2 - S6. 2000.

LOGRASSO, P., MCKELVY, J. Advances in pain therapeutics. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 7, 452- 456. 2003.

LOTSCH, J., GEISLINGER, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? **Clin. Pharmacokinet.**, 40, 485- 499. 2001.

LUTFY, K., CAI, S.X., WOODWARD, R.M., WEBER, E. Antinociceptive effects of NMDA and non- NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, 70, 31-40. 1997.

MALCANGIO, M., FERNANDES, K., TOMLINSON, D.R. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. **Br. J. Pharmacol.**, 125, 1625-1626. 1998.

MAO, J., PRICE, D.D., HAYES, R.L., LU, J., MAYER, D.J. 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. 1992.

MARTIN, J.L., GERLACK, M.L. Selenium metabolism in animals. **Ann. NY Acad. Sci.**, 192, 193 - 199. 1972.

MARTIN, T.J., EISENACH, J.C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 299, 811-817. 2001.

MAY, S.A., HOOKE, R.E., LEES, P. The characterization of interleukin-1. **Vet. Immunol. Immunopharmacol.**, 2, 169-175. 1990.

MCLEOD, A.L., RITCHIE, J., CUELLO, A.C., JULIEN, J.P., RIBEIRO-DA-SILVA, A., HENRY, J.L. 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. 1999.

MELDRUM, B.S., AKBAR, M.T., CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Res.**, 36, 189-204. 1999.

MENDELL, J.R., SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med.**, 348, 1243-1255. 2003.

MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. **Environ. Res.**, 94, 276-282. 2004.

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, 79, 1-13. 1999.

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

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

MINKE, B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. **Cell Calcium**, 40, 261-275. 2006.

MOGIL, J.S., ADHIKARI, S.M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **J. Neurosci.**, 19, 21-25. 1999.

MUGESH, G., DU MONT, W.W., SIES, H. Chemistry of biologically important Organoselenium compounds. **Chem. Rev.**, 101, 2125-2179. 2001.

NEGUS, S. S., BANDERA, T. W., BRANDT, M. R., BILSKY, E. J., BECERRA, L., BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 19, 507-514. 2006.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavioral. **Pain**, 98, 1 8. 2002.

NILIUS, B. VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflugers Arch.**, 451, 1-10. 2005.

NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.**, 27, 283-288. 2002.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 183, 29-37. 2003a.

NOGUEIRA, C.W., QUINHONES, E.B., JUNG., E.A.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Antiinflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.**, 52, 56-63. 2003b.

NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255-6285. 2004.

NOWAK, P.M, SALUK-JUSZCZAK, J., OLAS, B., KOŁODZIEKCYK, J., WACHOWICZ, B. The protective effects of selenoorganic compounds against peroxynitrite-induced changes in plasma proteins and lipids. **Cel. Mol. Biol. Lett.**, 11, 1-11. 2006.

OCAÑA, M., CENDÁN, C.M., COBOS, E.J., ENTRENA, J.M., BAEYNENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.**, 500, 203-219. 2004.

OCAÑA, M., DEL POZO, E., BARRIOS, M., ROBLES, L.I., BAEYENS, J.M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 186, 377-378. 1990.

OZAKI, M., NAKAMURA, M., TERAOKA, S., OTA, K. Ebselen, a novel antioxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. **Transpl. Int.**, 10, 96-102. 1997.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, 54, 581-618. 1998.

PARNHAM, M.J., GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochem. Pharmacol.**, 36, 3095-3102. 1987.

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

PENNICA, D., NEDWIN, G.E., HAYFLICK, J.S., SEEBURG, P.H., DERYNCK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWAL, B.B., GOEDDEL, D.V. Human Tumor Necrosis Factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, 312, 724-729. 1984.

PERKINS, N.M., TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, 101, 745-757. 2000.

PORCIÚNCULA, L., ROCHA, J.B.T., BOECK, C.R., VENDITE, D.A., SOUZA, D.O.G. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. **Neurosci. Lett.**, 299, 217-220. 2001.

PORCIÚNCULA, L., ROCHA, J.B.T., CIMAROSTI, H., VINADÉ, L., GHISLENI, G., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O.G. 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. 2003.

PORCIÚNCULA, L.O., ROCHA, J.B.T., GHISLENI, G., TAVARES, R.G., SOUZA, D.O. The effects of ebselen on [³H] glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. **Brain Res.**, 1027, 192-195. 2004.

PORRECA, F., OSSIPOV, M.H, GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, 25, 319-325. 2002.

REGOLI D, BOUDON A, FAUCHERE JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.**, 46, 551-599. 1994.

REYNOLDS, I.J., RUSH, E.A., AIZERMAN, E. Reduction of NMDA receptors with dithiothreitol increases [³H]MK-801 binding and NMDA-induced Ca²⁺ fluxes. **Br. J. Pharmacol.**, 101, 178-182. 1990.

ROSA, R.M., FLORES, D.G., APPELT, H.R., BRAGA, A.L., HENRIQUES, J.A.P., ROESLER, R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci. Lett.**, 341, 217-220. 2006.

ROSSATO, J., KELTZER, L. A., CENTURIÃO, F. B. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochem. Res.**, 318, 137-140. 2002.

RUSSO, C.M, BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu. Rev. Med.**, 49, 123-133. 1998.

SAH, D.W., OSSIPO, M.H., PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 2, 460-472. 2003.

SAKURADA, T., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TANNO, K., SAKURADA, S., KISARA, K., HARA, A., ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural response in the mouse. **Neurochem. Int.**, 29, 271-278. 1996.

SAKURADA, S., ORITO, T., SAKURADA, C., SATO, T., HAYASHI, T., MOBARAKEH, J.I., YANAI, K., ONODERA, K., WATANABE, T., SAKURADA,

T. Possible involvement of tachykinin NK1 and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 434, 29-34. 2002.

SANTOS, F.W., ORO, T., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.**, 152, 255-263. 2004.

SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., MARQUES, M.S., NOGUEIRA, C.W. 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. 2005.

SAVASKAN, N.E., BRÄUER, A.U., KÜHBACHER, M., EYÜPOGLU, I.Y., KYRIAKOPOULOS, A., NINNEMANN, O., BEHNE, D., NITSCH, R. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. **Faseb J.**, 17, 112-114. 2003.

SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 21, 86-92. 2006.

SAVEGNAGO, L., PINTO, L.G., JESSE, C.R., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. **Brain Res.**, 1175, 54-59. 2007a.

SAVEGNAGO, L., PINTO, L.G., JESSE, C.R., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyl diselenide. **Brain Res.**, 1162, 32-37. 2007b.

SAVEGNAGO, L., PINTO, L.G., JESSE, C.R., ALVES, D., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide:

evidences for the mechanisms of action. **Eur. J. Pharmacol.**, 555, 129-138. 2007c.

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. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 31, 1261-1269. 2007d.

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. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 88, 488-496. 2008.

SCHÄFERS, M., SVENSSON, CI., SOMMER, C., SORKIN, L.S. Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **J. Neurosci.**, 23, 2517-2521. 2003.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen – an anti-inflammatory antioxidant. **Gen. Pharmac.**, 26, 1153-1169. 1995.

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

SHELLEY, A., CROSS, M.D. Pathophysiology of pain. **Mayo. Clin. Proc.**, 69, 375-383. 1994.

SIES, H., ARTEEL, G.E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radic. Biol. Med.**, 28, 1451-1455. 2000.

SINGH, P., MANN, K.A., MANGAT, H.K., KAUR, G. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. **Mol. Cell. Biochem.**, 243, 139-145. 2003.

SKERRY, T.M., GENEVER, P.G. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. **Curr. Pharm. Des.**, 7, 737-750. 2001.

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

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

STEIN, C., SCHÄFER, M., MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Med.**, 9, 1003-1008. 2003.

TANG, L.H., AIZENMAN E. The modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurons in vitro. **J. Physiol.**, 465, 303-323. 1993.

THOMAS, R.J. Excitatory amino acids in health and disease. **J. Am. Geriatr. Soc.**, 43, 1279-1289. 1995.

TJØLSEN, A., HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. The Pharmacology of Pain. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1-20. 1997.

TROTTI, D., RIZZINI, B.L., ROSSI, D., HAUGETO, O., RACAGNI, G., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-ased redox regulatory mechanism. **Eur. J. Neurosci.**, 9, 1236-1243. 1997.

URBAN, L., NAGY, I. Is there a nociceptive carousel? **Trends Pharmacol. Sci.**, 18, 223-224. 1997.

URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J., FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, 285, 1393-1396. 1990.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H.G. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**, 85, 8-19. 2000.

VASSALL, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**, 10, 411-452. 1992.

WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **J. Physiol.**, 188, 403-423. 1967.

WALL, P.D. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. Textbook of pain. Churchill Livingstone, Londres. 1-8. 1999.

WALTHER, M., HOLZHUTTER, H., KUBAN, R.J., WIESNER, R., RATHMANN, J., KUHN, H. 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. 1999.

WANG, L.X., WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 55, 949-965. 2003.

WANGER, P.D., PEDERSEN, N.D., HATFIELD, J., WESWING, P.H. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 153, 295. 1976.

WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol. Rev.**, 82, 981-1011. 2002.

WENDEL, A., FAUSEL, M., SAFAYI, H., OTTER, R. A novel biologically active seleno-organic compound II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochem. Pharmacol.**, 33, 3241-3245. 1984.

WHITTLE, B.J.T. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fund. Clin. Pharmacol.**, 17, 301-313. 2003.

WIECH, K., KIEFER, R.T., TOPFNER, S., PREISSEL, H., BRAUN, C., UNERTL, K., FLOR, H., BIRBAUMER, N. A placebo-controlled randomized crossover trial of the Nmethyl- Daspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesth. Analg.**, 98, 408-413. 2004.

WILBER, C.G. Toxicology of selenium: a review. **Clin. Toxicol.** 17, 171-230. 1980.

WOOD, J.N., DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, 59, 457-482. 1997.

WOODCOCK, J., WITTER, J., DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat. Rev.**, 6, 703-710. 2007.

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

YOSHIZUMI, M., KOGAME, T., SUZAKI, Y., FUJITA, Y., KYAW, M., KIRIMA, K., ISHIZAWA, K., TSUCHIYA, K., KAGAMI, S., TAMAKI, T. 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. 2002.

YOSHIZUMI, M., FUJITA, Y., IZAWA, I., SUZAKI, Y., KYAW, M., ALI N., TSUCHIYA, K., KAGAMI, S., YANO, S., SONE, S., TAMAKI, T. 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. 2004.

ZASSO, F.B., GONÇALES, C.E.P., JUNG, E.A.C., ARALDI, D., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environm. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 283-289. 2005.

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