

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno em camundongos

Roberta Gonçalves Anversa

Pelotas, 2015

ROBERTA GONÇALVES ANVERSA

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno em camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago

Orientador de estágio: Bel. Fernanda Severo Sabedra Sousa

Pelotas, 2015

A637a Anversa, Roberta Gonçalves

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno em camundongos / Roberta Gonçalves Anversa. – 72f. : il. –

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. –

Orientadora Lucielli Savegnago.

**1.Biotecnologia. 2.Selênio. 3.Serotonina.
4.Glutamato. 5.Formalina. I.Savegnago, Lucielli. II.Título.**

CDD: 612.8042

Roberta Gonçalves Anversa

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis-(4-metoxifenilselenil) estireno em camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 4 de dezembro de 2015.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria

.....

Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria

.....

Msc. Ângela Sena Lopes
Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande

.....

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Carolina e Carlos Tadeu, à
Cris, e aos meus amados
irmãos.*

Agradecimentos

Aos meus familiares, Carolina, Daniel, Francisco, Martha, Valentina e Cristiane, pelo incondicional incentivo e apoio. Muito obrigada por todo o carinho e por estarem sempre ao meu lado, amo vocês!

Ao meu pai, Carlos Tadeu, pelas incansáveis vezes em que ele me disse que eu era capaz de alcançar todos os meus objetivos, sempre me impulsionando à lutar por eles, muito obrigada!

À minha orientadora Lucielli, pelos quatro anos de muitos ensinamentos, orientação e amizade, e por toda a confiança em mim depositada, muito obrigada por ter feito parte dessa minha caminhada!!

Aos professores, à direção e aos funcionários do Curso de Biotecnologia, por disponibilizarem uma graduação de qualidade, muito obrigada.

Ao GPN, e especialmente aos meus colegas de laboratório que tornaram-se bons amigos, Angela, Fernanda, Lucimar, Mariana, Maurice, Pamela e Paloma, obrigada por todos os momentos de descontração e de trabalho, foi ótimo ter tido vocês ao meu lado nessa etapa.

Às minhas ex-colegas de laboratório e amigas, Débora, Francine, Mariana e Micheli, obrigada por sempre estarem dispostas à transmitirem seus conhecimentos para mim. Adorei ter conhecido vocês!

Aos meus amados amigos Camila, Giovanni, Luiza e Rafaela, sem vocês a graduação não teria sido tão divertida! Levarei para sempre comigo esta amizade que cultivamos, obrigada!

Às minhas amigas de longa data, Camila, Fernanda, Luiza, Rafaela e Patrícia, obrigada por sempre estarem ao meu lado, vocês são demais!

À todos os meus amigos e à todas as pessoas que fizeram-se presentes nessa etapa da minha vida, e que contribuíram de alguma forma, para com o meu sucesso, obrigada!

Ao Jhonny, pelo incansável apoio, e por sempre me deixar motivada à seguir em frente, mesmo nos momentos mais cansativos da graduação. Muito obrigada!

Ao CNPq e à FAPERGS pela bolsa de estudos.

Enfim, agradeço à todos que participaram da minha formação acadêmica e aos que contribuíram com a execução desse trabalho.

“O importante é não parar de questionar”

Albert Einstein

Resumo

ANVERSA, Roberta Gonçalves. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno em camundongos**. 2015. 72f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia . Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A dor é uma condição que afeta inúmeras pessoas diariamente ao redor do mundo e ainda assim, atualmente, não existe tratamento completamente eficaz que não venha a desencadear uma reação adversa. Este fator impulsiona diversos grupos de pesquisas à liderarem estudos objetivando a busca por compostos que possam vir a ser empregados no tratamento da dor. Com o passar dos anos, vem aumentando o interesse pelo uso de compostos orgânicos de selênio, em virtude das propriedades farmacológicas promissoras dos mesmos demonstradas até então. Sendo assim, este trabalho buscou avaliar a possível ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno (BMOSE) em camundongos, e também buscou determinar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do composto. Além disso, no presente trabalho investigou-se a toxicidade aguda induzida pelo BMOSE quando administrado por via oral nos animais, através dos ensaios aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) e também, se o composto leva à mudanças comportamentais, em especial locomotoras, nos animais através do desenvolvimento do ensaio do campo aberto. Para a investigação da possível ação antinociceptiva do BMOSE, foram desenvolvidos os ensaios de nocicepção induzida por dois agentes químicos, a formalina e o glutamato. Visando avaliar a possível ação anti-inflamatória do composto, foram realizados os ensaios de indução de edema na orelha dos animais através da administração sub-cutânea (s.c.) de óleo de cróton e de fenol. A administração oral do BMOSE (0,1 - 50 mg/Kg) nos camundongos foi eficaz em evitar a nocicepção induzida por glutamato nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg. Em relação ao teste da formalina, na fase 1, o composto foi eficaz em reduzir a nocicepção nas doses de 1, 10 e 50 mg/Kg, e na fase 2, nas doses de 10 e 50 mg/Kg. Com o intuito de avaliar o possível mecanismo envolvido na atividade antinociceptiva do BMOSE, o mecanismo serotoninérgico foi investigado através da administração dos antagonistas WAY100635 (antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1a}), ketanserina (antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2a/2c}) e ondansetron (antagonista seletivo do receptor serotoninérgico 5-HT₃) em conjunto com o BMOSE (25 mg/Kg). Foi possível observar que o antagonista ondansetron bloqueou a ação antinociceptiva do composto, demonstrando a interação do BMOSE com o sistema serotoninérgico. Além disso, o BMOSE (100 mg/Kg) quando administrado por via oral em camundongos mostrou-se capaz de reduzir o edema de orelha gerado pela administração de óleo de cróton (10 mg/Kg) e de fenol (10 mg/Kg), apresentando assim seu potencial anti-inflamatório. O ensaio do campo aberto foi realizado e nenhuma mudança locomotora atribuída à administração do BMOSE, dos antagonistas, ou ambos em conjunto foi observada. Além disso, os ensaios de toxicidade aguda não relataram toxicidade significativa por parte do composto quando administrado em alta dose (200 mg/Kg) em camundongos. De acordo com o presente trabalho, pode-se concluir que o BMOSE apresenta atividade antinociceptiva e anti-

inflamatória, demonstrando atuar através do sistema serotoninérgico no combate à nocicepção.

Palavras-chave: Selênio, serotonina, glutamato, formalina, nocicepç.

Abstract

ANVERSA, Roberta Gonçalves. **Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory properties of 1,2-bis-(4-methoxyphenylselanyl) styrene in mice.** 2015. 72f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The feeling of pain is a condition that affects daily, thousands of people around the world and still yet, there is no treatment to this condition that presents itself as being completely efficient, which does not leads to side effects. Many research groups, have been developing studies aiming the search for new compounds that are possible candidates for pain treatment. In the past years, it has incresead the interest in organoselenium compounds due the promising pharmacological properties of them. Taking in account this information, this present study aimed to evaluate the possible antinociceptive and anti-inflammatory action of the compound 1,2-bis-(4-methoxyphenylselanyl) styrene (BMOSE) in mice, and also, it aimed the search of the possible mechanism of action involved in BMOSE antinociceptive activity. Besides that, the acute toxicity induced by BMOSE, when administerd by the oral route in animals, was investigated in this study via the assessment of the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine levels and delta-aminolevulinic acid (δ -ALA-D) activity. Also, it was investigated if the administration of BMOSE leads to behavioral changes, in special locomotor changes in animals, through the open-field assay. Aiming the evaluation of the possible antinociceptive action of BMOSE, two nociception chemical induced tests were performed, the nociception induced by glutamate and formalin. To assess the possible anti-inflammatory action of the compound, the ear edema inflammation induced by croton oil and phenol models were performed. The oral administration of BMOSE (0,1 - 50 mg/Kg) in mice was efficient in avoiding nociception induced by glutamate at the doses of 10, 25 and 50 mg/Kg. About the formalin test, at phase 1, the compound was efficient in reducing nociception at the doses of 1, 10 and 50 mg/Kg, whereas at the phase 2, the compound was effective at the doses of 10 and 50 mg/Kg. Objectified to investigate the possible mechanism involved in the antinociceptive activity of BMOSE, the serotonergic mechanism was assessed through the administration of three serotonergic receptors antagonists: WAY100635 (antagonist of the 5-HT_{1a} serotonergic receptor), ketanserin (selective antagonist of 5-HT_{2a/2c} serotonergic receptors) and ondansetron (selective antagonists of 5-HT₃ serotonergic receptor). It was possible to observe that the antagonist ondansetron has blocked the antinociceptive effect of the compound, presenting the interaction between the antinociceptive action of BMOSE and the serotonergic system. Besides that, BMOSE (100 mg/Kg) when administered by the oral rout in mice, has shown to be efficient in reducing ear edema induced by the administration of croton oil (10 mg/Kg) and phenol (10 mg/Kg), presenting this way, its anti-inflammatory potential. The open-field test was performed and no locomotor changes were observed after the administration of BMOSE, of the antagonists, or of both of them. Thus, the acut toxicity assays did not show any significant toxicity related to the administration of BMOSE (200 mg/Kg). In accordance to this present study, it is possible to conclude that BMOSE has both antinociceptive and anti-inflammatory activities, showing to act through the serotonergic system in the fight against nociception.

Key-words: selenium, serotonin, glutamate, formalin.

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química do composto BMOSE	2
Figura 2	As diferentes classes de fibras características dos neurônios sensoriais, suas características e funções	7
Figura 3	Diagrama esquemático demonstrando a diversa gama de mediadores químicos e suas classes	10
Figura 4	Estrutura química do composto ebselen	17
Figura 5	Estrutura química do composto disseleneto de difenila	18
Figura 6	Administração por gavagem em camundongos	20
Figura 7	Protocolo experimental do teste de nocicepção induzida pela formalina em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE	21
Figura 8	Administração intraplantar de formalina	22
Figura 9	Animal lambendo a pata esquerda (indicativo de nocicepção) após receber a injeção de formalina	23
Figura 10	Diferença entre a pata esquerda (circulada), a qual recebeu a injeção de formalina, e a pata direita, que recebeu somente salina	24
Figura 11	Protocolo experimental da avaliação da nocicepção induzida por glutamato em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE.	25
Figura 12	Animal lambendo a pata na qual foi administrado glutamato.	25
Figura 13	Protocolo experimental da avaliação do possível envolvimento da via serotoninérgica na ação antinociceptiva do BMOSE (1 - 50 mg/Kg; v.o.) em camudongos	27
Figura 14	Protocolo experimental da avaliação da inflamação induzida por óleo de cróton em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE	28
Figura 15	Protocolo experimental da avaliação da inflamação induzida por fenol em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE	28

Figura 16	Efeito do BMOSE (0,1-50 mg/Kg) no tempo de lambida da pata induzida por formalina em camundongos na fase 1 (neurogênica, A), fase 2 (inflamatória, B) e edema (C)	31-32
Figura 17	Efeito do BMOSE (1 - 50 mg/Kg) no no tempo de lambida da pata induzida por glutamato em camundongos	33
Figura 18	Efeito do pré-tratamento dos animais com os antagonistas serotoninérgicos WAY100635 (0,7 mg/Kg, i.p., A), ketanserina (0,3 mg/Kg, i.p., B) e ondansetron (0,5 mg/Kg, i.p., C) na ação antinociceptiva do BMOSE no ensaio de nocicepção induzida por glutamato	34-35
Figura 19	Efeito do BMOSE no ensaio de indução de edema de orelha por óleo de cróton	36
Figura 20	Efeito do BMOSE no ensaio de indução de edema de orelha causado pelo fenol	37
Figura 21	Efeito do BMOSE no comportamento locomotor do ensaio do campo aberto	38

Lista de Tabelas

Tabela 1	Efeito da administração da dose de 200 mg/Kg do BMOSE no ganho de peso em camundongos	39
Tabela 2	Efeito da administração do composto (200 mg/Kg) em camundongos, nas atividades das enzimas AST, ALT e δ -ALA-D, e nos níveis de creatinina	39

µL	microlitros
AINE	Anti-inflamatórios não-esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BMOSE	1,2-bis -(4-metoxifenilselenil) estireno
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
dL	decilitro
D.P.M	Desvio padrão de média
DEXA	Dexametasona
DRG	Gânglio da raíz dorsal
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
FRAP	Potencial redutor do íon férrico
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GMPc	Guanosina monofosfatase cíclica
i.pl.	Intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzida
Kg	Quilogramas
LOX	Lisil oxidase
mg	Miligramas
MLX	Meloxicam
nNOS	Sintase de óxido nítrico neural
NO	Óxido nítrico

NOS	Sintase de óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
v.o.	via oral
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PBG	Porfobilinogênio
PKC	Proteína quinase C
RVM	Medula rostroventromedial
s.c.	via sub-cutânea
Se	Selênio
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
δ -ALA D	Delta-aminolevunilato desidratase

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Revisão de Literatura	5
3.1. Dor e nocicepção	5
3.1.1. Transmissão da dor	6
3.1.2. Processamento central da dor	8
3.1.3. Mediadores químicos	9
3.2. Dor nociceptiva	13
3.3. Dor inflamatória	14
3.4. Selênio	15
3.5. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de compostos orgânicos de selênio	16
3.5.1. Ebselen	17
3.5.2. Disseleneto de difenila	18
4. Materiais e métodos	19
4.1. Síntese BMOSE e moléculas utilizadas	19
4.2. Animais	19
4.3. Ensaio comportamentais	20
4.3.1. Ensaio de nocicepção induzida por modelos químicos	20
4.3.1.1. Nocicepção induzida por formalina e edema de pata	20
4.3.1.2. Nocicepção induzida por glutamato	24
4.3.2. Avaliação do possível mecanismo serotoninérgico na ação antinociceptiva do BMOSE em camundongos	26
4.3.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória do BMOSE	27
4.3.3.1. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	27
4.3.3.2. Edema de orelha induzido por fenol	28
4.3.4. Ensaio do campo aberto	29
4.4. Determinação da toxicidade aguda do BMOSE	29
4.5. Análise estatística	30
5. Resultados	31

5.1. Atividade antinociceptiva do BMOSE	31
5.1.1. Nocicepção induzida por formalina	31
5.1.2. Nocicepção induzida por glutamato	33
5.2. Avaliação do possível mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do BMOSE	33
5.2.1. Mecanismo serotoninérgico	33
5.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória do BMOSE	36
5.3.1. Edema de orelha induzido por óleo de cróton	36
5.3.2. Edema de orelha induzido por fenol	36
5.4. Ensaio do campo aberto	37
5.5. Determinação da toxicidade aguda do BMOSE	38
6. Discussão	40
7. Conclusão	44
Referências	45

1. Introdução

A dor é caracterizada por desencadear um sentimento desagradável, de repúdia, e engloba tanto o componente sensorial, o de sensibilização dos receptores, quanto o componente de percepção, o qual envolve características psicológicas, emocionais (Scholz e Woolf, 2002). A dor é resultado da ativação de nociceptores, os quais são os receptores característicos dos neurônios sensoriais, envolvidos com a percepção da mesma (Ossipov, 2010). Apesar dos aspectos psicológicos negativos gerados pela dor, tais como estresse, desconforto e sofrimento, ela desempenha um importante papel na busca pelo mantimento da integridade física, tendo em vista a ação dela em despertar a atenção, servindo assim de alarme, e facilitando a percepção de que há algo errado no corpo. A dor é o principal sintoma clínico que leva à busca por serviços de saúde (Brennan et al., 2007). Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estimam que pelo ano de 2030, as doenças com maiores índices de morbidade terão a dor como um fator de comorbidade (OMS, 2008).

A dor pode ser classificada em duas diferentes fases segundo sua duração, sendo estas dor aguda e dor crônica. A dor aguda é provocada por uma injúria gerada a qual pode ser de natureza química, mecânica ou térmica, ou também, a dor pode vir a ser resultado de uma doença ou disfunção. A dor aguda está envolvida com a ativação do sistema nervoso simpático e seus nociceptores. Em contraste, o estado de dor crônica pode ser caracterizado como um estado de doença (Grichnick et al., 1991).

Em um processo crônico, a dor pode levar à uma resposta inflamatória, a qual é caracterizada como sendo um processo biológico de ocorrência natural em resposta à danos nos tecidos (Wang, 2013). A inflamação por sua vez, leva à formação de um edema no local que sofreu dano, o qual pode ser atribuído à migração de células imunes que ocorre para a região afetada. A relação entre a nocicepção e a inflamação se dá ao fato de que o estímulo nociceptivo depende da ativação e ação de mediadores inflamatórios, principalmente em estado de dor crônica (Ferreira e Nakamura, 1979; Ji e Strichartz, 2004). Tendo em vista este dado, a maioria dos

fármacos empregados para o tratamento da dor são anti-inflamatórios (Mendell e Sahenk, 2003).

A farmacoterapia de analgesia existente compreende principalmente, duas classes de fármacos, os opióides e a classe de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE). Porém, fármacos de ambas as classes apresentam efeitos adversos indesejáveis (Woodcock et al., 2007; Katzung, 2015), fator que impulsiona a constante busca por um tratamento, para as condições de dor e inflamação, que não apresente efeitos colaterais e que seja eficaz. Tendo em vista essa constante necessidade pela busca de novos fármacos mais eficazes, o interesse por compostos orgânicos de selênio (Se) tem crescido gradativamente, visto que tais compostos apresentam aspectos farmacológicos promissores (Nogueira et al., 2004; Song et al., 2014; Roman, 2016).

Os estudos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) e colaboradores, apresentaram inúmeras atividades desempenhadas por compostos orgânicos de Se, tais como, atividade antidepressiva (Gerzson et al., 2012; Victoria et al., 2014; Brod et al., 2016), anti-hiperalgesia (Donato et al., 2015), antioxidante (Savegnago et al., 2013; Fonseca et al., 2015; Martinez et al., 2015), antifúngica (Castro et al., 2014), antimicrobiana (Victoria et al., 2014), anti-inflamatória (Wilhelm et al., 2014; Chagas et al., 2014) e antinociceptiva (Savegnago et al., 2008; Luchese et al., 2010; Brüning et al., 2014; Marcondes et al., 2014).

Mais recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade antioxidante do BMOSE (figura 1), o qual foi escolhido para ser usado neste trabalho, tendo em vista que o composto apresentou os melhores efeitos em difetentes ensaios, tais como atividade neutralizadora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, potencial redutor do íon férrico (FRAP) e oxidação do ácido linoléico, quando comparado com outras moléculas da mesma classe (Gonçalves, 2014).

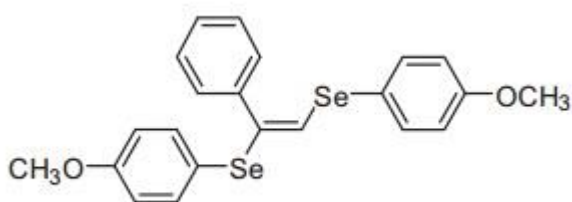


Figura 1: Estrutura química do composto BMOSE.

Portanto, baseando-se no que foi exposto, o presente estudo investigou se o BMOSE apresenta ação antinociceptiva e anti-inflamatória, através de ensaios de indução de nocicepção e inflamação em camundongos, e além disso, foram realizados ensaios de toxicidade na tentativa de oferecer segurança no uso desse composto.

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

- Identificar a possível ação antinociceptiva e anti-inflamatória do BMOSE em camundongos, bem como investigar os mecanismos envolvidos em sua ação antinociceptiva e a toxicidade aguda do composto.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação do BMOSE, administrado pela via oral, no teste de nocicepção induzida por formalina em camundongos;

- Determinar a ação do BMOSE no teste de nocicepção induzida por glutamato em camundongos;

- Estudar o possível envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva do BMOSE através do ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos;

- Identificar a possível ação anti-inflamatória do BMOSE no edema induzido por óleo de cróton e por fenol nas orelhas dos animais;

- Investigar se o BMOSE apresenta toxicidade aguda, através da realização dos ensaios AST, ALT, creatinina e δ -ALA D, e da observação do ganho de peso dos animais.

3. Revisão de literatura

3.1 Dor e Nocicepção

Segundo sua etimologia, a palavra dor é derivada da palavra em latim *dolore*, que significa desgosto, aflição, tristeza e sofrimento tanto físico quanto moral. René Descartes, em 1662, já propunha uma definição para dor, na qual esta resultava do desbalanço entre o sistema nervoso periférico (SNP) e o encéfalo, sendo a percepção pela alma da ação de objetos do meio externo para com nosso corpo (Cohen et al., 2013). Atualmente, a definição que melhor explica o que é a dor foi elaborada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a qual classifica a dor como uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada à uma real ou potencial lesão tecidual” (Merskey, 1994). A dor é um processo de extrema importância para o ser vivo, visto que ela faz com que tenhamos consciência de que a integridade corporal ou mental está sendo ameaçada (Fields e Basbaum, 1994).

A dor leva à percepção de estímulos nocivos ao corpo pelo sistema nervoso central (SNC), mais especificamente pelos nociceptores, os quais compreendem o próprio sistema neural da dor, o sistema nociceptivo. A dor possui dois principais componentes, os quais são a nocicepção (sensação) e a percepção da mesma. A nocicepção é mediada pelas terminações nervosas axônais livres, nas quais seus canais iônico são sensíveis à inúmeros estímulos mecânicos, químicos e térmicos. A nocicepção portanto, é resultado da detecção, por meio dos receptores dos neurônios sensoriais periféricos, de estímulos capazes de afetar a integridade física do organismo. Contrária à nocicepção, a percepção é de cunho emocional, psicológico e motivacional, no qual cada pessoa reage de maneira diferente ao se deparar com situações que levam à dor (Apkarian et al., 2009).

Em relação à sua duração, a dor pode ser dividida em dor aguda, transitória ou crônica. A dor aguda é caracterizada como sendo uma resposta do corpo à um estímulo nocivo o qual levou ao dano tecidual, ocorrendo a ativação de nociceptores. A dor aguda é de cunho rápido e pode desaparecer antes mesmo da total recuperação do tecido lesado. Esta fase da dor é de caráter protetor e pode perdurar por até 1 mês. Em relação à dor transitória, esta dor também possui caráter protetor e surge a partir da ativação de nociceptores sem um estímulo externo, ou seja, não

depende de lesão tecidual gerada por um estímulo. Em contraste, a dor crônica pode ser caracterizada como sendo o estado mais persistente de dor, observado tanto em uma lesão tecidual prolongada como também em doenças crônicas. A dor crônica pode durar de meses até anos e é um fator extremamente incapacitante. Ambos os estados de dor aguda e crônica estão relacionados com o desencadeamento de uma resposta inflamatória, tendo em vista a ocorrência de lesão tecidual e reatividade imunológica (Zhang e An, 2007).

3.1.1 Transmissão da dor

Ao receber um estímulo nocivo, o qual pode ser de natureza química (induzido por químicos tais como formalina, bradicinina, glutamato, etc.) ou física (impactos mecânicos ou estimulação térmica), ocorrerá a liberação de mediadores químicos por neurônios sensoriais e simpáticos, ou também por células não neuronais, tais como as células de Schwann, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células sanguíneas. Os mediadores químicos desempenham um importante papel na transmissão da dor, facilitando a transmissão de informação ao SNC (Scholz e Woolf, 2002).

Os nociceptores (fibras A δ e C) localizados nos diferentes tecidos periféricos são ativados ao receberem um estímulo nocivo, o qual é reconhecido por moléculas sinalizadoras específicas (TRPA1, TRPM8, TRPV1, dentre outras) e é convertido em impulsos elétricos. Tais impulsos são transmitidos por meio de fibras aferentes primárias, das terminações axonais dos neurônios sensoriais, até diferentes partes do nosso corpo, tais como medula espinhal, mais especificamente no corno dorsal da mesma, e também tronco cerebral (Julius e Basbaum, 2001).

As fibras C amielínicas e fibras A δ desempenham um importante papel na transmissão da nocicepção, sendo assim, responsáveis pela percepção da dor. Seguindo da lesão tecidual e inflamação, ocorrerá a liberação de mediadores inflamatórios por parte de células inflamatórias, os quais estimulam seus respectivos canais e receptores, levando assim à ativação de quinases terminais, as quais aumentam a capacidade de resposta das proteínas tradutoras terminais e também dos canais (Yaksh, 2010).

Essas diferentes fibras respondem à estímulos de diferentes naturezas. As fibras A α e A β não são caracterizadas como fibras nociceptivas, visto que estas respondem somente à estímulos que não geram, em situações normais, danos ao corpo. Estímulos de luz, toque, vibrações, dentre outros, são captados por estas fibras, a qual está envolvida somente com percepção (Millan, 1999). No entanto, a ativação de tais fibras está relacionada também, com o alívio da dor. Esta ativação ocorre por meio da fricção do local lesionado, ou como pode-se observar em ensaios de nocicepção animal, através de lambidas e mordidas no local de injúria, como sendo a resposta do animal na busca pelo alívio da dor (Millan, 1999).

Em relação às fibras nociceptivas, as fibras A δ são caracterizadas por possuírem pouca mielinização e conduzem os estímulos nociceptivos gerados através de choque mecânico, térmico ou por estímulo químico, de maneira mais rápida. Em contraste, as fibras C, que por sua vez são amielinizadas, porém também estão envolvidas com a transmissão da nocicepção gerada pelos mesmos estímulos (Basbaum, 2000) (Figura 2).




<p><u>Fibras Aα e Aβ</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Largo diâmetro; - Mielinizadas; - Não estão envolvidas com a nocicepção, somente percepção de estímulos não nocivos.
<p><u>Fibras Aδ</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Médio diâmetro; - Levemente mielinizadas; - Estão envolvidas com a nocicepção mecânica, térmica e química.
<p><u>Fibras C</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Pequeno diâmetro; - Não-mielinizadas; - Estão envolvidas com a nocicepção mecânica, térmica e química.

Figura 2. As diferentes classes de fibras características dos neurônios sensoriais e suas características e funções. Adaptada de Julius e Basbaum (2001).

3.1.2 Processamento central da dor

Através das fibras aferentes, a informação gerada por um estímulo nociceptivo é levada até o SNC, para que assim, possa ser processada a resposta mais adequada à dor. Como primeiramente descrito por Coggeshall e Carlton (1997), o impulso nociceptivo é carreado pelas fibras aferentes até o corno dorsal da medula espinhal, a qual é a primeira área a receber os estímulos somato-sensoriais.

O corno dorsal é uma estrutura dividida por diferentes lâminas, nas quais cada lâmina é responsável por receber diferentes fibras carreadoras de informação. São nessas lâminas do corno dorsal que ocorre a liberação de neurotransmissores que estão envolvidos com a sinalização da dor (Coggeshall e Carlton, 1997).

No momento em que ocorrer a integração dos impulsos elétricos no corno dorsal, as vias nociceptivas levarão à ocorrência de diferentes projeções para as áreas corticais e supra-corticais (Almeida et al., 2004). Essas projeções são caracterizados como vias ascendentes, formadas através da interação de feixes ascendentes de neurônios de primeira e segunda ordem do corno dorsal da medula, os quais carregam a informação de dor até o SNC (Almeida et al, 2004; Reddi, 2013).

As vias ascendentes podem ser classificadas em monossinápticas e polissinápticas, das quais as vias monossinápticas são de projeção direta para as estruturas cerebrais superiores, enquanto as vias polissinápticas possuem a característica de retransmissão de informação à neurônios de segunda ordem, que por sua vez, conduzirão a informação às estruturas superiores do cérebro (Almeida et al., 2004).

Algumas das vias realizam contato com outras classes de neurônios, os de terceira ordem, presentes no tálamo. A projeção dos axônios desses neurônios do córtex somatossensorial até o giro pós central está envolvida com a localização do estímulo sensorial nociceptivo, enquanto no giro anterior do cíngulo ocorre a interpretação emocional da dor (Millan, 1999). Sendo assim, além do envolvimento com a percepção da dor, as estruturas supra-espinhais estão intimamente envolvidas com a modulação da dor.

Além da via ascendente, existe a via descendente da dor. Inúmeros estudos eletrofisiológicos, anatômicos e farmacológicos ajudaram a elucidar o funcionamento da via descendente. Foi observado que essa via exercia influência no processamento

da dor à nível espinhal e que essa influência depende de mudanças geradas na medula, mais especificamente na medula rostroventromedial (RVM), incluindo o núcleo magno da raphe (Hammond, 1986). A modulação da via descendente é dada, por sua vez, pelas estruturas cerebrais que se originam no tronco cerebral, além da modulação via tálamo, hipotálamo, córtex, núcleo magno da raphe e substância cinzenta periaquedutal (PAG) (Millan, 2002).

Os mecanismos de modulação descendente, modulam a resposta nociceptiva através dos receptores presentes nos neurônios do corno dorsal e das fibras primárias aferentes, além de interneurônios excitatórios e inibitórios. Sabe-se que o circuito modulatório da dor pode tanto facilitar quanto combater a transmissão nociceptiva, portanto o balanço da ativação dessas duas sub-populações é encarregado da resposta à um estímulo nocivo periférico (Porreca et al., 2002).

A modulação descendente da resposta à nocicepção, além de envolver diversas estruturas cerebrais, também envolve diferentes sistemas de neurotransmissores, tais como os sistemas neuropeptidérgico, serotoninérgico, opióide, noradrenérgico, adenosinérgico, gabaérgico e canabinóide (Millan, 2002). Tendo em vista este fato, estudos experimentais em modelos animais envolvendo indução de nocicepção buscam investigar também, essas diferentes vias de neurotransmissores, para elucidar qual via está envolvida com a resposta à nocicepção induzida por um agente químico, térmico ou mecânico. Vale ressaltar que não se tem estabelecido que um neurotransmissor seja dominante perante os outros na perpetuação do estímulo nociceptivo (Millan, 2002).

3.1.3 Mediadores químicos

A ação direta ou indireta de mediadores químicos é de extrema importância na transmissão da informação nociceptiva tanto no SNC quanto no SNP (Scholz e Wolf, 2002). Existem mediadores de diferentes classes, como por exemplo, os neurotransmissores excitatórios, particularmente o glutamato, neurotransmissores inibitórios, tais como o ácido gama-amino-butírico (GABA) e glicina, além da bradicinina, serotonina, substância P, das citocinas, do metabólito do ácido

araquidônico (prostaglandinas), do óxido nítrico (NO), dentre inúmeros outros (McHugh, 2000) (Figura 3).

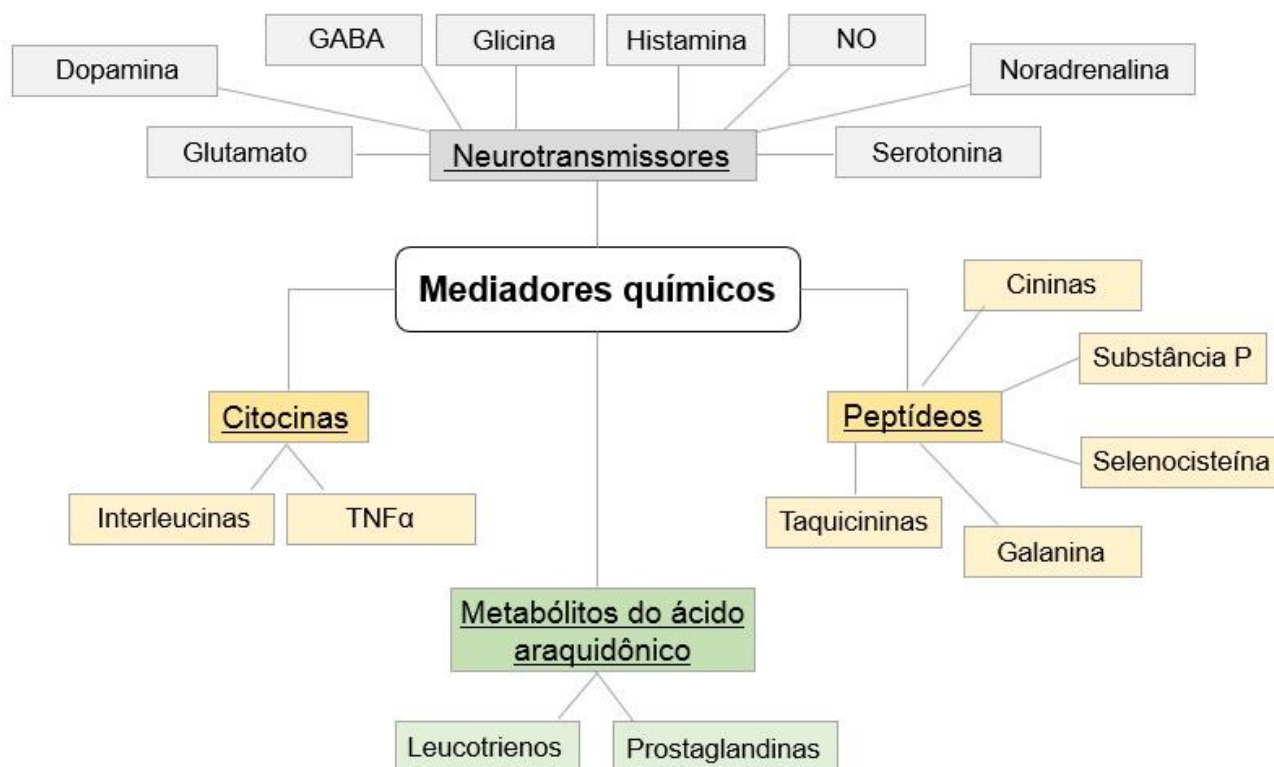


Figura 3. Diagrama esquemático demonstrando a diversa gama de mediadores químicos e suas diferentes classes. NO= óxido nítrico; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; GABA= Ácido gama-amino-butírico.

O glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante dentre todos os outros conhecidos, e quando o mesmo se liga aos seus receptores presentes nas membranas dos neurônios pré e pós sinápticos, e também na membrana de células gliais, irá ocorrer o desencadear da sua ação. Inúmeros dados da literatura relataram que os receptores glutamatérgicos estão diretamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta nociceptiva (Mao et al., 1992; Coggeshall e Carlton, 1997; Millan, 1999). Sendo assim, o desenvolvimento de substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos, tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos, são alvos terapêuticos de combate à dor, visto que apresentam importante efeito antinociceptivo (Lufy et al., 1997; Neugebauer, 2002; Wiech et al., 2004).

Os neurotransmissores inibitórios GABA e glicina também estão envolvidos com a transmissão da nocicepção. Eles agem de maneira a inibir a transmissão do estímulo nociceptivo através de ligação aos seus receptores, tais como o GABA_A e o GABA_B, os quais estão amplamente distribuídos no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 2002).

A bradicinina é um peptídeo conhecido por atuar como vasodilatador. Esse peptídeo age através da ativação de dois diferentes receptores acoplados à proteína G, o B₁ e B₂. O tipo de receptor a ser ativado vai depender da característica e natureza da lesão. O receptor B₁ é expresso no caso de ocorrência de lesão tecidual ou presença de inflamação, enquanto o B₂ é constitutivamente expresso. Dados da literatura sugerem que a bradicinina está envolvida com a sinalização da dor através da sua participação em diferentes vias sinalizadoras, estando presente especialmente na sinalização da dor de cunho inflamatório (Okuse, 2007).

O neurotransmissor monoaminérgico serotonina é conhecido por modular os mecanismos de sinalização da dor. Juntamente com a bradicinina, histamina e prostaglandinas, a serotonina faz parte da “sopa inflamatória”, a qual contribui para com a dor gerada por injúria ou inflamação (Hamon e Bourgoin, 1999). A serotonina é liberada pelas plaquetas e interage com vários receptores presentes em diversos tecidos. Resultados descritos por Aira e colaboradores (2010), demonstraram que a administração de agonistas dos receptores 5-HT_{1a}, 5-HT_{1b}, 5-HT_{2c} ou 5-HT₃ foi capaz de reduzir os potenciais de ação das fibras nociceptivas C na medula espinhal de ratos submetidos à dor neuropática. Porém, além do uso de agonistas estar envolvido com certa condição de dor, sabe-se também, que o uso de antagonistas serotoninérgicos apresenta potencial analgésico, visto que leva ao bloqueio da nocicepção ao bloquear os receptores serotoninérgicos (Viguiet et al., 2013).

A substância P é um neuropeptídeo que atua tanto como neurotransmissor quanto como neuromodulador. Esse neuropeptídeo é sintetizado pelos neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal e liberado pelas fibras C em resposta à lesão ou estimulação intensa (Julius e Basbaum, 2001). A substância P está envolvida com a nocicepção tanto à nível periférico quanto central. A ativação dos receptores periféricos da substância P (NK1) leva ao surgimento do comportamento de

nocicepção, o qual pode ser bloqueado através do uso de antagonistas a estes receptores (Jang et al., 2004).

Uma importante família de mediadores químicos que pode ser citada é a família das citocinas. As citocinas são pequenas proteínas as quais podem ser produzidas e liberadas por diferentes populações celulares do tecido nervoso periférico durante processos patológicos e fisiológicos. As principais células produtoras de citocinas são os macrófagos e as células T-helper, além de outras células tais como os mastócitos, células endoteliais e células de Schwann (Zhan e An, 2007). Ao serem ativadas, essas células darão início à uma cascata inflamatória, a qual é de grande relevância para o desenvolvimento da dor neuropática e inflamatória (Sun et al., 2006).

Primeiramente foram descritas as citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como sendo citocinas participantes do processo de desenvolvimento da dor. Após, foi descoberto que outras citocinas participavam também não somente do processo de indução da nocicepção mas também do processo inflamatório, sendo elas as interleucinas 6 (IL-6), 8 (IL-8) e 12 (IL-12) (Cunha e Ferreira, 2003; De Jongh et al., 2003; Cui, et al., 2012). Como resposta do organismo à essa liberação de citocinas inflamatórias, ocorre a liberação de citocinas anti-inflamatórias, as quais são as interleucinas 4 (IL-4), 10 (IL-10) e 13 (IL-13). Essas interleucinas anti-inflamatórias são responsáveis por modular a resposta imune no combate à um evento inflamatório, combatendo assim, a dor. A IL-4 é caracterizada por possuir efeito analgésico através da inibição das citocinas, mas também, através da inibição da ação das enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) (Cunha e Ferreira, 2003).

As prostaglandinas por sua vez, são mediadores de origem lipídica, as quais são produzidas pela cicloxigenase a partir do ácido araquidônico. O mecanismo de ação dos AINE visa a inibição da síntese de prostaglandinas, através do bloqueio das enzimas COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzida), as quais são responsáveis pela síntese de dois precursores inflamatórios, PGG₂ e PGH₂. Esses dois precursores são posteriormente convertidos e prostaglandinas biologicamente ativas e em tromboxano, por meio da ação das enzimas isomerases (Zeilhofer, 2007). As prostaglandinas biologicamente ativas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} e PGI₂) desempenham um importante papel na inflamação e dor, através da participação de processos de

ocorrência de hiperalgesia e alodinia, atuando tanto à nível periférico quanto na medula espinhal.

O NO age como um mensageiro biológico através do aumento na produção de guanosina monofosfatase cíclica (GMPc) e está envolvido em inúmeros processos fisiológicos, inclusive com a modulação da dor. Esse mensageiro está envolvido com a transmissão sináptica tanto no SNC quanto no SNP e é sintetizada a partir do aminoácido L-arginina. O NO pode ser sintetizado a partir da ação de três diferentes isoformas da enzima sintase de óxido nítrico (NOS): a endotelial (eNOS), a neural (nNOS) e a induzida (iNOS) (Sousa e Prado, 2001).

Atualmente, sabe-se que a NO possui efeito “dual”, agindo tanto no combate à nocicepção quanto na sensibilização central gerada pela dor (Cury et al., 2011). Diversos estudos têm relatado que tanto a NO neural quanto as não neurais participam de maneira complexa e diversificada na modulação da nocicepção (Toriyabe et al., 2004; Freire, 2009; Chen, 2010). Além disso, já se tem relatado também a ação da NO em mediar o efeito analgésico de opióides e substâncias de caráter analgésico. Por outro lado, a NO também age na sensibilização dos neurônios da medula espinhal, possibilitando o sentimento de dor (Cury et al., 2011).

3.2 Dor nociceptiva

A dor nociceptiva pode ser classificada como a dor gerada por uma potencial ou real lesão no tecido, resultante da ativação dos receptores dos neurônios nociceptivos periféricos. A dor nociceptiva ocorre em organismos intactos à dor, ou seja, ela é caracterizada por ser uma dor espontânea gerada por um ato, e não como sendo uma dor crônica ou proveniente de doença ou condição. Esse tipo de dor é considerada substancial para a sobrevivência e faz parte do sistema vigilância de nosso organismo (Julius e Basbaum, 2001).

A nocicepção desta forma, é caracterizada como uma dor aguda, de cunho sensorial. Existe diferentes nociceptores encarregados por transmitir estímulos de diferente natureza. As fibras que inervam as regiões da cabeça e do pescoço são provenientes dos corpos celulares e gânglios da raiz dorsal e podem ser

caracterizados em 3 diferentes grupos, segundo sua anatomia e função, como já foi previamente descrito (Julius e Basbaum, 2001).

3.3 Dor inflamatória

A dor inflamatória não provém necessariamente de um estímulo externo e pode ser desencadeada espontaneamente (Kidd e Urban, 2001). Além de surgimento espontâneo, a inflamação também pode resultar do processo de nocicepção. O local da injúria tecidual, é caracterizado pelo surgimento de inchaço, vermelhidão e edema, fatores que são desencadeados pela ocorrência da liberação de mediadores inflamatórios e migração de células imunes para o local. Tais mediadores podem ser de natureza lipídica (prostaglandinas), peptídica (bradicinina e substância P), podem ser neurotransmissores (glutamato e serotonina) proteína (citocinas) ou neurotrofinas (NGF) (Levine e Reichling, 1999).

A resposta inflamatória tanto no SNC quanto no SNP, desempenha um importante papel no desenvolvimento e na persistência de inúmeros estados patológicos de dor. Alguns mediadores inflamatórios da medula espinhal, do gânglio da raiz dorsal, de algum nervo que sofreu injúria ou da pele, são conhecidos por estarem relacionados com o comportamento de dor, além de também estarem envolvidos com a geração de atividade espontânea anormal das fibras nervosas injuriadas ou de neurônios inflamados (Watkins et al., 2003).

A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica, segundo sua duração. A inflamação aguda é caracterizada como sendo de curta duração, podendo perdurar por horas, dias, ou poucos meses. Durante o processo inflamatório agudo ocorre a liberação de mediadores inflamatórios tais como as prostaglandinas (PGI₂, PGD₂, PGE₂ e a PGF₂α) e o NO, os quais são responsáveis por promover vasodilatação, que leva à sensação de calor e rubor no local da inflamação, o qual é um dos principais sintomas da inflamação aguda. Durante a inflamação aguda, outro importante sinal clínico apresentado é o surgimento de edema, o qual é proveniente do fluxo de plasma entre vasos dos compartimentos intravasculares até chegar ao interstício e resultante da liberação de histamina, bradicinina, substância P, fator de agregação plaquetária e leucotrienos no local da inflamação (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A inflamação aguda pode vir a ter fim quando ocorre o combate à

reação inflamatória e o tecido injuriado consegue retornar ao seu estado normal, ou quando ocorre substituição desse tecido por tecido conjuntivo.

Quando a inflamação aguda não é combatida e perdura, ocorre o progresso para inflamação crônica, a qual é caracterizada como sendo um processo inflamatório com duração de muitos meses. A inflamação crônica pode ser caracterizada pela infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Durante inflamação crônica ocorre um processo inflamatório ativo e posterior, tentativa de reparo do tecido e conseqüentemente, a destruição do tecido agredido e fibrose do mesmo (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A dor é uma característica presente em um processo inflamatório e a dor inflamatória é um processo clínico presente em inúmeras doenças que atualmente ainda não possuem o devido tratamento. Em caso de inflamação crônica, a dor inflamatória deixa de ser um constituinte de proteção do corpo e passa a ser considerado como uma patologia (Watkins et al., 2003).

3.4 Selênio

O Se é um calcogênio, que faz parte do grupo 16 da tabela periódica e que pode ser encontrado em diferentes formas, segundo sua capacidade oxidativa: seleneto, selenito, Se elementar e selenato. Diversos estudos trazem a importância do Se para com o nosso organismo e como este elemento químico deveria compor o quadro dietário da população (Nogueira et al., 2004; Rocha et al., 2008). Sendo assim, o Se pode ser caracterizado como sendo um micronutriente essencial a todos porém, vale ressaltar que, uma ingestão exacerbada de Se pode vir a causar toxicidade (Schwartz e Foltz, 1957).

Sabe-se que a carência de Se está envolvida com diversas patologias, como por exemplo, depressão, problemas musculares, alterações digestivas, doenças, cardiovasculares, alterações reumáticas, esclerose, câncer, diabete, entre inúmeras outras doenças e condições (Hawkes e Hornbostel, 1996; Ortuño et al., 1996; Fairweather-Tait et al., 2010).

Com o decorrer do tempo, o Se passou a ser empregado em estruturas químicas, formando assim os compostos orgânicos de Se, que por sua vez, tornaram-

se alvos atrativos para farmacoterapia sintética, tendo em vista suas reações químio, regio e estereoseletivas (Moro et al., 2005) e suas promissoras atividades biológicas (Nogueira et al., 2004). De fato, inúmeros estudos relatam as propriedades farmacológicas positivas, tais como capacidade antidepressiva, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antinociceptiva, anti-inflamatória, atividade de combate à hepatotoxicidade, dentre outras, de diferentes compostos orgânicos de Se, como por exemplo o ebselen, benzoselenoazolinonas, disselenetos, selenoamidas, entre outros (Yamagushi et al., 1998; Saito et al., 1998; Nogueira et al., 2004).

Além destas atividades farmacológicas, o Se encontra-se presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzima glutaciona peroxidase (Flohé et al., 1973) e tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), das quais ambas desempenham importante papel antioxidante em nosso organismo. Além de constituir a formação enzimática, o Se também pode ser encontrado na selenoproteína P, e sua atividade redox é de extrema importância para o funcionamento adequado destas enzimas (Ursini et al., 1990).

Tendo em vista os benefícios que podem ser obtidos através da suplementação alimentar com Se, esse elemento foi reconhecido como sendo indispensável para a dieta e é recomendado por associações nutricionais uma ingestão diária de cerca de 60 µg de deste calcogênio (Dumont et al., 2006). Os alimentos ricos em Se são: ovos, castanha-do-pará, salmão, carne vermelha, peixes, brócolis, oleaginosas e cereais (Hu et al., 2012).

3.5 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de compostos orgânicos de selênio

Os compostos orgânicos de Se ao longo dos anos vêm se destacando como promissores agentes farmacológicos para diversas patologias e desordens (Nogueira et al., 2004; Fairweather-Tait et al., 2010; Alehagen e Aaseth, 2015, Solovyev, 2015). Duas conhecidas ações desempenhadas por diversos compostos contendo Se são as ações antinociceptiva (Savegnago et al., 2006; Brüning et al., 2010; Brüning et al., 2014; Rosa et al., 2015) e anti-inflamatória (Schewe, 1995; Nogueira et al., 2003; Jesse et al., 2009; Chagas et al., 2014; Wilhelm et al., 2014).

3.5.1 Ebselen

Um dos compostos orgânicos mais estudados contendo Se é o ebselen (2-fenil-1,2-benzisosselenazol-3(2H)-ona) (Figura 4), o qual é conhecido por mimetizar a atividade da enzima glutathione peroxidase (Müller et al., 1985; Flohé et al., 1973).

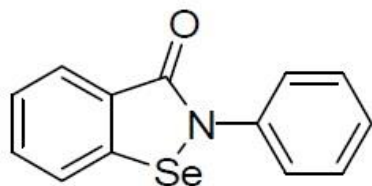


Figura 4. Estrutura química do composto ebselen.

O ebselen é um composto multifuncional, que é capaz de catalisar diversas reações essenciais, visando a proteção de componentes celulares aos danos gerados por estresse oxidativo e radicais livres (Antony e Bayse, 2011). Tendo em vista os inúmeros efeitos benéficos que o ebselen apresenta, em 1997 a “Daiichi Pharmaceuticals” iniciou ensaios clínicos com esse composto, porém, o mesmo acabou não sendo aceito como fármaco por órgãos de vigilância. Mais recentemente, o ebselen segue sendo estudado, e novas perspectivas surgem em relação à ensaios clínicos e à possível comercialização do mesmo (Nogueira e Rocha, 2011; Mason et al., 2013; Parnham e Sies, 2013).

Pode-se encontrar na literatura a atividade antinociceptiva extensamente já relatada do ebselen, a qual é justificada pela capacidade que o composto possui em neutralizar o peroxinitrito e inibir a proteína quinase C, a 5-lipoxigenase e NOS (Parnham e Graf, 1987; Cotgreave et al., 1989; Schewe, 1995; Walther et al., 1999; Mugesh et al., 2001) .

Além de desempenhar ação antinociceptiva, o ebselen é conhecido por exercer função anti-inflamatória, agindo através da neutralização de enzimas envolvidas com o desencadeamento da inflamação em diferentes tecidos, tais como a inibição de algumas lipoxigenases, da prostaglandina H 1 sintase, da NOS, da proteína quinase C (PKC), entre outras (Schewe, 1995; Takasago et al., 1997; Bosch-Morell et al., 2002).

3.5.2 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (Figura 5) é um organocalcogênio que é conhecido como sendo mimético à enzima glutationa peroxidase. Este composto, quando comparado com o ebselen, apresenta menor toxicidade, fator que impulsiona a busca por estudos mais aprofundados das diversas propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila (Meotti et al., 2004).

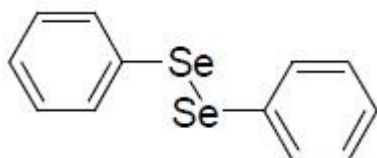


Figura 5. Estrutura química do composto disseleneto de difenila.

O disseleneto de difenila vem sendo estudado intensamente na última década e sua atividade antinociceptiva em diferentes modelos, gerada por diferentes indutores, está sendo extensamente relatada (Savegnago et al., 2008; Jesse et al., 2009; Brüning et al., 2010; Rocha et al., 2013; Brüning et al., 2014; Rosa et al., 2015). Encontra-se na literatura que este composto desempenha sua atividade antinociceptiva possivelmente através do seu envolvimento com as vias glutamatérgicas (mais especificamente envolvimento com os receptores NMDA), adenosinérgica (apresentando envolvimento com os receptores A_{2B}), serotoninérgica, com a via do óxio-nítrico/l-arginina e com canais de potássio (Savegnago et al., 2007).

Em relação à atividade anti-inflamatória do disseleneto de difenila, este composto age de maneira similar ao ebselen, devido a sua característica de exercer atividade tipo-glutationa peroxidase e da sua capacidade de reagir com grupos sulfidrílicos (Wilson et al., 1989).

Nogueira e colaboradores (2003), demonstraram que através de estudos de nocicepção foi possível avaliar que o disseleneto de difenila age de maneira similar aos AINES, através da inibição das COX, e que este composto, diferentemente do ebselen, se demonstrou eficiente em reduzir a nocicepção em ensaios tanto envolvendo indutores químicos quando indutores térmicos (Nogueira et al., 2003).

4 Materiais e Métodos

4.1 Síntese BMOSE e moléculas utilizadas

O composto BMOSE foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, da UFPel e para avaliação do grau de pureza do composto, o mesmo foi submetido à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/MS), apresentando pureza de 99%. Os antagonistas WAY100635, ketanserina e ondansetron foram obtidos através da Sigma-Aldrich. Outros reagentes necessários para diluições e indutores de nocicepção e inflamação (glutamato e formaldeído) foram obtidos na WF científica. Meloxicam (MLX) foi obtido em farmácia comercial.

4.2 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos, pesando entre 25 e 30g, de aproximadamente 2 meses, provenientes do Biotério Central, localizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). No dia do experimento, os animais foram retirados do Biotério e levados até a sala de experimentação, onde lá permaneciam aclimatando por aproximadamente 1 hora, em um ambiente com iluminação e temperatura controlada. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFPEL (CEEA 4343-2015) e todas as medidas necessárias foram tomadas para minimizar ao máximo o sofrimento animal.

A administração do BMOSE foi feita por gavagem e 30 minutos antes do animal ser submetido aos testes. Os tempos escolhidos foram baseados em dados da literatura (Nogueira et al., 2004) (figura 6). Ao mesmo tempo em que foi administrado o composto, um diferente grupo de animais recebeu administração do veículo do composto (óleo de canola). As administrações realizadas para os ensaios comportamentais foram sempre com o volume constante de 10 mL/Kg do peso do animal. MLX (10 mg/Kg) foi utilizado como sendo um fármaco padrão nos ensaios de nocicepção, visto que é mesmo é um anti-inflamatório comercializado e utilizado para combate à dor, além de ter sido amplamente estudado em estudos de nocicepção (Aguirre-Bañuelos e Granados- Soto, 2000; Fleischmann et al., 2002).



Figura 6. Administração por gavagem em camundongos.

4.3 Ensaios comportamentais

4.3.1 Ensaios de nocicepção induzida por modelos químicos

4.3.1.1 Nocicepção induzida por formalina e edema de pata

Para avaliar o possível efeito do BMOSE em evitar a nocicepção induzida por um agente químico, foi realizado o teste de indução de nocicepção através da formalina. O protocolo experimental utilizado foi basicamente o mesmo descrito por Huskaar e Hole, (1985). No dia do experimento os animais foram retirados do Biotério e divididos em 6 grupos:

Grupo 1. Controle negativo: óleo de canola, v.o.;

Grupo 2. Controle positivo: MLX (10 mg/Kg), v.o.;

Grupo 3: BMOSE (0,1 mg/Kg), v.o.;

Grupo 4. BMOSE (1 mg/Kg), v.o.;

Grupo 5. BMOSE (10 mg/Kg), v.o.;

Grupo 6. BMOSE (50 mg/Kg), v.o.;

Os animais receberam o BMOSE, pela via oral, nas diferentes doses, ou o veículo (óleo de canola), e após 30 minutos, os animais receberam uma injeção de 20 μ L de formalina (2,5%) na pata posterior esquerda e salina na pata posterior direita (Figura 7). A injeção foi administrada de maneira intraplantar (i.pl.), na superfície ventral da pata de sustentação traseira (Figura 8).

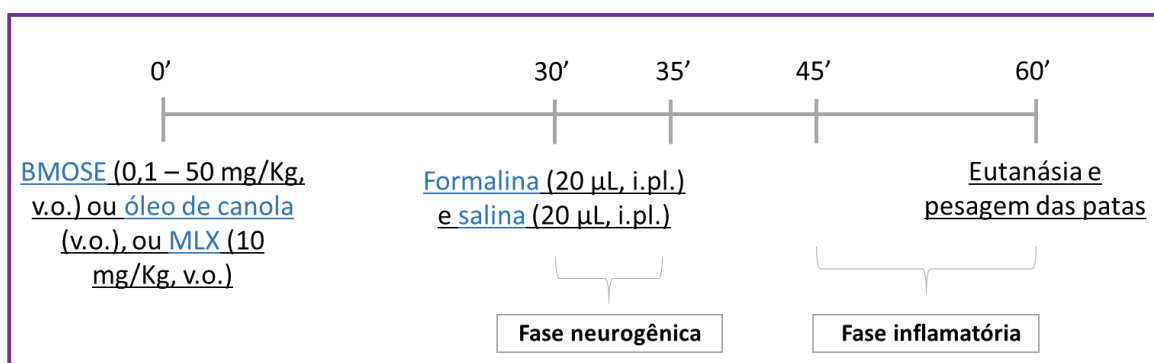


Figura 7. Protocolo experimental do teste de nocicepção induzida pela formalina em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE. BMOSE (0,1, 1, 10 e 50 mg/Kg; v.o.), MLX (meloxicam, 10 mg/Kg; v.o.). Abreviações: v.o = via oral; i.pl.= intraplantar; MLX = meloxicam.



Figura 8. Administração intraplantar de formalina.

Após receberem as injeções, os animais foram colocados em caixas de acrílico específicas para a realização deste ensaio. O tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo a pata a qual recebeu a injeção de formalina (esquerda) foi cronometrado (Figura 9).



Figura 9. Animal lambendo a pata esquerda (indicativo de nocicepção) após receber a injeção de formalina.

O teste da formalina consiste em duas fases de observação. A primeira fase compreende a fase neurogênica, e a observação é feita durante os 5 minutos iniciais do teste, contados a partir da injeção de formalina. A segunda fase é chamada de fase inflamatória, a qual é caracterizada pela geração de uma resposta inflamatória decorrente da injeção de formalina. A observação da fase inflamatória é feita dos 15 aos 30 minutos de teste. Depois dos 30 minutos de teste (60 minutos ao total de experimento), os animais foram eutanasiados e as patas foram removidas para verificar a presença de edema.

A avaliação do edema gerado na pata induzido pela formalina (Figura 10) foi feito imediatamente após a eutanásia, onde a pata direita (recebeu salina) e esquerda (recebeu formalina) foram retiradas e pesadas em uma balança analítica. O resultado da subtração do peso da pata que recebeu formalina, do peso da pata que recebeu somente salina é um indicativo se redução ou não do edema gerado pela formalina por parte do BMOSE.



Figura 10. Diferença entre a pata esquerda (circulada), a qual recebeu a injeção de formalina, e a pata direita, a qual recebeu somente salina. Na pata esquerda observa-se a formação de edema.

4.3.1.2 Nocicepção induzida por glutamato

Assim como a formalina, o glutamato é um agente químico indutor de nocicepção. O protocolo utilizado foi similar ao previamente descrito por Beirith et al., (2002). Para esse protocolo, os animais foram divididos em 6 grupos:

Grupo 1. Controle: óleo de canola, v.o.;

Grupo 2. Controle positivo: MLX (10 mg/Kg), v.o.;

Grupo 3. BMOSE (1 mg/Kg), v.o.;

Grupo 4. BMOSE (10 mg/Kg), v.o.;

Grupo 5. BMOSE (25 mg/Kg), v.o.;

Grupo 6. BMOSE (50 mg/Kg), v.o.;

Após 30 minutos da administração do BMOSE, o animal foi submetido à injeção de glutamato (20 μ mol/pata) na pata direita, para avaliação da possível atividade antinociceptiva do composto (Figura 11).

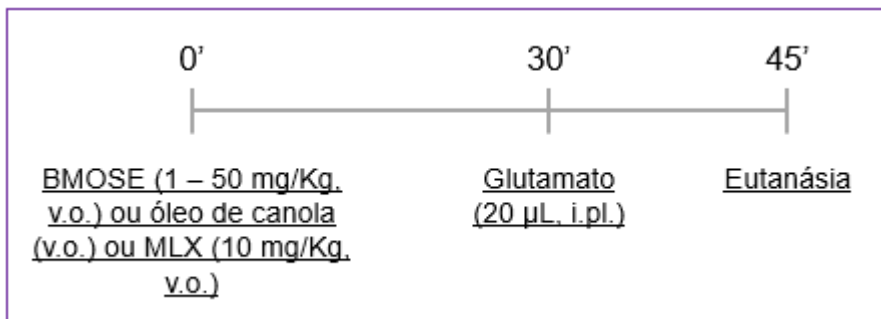


Figura 11. Protocolo experimental da avaliação da nocicepção induzida por glutamato em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE. BMOSE (1, 10, 25 e 50 mg/Kg; v.o.), MLX (meloxicam, 10 mg/Kg; v.o.). Abreviações: v.o. = via oral; i.pl.= intraplantar; MLX = meloxicam.

O tempo de lambida ou/e mordida durante 15 minutos foi cronometrado como um indicativo de nocicepção (Figura 12).



Figura 12. Animal lambendo a pata na qual foi administrada glutamato.

4.3.2 Avaliação do possível mecanismo serotoninérgico na ação antinociceptiva do BMOSE em camundongos

Para investigar o possível mecanismo envolvido na ação antinociceptiva do BMOSE, diferentes grupos de animais receberam um pré-tratamento com antagonistas do sistema serotoninérgico. O teste de nocicepção induzida por glutamato foi escolhido para testar os mecanismos, visto que o glutamato apresenta ação à nível periférico, supraespinal e também espinal (Beirith et al., 2002).

Para investigar a possível contribuição do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do BMOSE, os animais receberam WAY100635 (antagonista de receptor serotoninérgico, 5-HT_{1a}, 0,7 mg/Kg, i.p.), ketanserina (antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{2a/2c}, 0,3 mg/Kg, i.p.) e ondansetron (antagonista seletivo dos receptores 5-HT₃, 0,5 mg/Kg, i.p.). A separação dos grupos ocorreu da seguinte forma:

Grupo 1. Controle: óleo de canola, v.o.;

Grupo 2. WAY100635 (0,7 mg/Kg), i.p.;

Grupo 3. Ketanserina (0,3 mg/Kg), i.p.;

Grupo 4. Ondansetron (0,5 mg/Kg), i.p.;

Grupo 5. WAY100635 (0,7 mg/Kg), i.p. + BMOSE (25 mg/Kg), v.o.;

Grupo 6. Ketanserina (0,3 mg/Kg), i.p. + BMOSE (25 mg/Kg), v.o.;

Grupo 7. Ondansetron (0,5 mg/Kg), i.p. + BMOSE (25 mg/Kg), v.o.;

Os antagonistas foram diluídos em salina (veículo) e administrados via i.p., e depois de quinze minutos da administração dos antagonistas ou do veículo, os animais dos grupos 5, 6 e 7 foram tratados com o BMOSE (25 mg/Kg) ou com seu veículo (óleo de canola). Após 30 minutos da administração do composto, os animais foram submetidos ao ensaio de nocicepção induzida por glutamato (Figura 13).

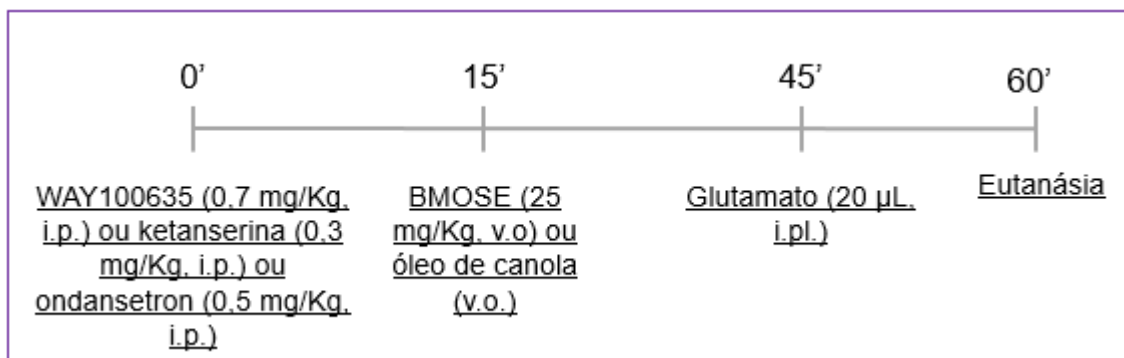


Figura 13. Protocolo experimental da avaliação do possível envolvimento da via serotoninérgica na ação antinociceptiva do BMOSE (25 mg/Kg; v.o.) em camundongos. Abreviações: v.o. = via oral; i.pl.= intraplantar; i.p. =intraperitoneal.

4.3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do BMOSE

4.3.3.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Com o intuito de investigar a possível ação anti-inflamatória do BMOSE, o protocolo seguido foi o descrito por Tubaro et al. (1986). Os camundongos foram pré-tratados com o composto BMOSE (1, 10, 100 mg/Kg, v.o.) ou com dexametasona (DEXA, fármaco padrão, 10 mg/Kg, v.o.), ou somente com o veículo (óleo de canola). Trinta minutos após a administração do BMOSE, foi administrado 20 µL, pela via subcutânea (s.c.), óleo de cróton (2,5%) na orelha direita do animal, com o objetivo de induzir inflamação cutânea. Na orelha esquerda, foi administrado 20 µL de acetona. Após 4 horas da administração, os animais foram eutanaziados e as orelhas foram removidas e pesadas para análise da formação de edema (Figura 14).

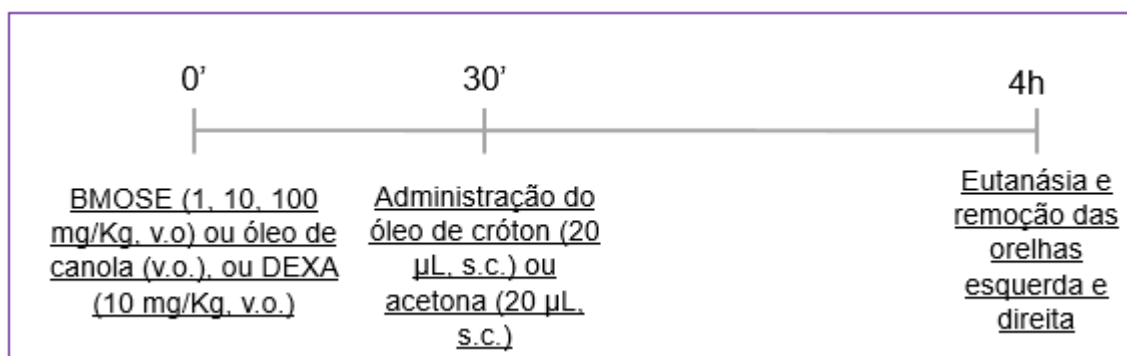


Figura 14. Protocolo experimental da avaliação da inflamação induzida por óleo de cróton em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE. BMOSE (1, 10, 100 mg/Kg; v.o.), DEXA (dexametasona, 10 mg/Kg; v.o.). Abreviações: v.o. = via oral; s.c. =subcutânea.

4.3.3.2 Edema de orelha induzido por fenol

Objetivando investigar a ação anti-inflamatória do BMOSE através de outra técnica, os animais foram divididos em diferentes grupos de tratamento (BMOSE 1, 10, 100 mg/Kg; DEXA 10 mg/Kg; óleo de canola). Após o tempo de ação do BMOSE (30 minutos), foi administrado 20 μ L de fenol (10%) de maneira s.c. na orelha direita do animal e na orelha esquerda, foi administrado 20 μ L de acetona (veículo) (Gábor, 2000). Uma hora depois da administração de fenol, os animais foram eutanaziados e ambas as orelhas foram removidas para avaliação do edema (Figura 15).

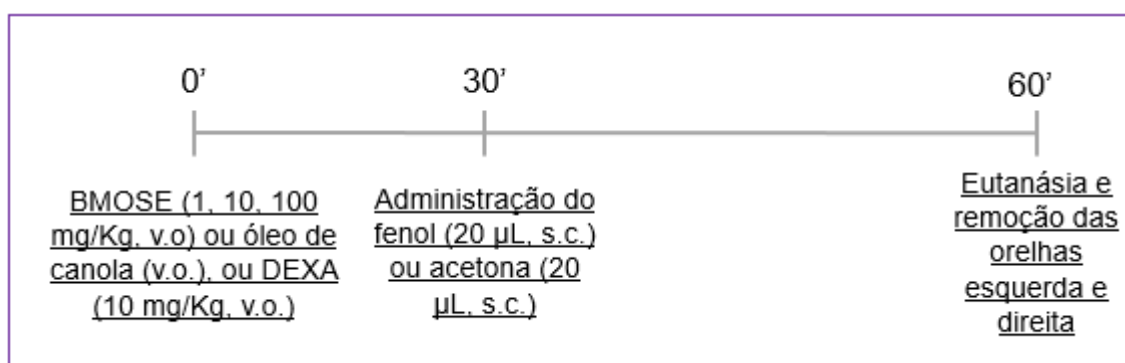


Figura 15. Protocolo experimental da avaliação da inflamação induzida por óleo de cróton em camundongos e possível reversão da mesma por parte da administração do BMOSE. BMOSE (1, 10, e 100 mg/Kg; v.o.), DEXA (dexametasona, 10 mg/Kg; v.o.). Abreviações: v.o. = via oral; s.c. =sub-cutânea.

4.3.4 Ensaio do campo aberto

Para investigar se a administração do BMOSE causa alteração locomotora e exploratória nos animais, o ensaio do campo aberto foi realizado. É importante realizar o ensaio do campo aberto sempre quando se está avaliando a ação de um composto em um ensaio comportamental, visto que este ensaio é capaz de evitar falsos positivos como resultado através da observação locomotora do animal, a qual pode estar alterada pela administração de um composto. Este ensaio é realizado em uma caixa de madeira de aproximadamente 35 cm de altura, 45 cm de comprimento e 45 cm de largura, a qual é dividida por 9 quadrantes idênticos (3 colunas com 3 quadrantes cada).

Para o desenvolvimento do ensaio do campo aberto os animais foram tratados ou com o BMOSE (1, 10, 25, 50 mg/Kg, v.o.), ou com o óleo de canola (v.o.), ou com os diferentes antagonistas serotoninérgicos (WAY100635, ketanserina ou ondansetron, via i.p.), objetivando observar se ocorreria mudança locomotora nos animais tratados. Além destes grupos de tratamento, também foi realizada a administração do BMOSE (25 mg/Kg) em conjunto com um dos antagonistas (WAY00635, ketanserina, ou ondansetron), visando avaliar se a interação do composto com o antagonista desenvolveria alteração locomotora nos animais. Após trinta minutos, o animal é colocado no quadrante central da caixa de teste e é contado o número de quadrantes que o animal percorre, cruzando com as 4 patas, durante 5 minutos (Walsh and Cummins, 1976).

4.4 Determinação da toxicidade aguda do BMOSE

Para avaliação da possível toxicidade aguda do composto BMOSE, os animais foram divididos em dois grupos de 5 animais cada, no qual o primeiro grupo recebeu somente o veículo e o segundo grupo recebeu uma única dose do composto (200 mg/Kg) e após 72h foi realizada a eutanásia. O ganho de peso dos animais foi observado, como sendo um sinal da possível toxicidade do composto. O cálculo do ganho de peso foi realizado através da subtração do peso dos animais após as 72h, do peso dos mesmos na primeira hora de teste (0h). Depois de 72h, os animais foram anestesiados para o procedimento de coleta de sangue via punção cardíaca. O sangue foi coletado diretamente em um tubo contendo heparina sódica e foi centrifugado à 2000xg por 10 minutos, e utilizado para ensaios bioquímicos de avaliação de toxicidade.

Como um marcador de dano hepático, foram analisadas as atividades das enzimas plasmáticas AST e ALT. A função renal foi analisada através da quantificação dos níveis creatinina. Todos os parâmetros foram determinados através de métodos colorimétricos utilizando kits comerciais (Labtest Diagnostica). A AST e ALT foram expressas em UI/L, e a creatinina foi expressa em mg/dL. Além disso, foi realizado o ensaio de avaliação da atividade da enzima δ -ALA D, através da quantificação dos níveis de porfobilinogênio (PBG) nos tecidos rim, fígado e cérebro total dos animais, e o resultado obtido foi expresso em nmolPBG/mg de proteína/hora.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por Análise de Variância ANOVA de uma via, ou ANOVA de duas vias, dependendo de qual resultado que estava sendo analisado, seguido pelo teste *post hoc* de Student-Newman-Keuls, através do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão e considerados significativos quando $p < 0,05$.

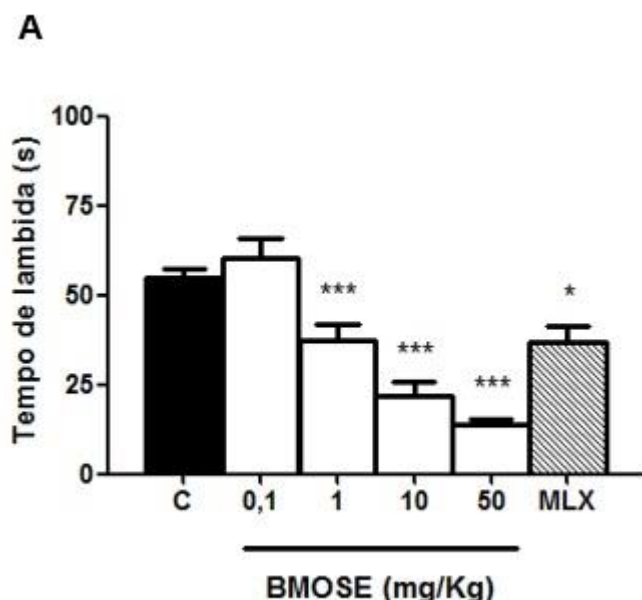
5 Resultados

5.1 Atividade antinociceptiva do BMOSE

5.1.1 Nociceção induzida por formalina

Os resultados apresentados na figura 16 são referentes à ação do BMOSE (0,1 - 50 mg/Kg) no ensaio de nociceção induzida por formalina nas diferentes fases de observação. Pode-se observar na figura 16 A, que o BMOSE nas doses de 1, 10 e 50 mg/Kg foi eficaz em reduzir o tempo de lambida da pata induzida por formalina na primeira fase do teste em camundongos quando comparado com o controle.

Em relação à fase 2 do teste da formalina (B), o composto (10 e 50 mg/Kg), foi capaz de reduzir o tempo de lambida ($p < 0,001$) em camundongos. Em relação ao edema (C), o BMOSE não foi capaz de reduzir o edema em nenhuma das doses testadas quando comparadas ao controle. O fármaco de referência, MLX (10 mg/Kg, v.o.) reduziu o tempo de lambida da pata esquerda em ambas as fases de teste ($p < 0,05$ na fase 1 e $p < 0,001$ na fase 2).



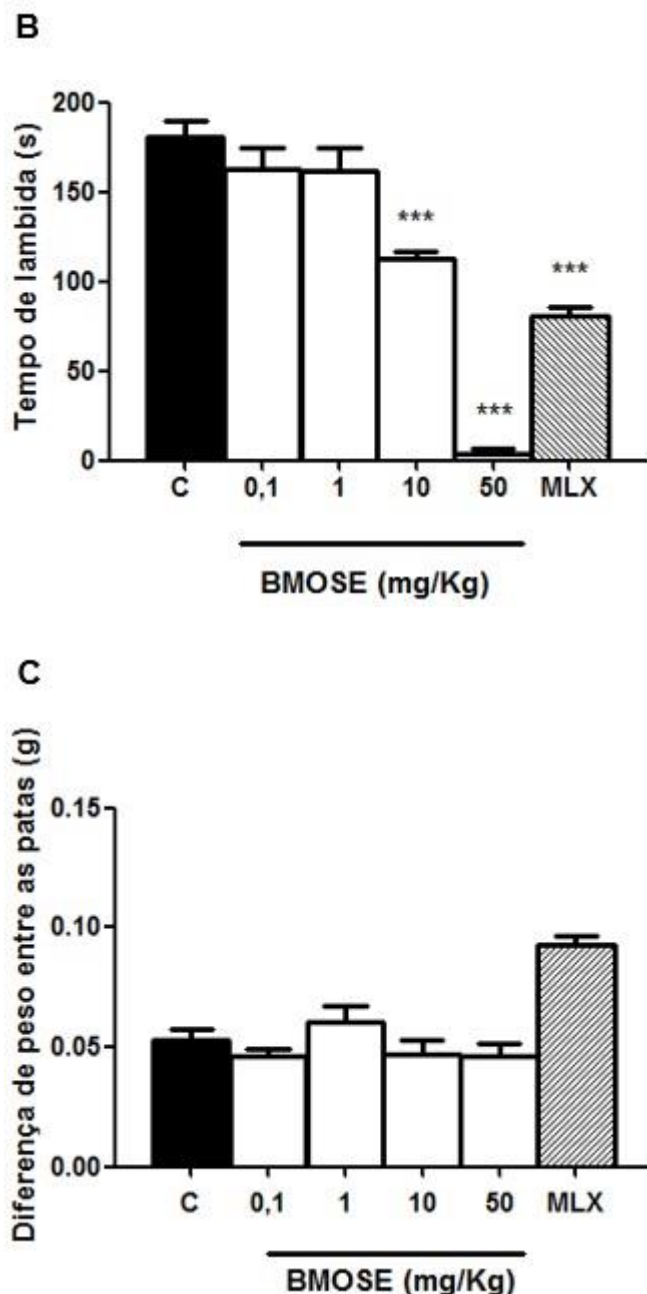


Figura 16. Efeito do BMOSE (0,1-50 mg/Kg) no tempo de lambida da pata induzida por formalina em camundongos, na fase 1 (0 – 5 minutos, fase neurogênica, A), fase 2 (15 – 30 minutos, fase inflamatória, B) e edema (C). Abreviações: C indica o controle, grupo o qual foi tratado somente com óleo de canola. MLX é o fármaco de referência (meloxicam, 10 mg/Kg, v.o.). Os resultados estão expressos como média \pm D.P.M de 10 animais por grupo. Os asteriscos são referentes ao nível de significância de cada resultado obtido quando comparado ao grupo controle, através da avaliação por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$.

5.1.2 Nociceção induzida por glutamato

É possível constatar que no decorrer dos 15 minutos de teste, o composto (10, 25 e 50 mg/Kg) foi eficaz em reduzir o tempo de lambida da pata causado pela administração de glutamato (Figura 17). Além disso, a administração da dose de 10 mg/Kg levou à uma redução do tempo de lambida da pata menos significativa quando comparada às doses de 25 e 50 mg/Kg, apresentando um $p < 0,05$, enquanto as doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram o $p < 0,001$.

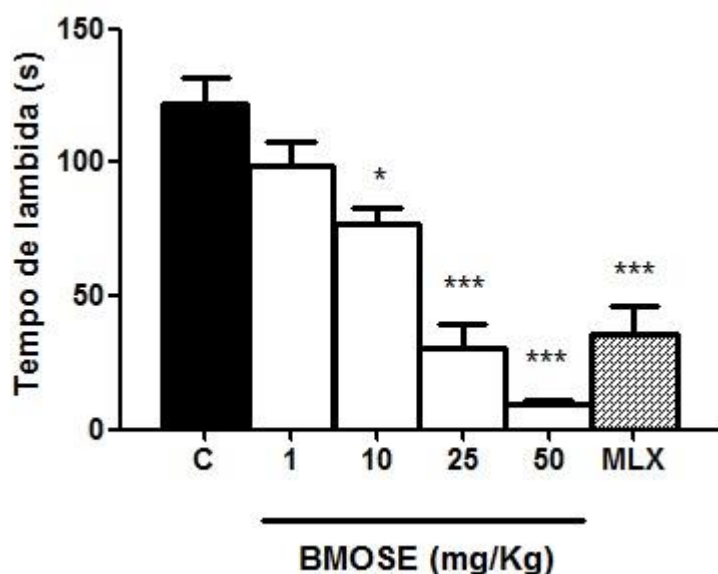


Figura 17. Efeito do BMOSE (1 - 50 mg/Kg) no tempo de lambida da pata induzida por glutamato em camundongos. O tempo total de lambida da pata foi cronometrado durante 15 minutos, e considerado um indicativo de nociceção. Abreviações: C indica o controle, grupo o qual foi tratado somente com óleo de canola. MLX: meloxicam (10 mg/Kg, v.o.). Os resultados estão expressos como média \pm D.P.M de 10 animais por grupo. Os asteriscos são referentes ao nível de significância de cada resultado obtido quando comparado ao grupo controle, através da avaliação por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$.

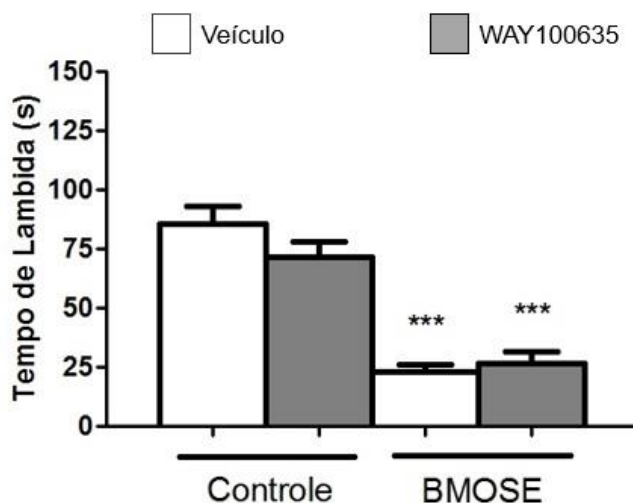
5.2 Avaliação dos possíveis mecanismos de ação do BMOSE na atividade antinociceptiva

5.2.1 Mecanismo serotoninérgico

Como pode-se observar nas Figuras 18 A e B, os antagonistas WAY100635 e ketanserina, respectivamente, antagonistas não se demonstraram estar envolvidos no efeito antinociceptivo do BMOSE (25 mg/Kg, v.o.). Através da avaliação do

resultado via ANOVA de uma via, não houve interação estatisticamente significativa entre o BMOSE e os antagonistas ketanserina e WAY100635.

Por sua vez, a administração do antagonista ondansetron (Figura 18 C), bloqueou a ação do BMOSE demonstrando ocorrer interação entre o mesmo e o antagonista. Segundo a análise ANOVA de duas vias, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa no tratamento com BMOSE (25 mg/Kg) [F(1,16) = 58,8, P = 0,0001], no tratamento com o antagonista ondansetron [F(1,16) = 6,16, P = 0.0201] e no tratamento BMOSE em conjunto com o ondansetron, demonstrando a interação entre ambos [F(1,16) = 12,34, P = 0,0029].

A

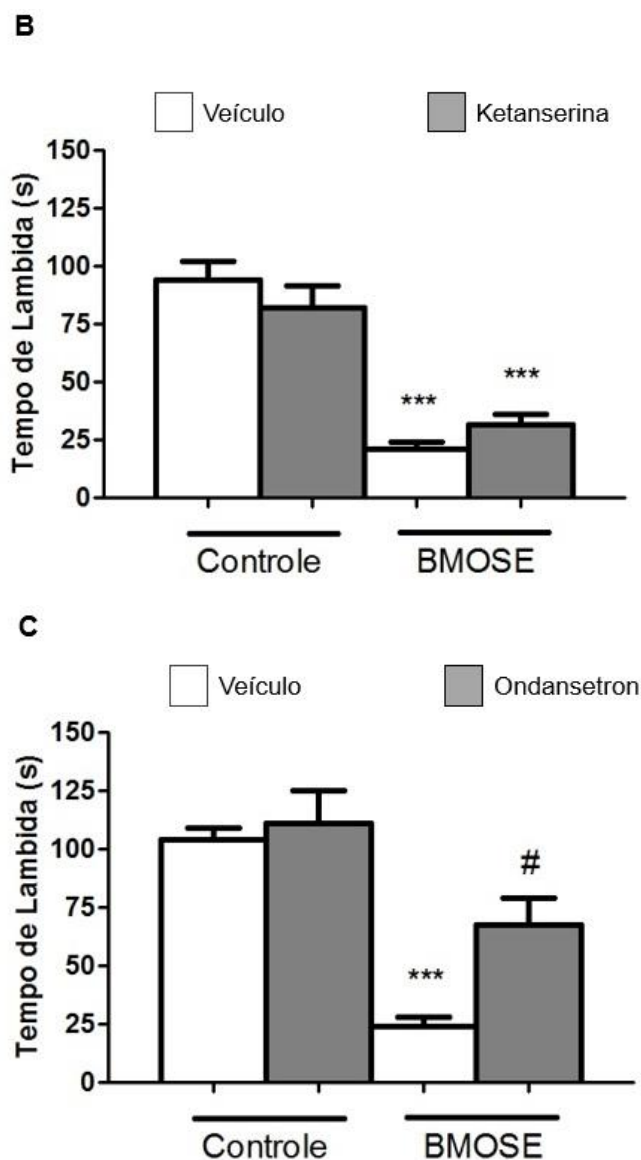


Figura 18. Efeito do pré-tratamento dos animais com os antagonistas serotoninérgicos WAY100635 (0,7 mg/Kg, i.p., A), ketanserina (0,3 mg/Kg, i.p., B) e ondansetron (0,5 mg/Kg, i.p., C) na ação antinociceptiva do BMOSE no ensaio de nociceção induzida por glutamato. O BMOSE foi administrado na dose de 25 mg/Kg. O tempo total de lambida da pata foi cronometrado durante 15 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm D.P.M de 10 animais por grupo. Os asteriscos são referentes ao nível de significância de cada resultado obtido quando comparado ao grupo controle. Os resultados presentes nos gráficos A e B foram avaliados através de ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, enquanto os resultados presentes no gráfico C foram avaliados através de ANOVA de duas vias, tendo em vista a interação entre o antagonista ondansetron e o BMOSE, resultado representado pelo #. (***) $p < 0,001$ (#) $p < 0,0029$.

5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do BMOSE

5.3.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O resultado obtido do ensaio de indução de edema na orelha dos camundongos pode ser observado na figura 19. O BMOSE (100 mg/Kg) apresentou capacidade de reduzir o edema de orelha quando comparado com o controle ($p < 0,05$). O fármaco padrão, DEXA, foi eficaz em reduzir o edema de orelha, gerado pela administração de óleo de cróton, quando comparado com o controle ($p < 0,01$). As doses de 1 e 10 mg/Kg não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

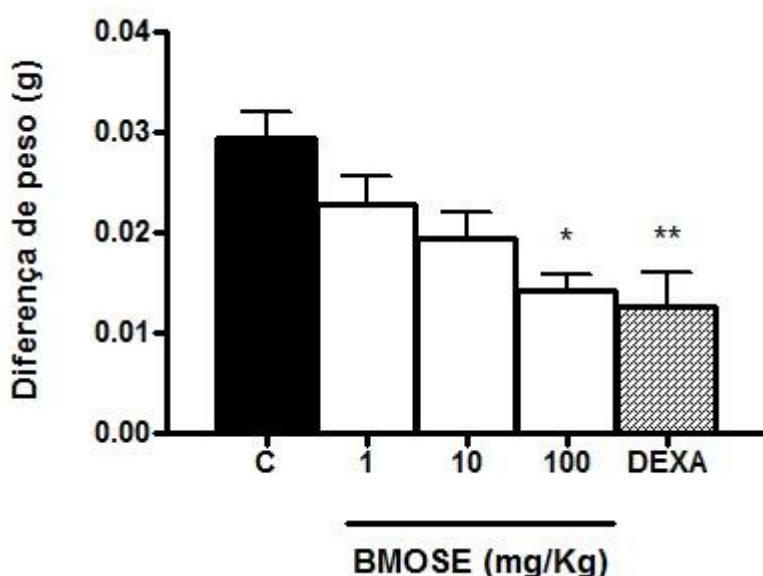


Figura 19. Efeito do BMOSE no ensaio de indução de edema de orelha por óleo de cróton. A diferença de peso entre as orelhas que receberam diferentes administrações (acetona ou óleo de cróton) foi utilizado como um indicativo de inflamação. Abreviações: C: controle (óleo de canola). DEXA: dexametasona (10 mg/Kg, v.o.). Os resultados estão expressos como média \pm D.P.M de 7 - 10 animais por grupo. Os asteriscos são referentes ao nível de significância de cada resultado obtido quando comparado ao grupo controle, através da avaliação por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$.

5.3.2 Edema de orelha induzido por fenol

Na figura 20 pode-se observar o resultado obtido do ensaio realizado de indução de edema de orelha por administração de fenol. O BMOSE na dose de 100 mg/Kg apresentou capacidade de reduzir o edema de orelha quando comparado com o controle ($p < 0,01$). Em relação ao fármaco padrão, pode-se observar que a dose de

100 mg/Kg agiu parcialmente da mesma maneira que a DEXA ($p < 0,001$). As doses de 1 e 10 mg/Kg não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

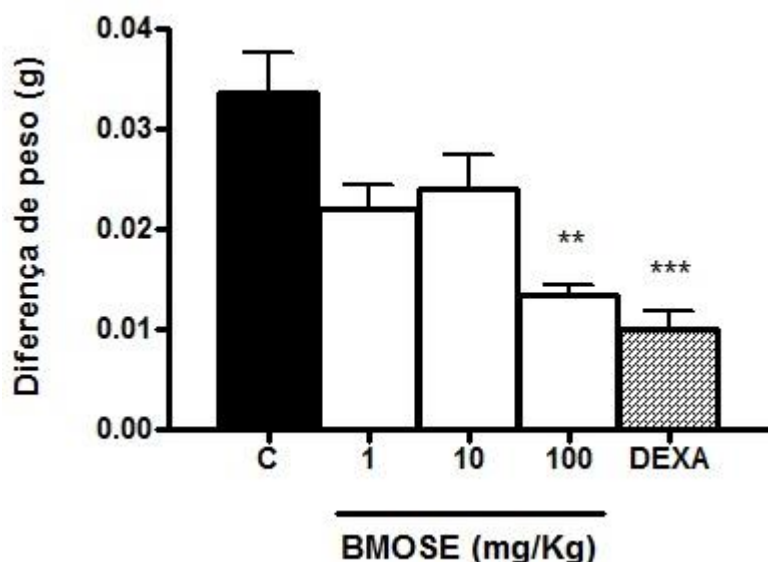


Figura 20. Efeito do BMOSE no ensaio de indução de edema de orelha induzido por fenol. A diferença de peso entre as orelhas que receberam diferentes administrações (acetona ou fenol) foi utilizado como um indicativo de inflamação. Abreviações: C: controle (óleo de canola). DEXA: dexametasona (10 mg/Kg, v.o.). Os resultados estão expressos como média \pm D.P.M de 7 - 10 animais por grupo. Os asteriscos são referentes ao nível de significância de cada resultado obtido quando comparado ao grupo controle, através da avaliação por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$.

5.4 Ensaio do campo aberto

Segundo a observação da Figura 21, é possível afirmar que o composto BMOSE nas diferentes doses testadas (1 - 50 mg/Kg) não altera a atividade locomotora do animal, visto que nenhuma dose administrada mostrou ser estatisticamente diferente do controle. Este resultado demonstra que a administração o composto não gerou alterações locomotoras que possam ter interferido nos resultados apresentados nos testes de nocicepção induzida por formalina e glutamato.

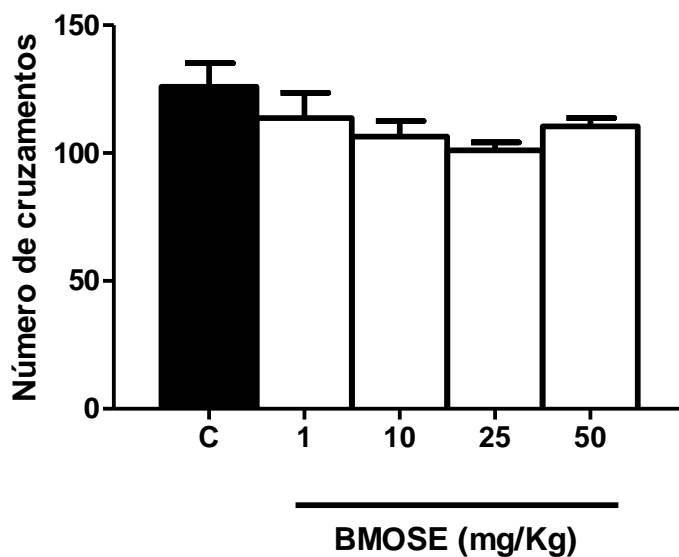


Figura 21. Efeito do BMOSE no comportamento locomotor do ensaio do campo aberto. O número de cruzamentos de um quadrante ao outro foram avaliados como sendo a atividade locomotora do animal. Abreviações: C= controle. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Foi realizado também o ensaio do campo aberto nos animais que receberam a administração dos antagonistas e do BMOSE e obtiveram-se resultados semelhantes ao da figura 21. Nenhuma alteração locomotora foi relatada nos animais que receberam somente o antagonista, bem como nos animais que receberam o antagonista e o BMOSE na dose de 25 mg/Kg, demonstrando dessa forma, que a interação do composto com o antagonista não interferiu na locomoção do animal, impedindo assim, resultados falso-positivos no teste de nocicepção induzida por glutamato (dados não demonstrados).

5.5 Determinação da toxicidade aguda do BMOSE

Uma única dose administrada do BMOSE (200 mg/Kg) não levou à morte de nenhum animal e nem a mudanças significativas no peso dos mesmos (Tabela 1). A atividade plasmática das enzimas AST e ALT e os níveis de creatinina permaneceram inalterados, quando comparados com o controle, após o tratamento com o BMOSE. Além disso, não foi constatada nenhuma alteração na atividade renal, hepática e

cerebral na atividade da enzima δ -ALA-D dos animais que receberam o tratamento com o BMOSE (Tabela 2).

Através destes resultados, pode-se afirmar que o composto BMOSE não apresenta toxicidade renal, hepática e cerebral, o que impulsiona a continuação da investigação de outras possíveis atividades biológicas desse composto.

Tabela 1. Efeito da administração do BMOSE (200 mg/Kg) no ganho de peso em camundongos.

Grupo	Ganho de peso (g)
Controle	0,15 ± 0,089
200	0,1 ± 0,054

O ganho de peso foi expresso em g/animal. Os dados foram apresentados segundo a média ± D.P.M. de 5 animais por grupo.

Tabela 2. Efeito da administração do composto (200 mg/Kg) em camundongos, nas atividades das enzimas AST, ALT e δ -ALA-D, e nos níveis de creatinina.

Grupo	AST	ALT	Creatinina	δ -ALA-D		
				Hepática	Renal	Cerebral
Controle	68,0 ± 20,36	64,40 ± 7,36	1,377 ± 0,53	4,337 ± 1,62	1,560 ± 0,54	0,4238 ± 0,04
200	63,50 ± 36,74	69,60 ± 20,61	0,0737 ± 0,11	5,663 ± 1,29	1,240 ± 0,32	0,4748 ± 0,05

As atividades da AST e ALT foram expressas em U/l, os níveis de creatinina foram expressos em mg/dl e a atividade da enzima δ -ALA-D foi expressa em nmol PBG/mg proteína/h. Os dados foram apresentados segundo a média ± D.P.M. de 5 animais por grupo. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

6 Discussão

A dor é uma condição incapacitante que afeta milhares de pessoas diariamente, e mesmo com a ampla gama de fármacos analgésicos disponíveis no mercado, ainda não existe um fármaco que proporcione um tratamento inteiramente eficaz, sem ocasionar o surgimento de efeitos adversos (Mendell e Sahenk, 2003). Portanto, é de grande importância a busca por novos fármacos, seguros e eficazes, que possam vir a ser empregados no tratamento da dor e inflamação.

Tendo em vista o que foi descrito, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os relatos literários da possível ação farmacológica dos compostos orgânicos de selênio (Brüning et al., 2007; Chagas et al., 2014; Luchese et al., 2010; Rosa et al., 2015). O tratamento oral do BMOSE foi eficaz em reduzir a dor nociceptiva nos ensaios de nocicepção induzida por formalina e glutamato, agindo da mesma maneira que o fármaco padrão para tratamento de dor e inflamação disponível no mercado, o MLX. Além disso, mostrou-se também eficaz em reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton e por fenol, demonstrando assim, seu potencial anti-inflamatório e antiedematogênico.

O teste da formalina é amplamente utilizado em ensaios de avaliação do potencial antinociceptivo de compostos, tendo em vista que a injeção de formalina ocasiona ativação de nociceptores (fibras A δ e C) localizados nos diferentes tecidos periféricos. A injeção de formalina é reconhecida como um estímulo nocivo, o qual é reconhecido por uma das moléculas sinalizadoras específicas, a TRPA1. Além disso, este modelo compreende ambas as fases da dor, a de nocicepção, a qual compreende a dor aguda, e a de dor inflamatória, a qual compreende a liberação de mediadores pró-inflamatórios, sendo assim, um teste completo (Shibata et al., 1989; Gonçalves et al., 2008).

Em relação aos resultados obtidos no teste de nocicepção induzida por formalina, na fase neurogênica, pode-se observar que as doses de 1, 10 e 50 mg/Kg do BMOSE reduziram efetivamente o tempo de lambida na pata, demonstrando assim, seu efeito antinociceptivo. De fato, quando comparado com o fármaco de referência (MLX), as doses efetivas do BMOSE apresentaram resultados estatisticamente mais significativos que o MLX, demonstrando assim a ação

antinociceptiva do composto. Este ocorrido pode-se relacionar ao fato de que o MLX é um AINE e apresentaria ação mais significativa somente na fase inflamatória do teste (Shibata et al., 1989). Em relação à fase inflamatória, o BMOSE foi eficiente em reduzir o tempo de lambida nas doses de 10 e 50 mg/Kg, quando comparado com o controle, atuando similarmente ao MLX. Em relação ao edema de pata no teste da formalina, nem o BMOSE e nem o MLX foram eficazes em reduzir o edema de pata gerado pela injeção de formalina. A não redução do edema de pata por parte do MLX possivelmente pode-se dar ao fato de que o tempo de ação desse anti-inflamatório é de 30 à 90 minutos, podendo assim o tempo de teste não ter compreendido o tempo necessário para que ocorresse a redução do edema.

Outro ensaio realizado para avaliar a atividade antinociceptiva do BMOSE foi o de indução de nocicepção através da injeção i.pl. de glutamato, o qual é um mediador químico assim como a formalina. O glutamato, por sua vez, é um agonista dos receptores glutamatérgicos, portanto através desse ensaio é possível avaliar se a ação antinociceptiva do BMOSE pode estar relacionada ao envolvimento do sistema glutamatérgico.

Diferentemente do ensaio de nocicepção induzida por formalina, no ensaio do glutamato se cronometra 15 minutos a partir da injeção do mediador químico e este ensaio abrange somente a fase nociceptiva, visto que o glutamato não é um mediador inflamatório. O resultado antinociceptivo do BMOSE no teste da nocicepção induzida por glutamato é de grande importância, tendo em vista que o glutamato desempenha um importante papel no processo nociceptivo tanto à nível periférico quanto central (Fundytus, 2001; Beirith et al., 2002). Baseado nos resultados apresentados, pode-se observar claramente que o BMOSE foi eficaz em reduzir a nocicepção induzida por glutamato, demonstrando assim, que o sistema glutamatérgico está envolvido com o mecanismo de ação do BMOSE.

Visando avaliar o possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do BMOSE, foi feita a administração de antagonistas dos receptores 5-HT_{1a}, 5-HT_{2a}, 5-HT_{2c} e 5-HT₃. Têm-se bem claro na literatura, que a sensação de dor pode ser modificada por vias descendentes inibitórias no SNC, e que o principal neurotransmissor envolvido com essa via descendente é a serotonina (Brüning et al., 2014). A ativação dessas vias descendentes a partir do núcleo da raphe até o corno

dorsal, mediadas pela serotonina, é capaz de inibir a transmissão da dor (Fields e Basbaum, 1994; Millan, 2002). Tendo em vista essa informação, compostos antidepressivos que modulam o sistema serotoninérgico são amplamente utilizados no tratamento da dor, visto que a analgesia desencadeada por tais compostos pode ser obtida através de uma única dose (Fishbain et al., 2000; Duman, 2004).

Um importante dado obtido no presente estudo, foi o da observação da ocorrência do bloqueio da resposta antinociceptiva do BMOSE quando administrado juntamente com o antagonista ondansetron, demonstrando dessa forma, o envolvimento da ação antinociceptiva do composto com os receptores serotoninérgicos 5-HT₃. É importante ressaltar que não foram observadas mudanças na atividade locomotora dos animais que receberam o tratamento do antagonista em conjunto com o BMOSE.

Objetivando a investigação da possível ação anti-inflamatória do BMOSE, o teste da indução de inflamação por óleo de cróton foi utilizado. Esse teste já foi amplamente descrito na literatura e é frequentemente empregado em estudos envolvendo inflamação. O óleo de cróton leva à inflamação na orelha através da ativação da PKC no local, podendo assim se observar inchaço do tecido e características associadas à inflamação (Bertolini et al., 2003; Tintinger et al., 2009).

O BMOSE mostrou-se capaz de reduzir a inflamação (100 mg/Kg) quando comparado com o controle, agindo da mesma forma que o anti-inflamatório DEXA. O mecanismo de ação da DEXA é através da capacidade que esse fármaco possui de modular a produção de metabólitos do ácido araquidônico, através da inibição das enzimas COX e lisil oxidase (LOX), ou através da estimulação à produção de eicosanóides anti-inflamatórios (Lawrance et al., 2002).

Outro teste empregado para avaliar a atividade anti-inflamatória do BMOSE foi o teste de indução de inflamação por fenol. A indução de inflamação decorrente da administração de fenol ocorre através da ruptura da membrana dos queratinócitos, células características da epiderme. Essa ruptura resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a Interleucina 1 alfa (IL-1 α), TNF- α e IL-8, através do mecanismo de ativação independente da via da PKC, assim como ocorre na inflamação induzida pelo óleo de cróton (Murray et al., 2007). A ativação da PKC por sua vez, leva à liberação de outros mediadores inflamatórios, tais como metabólitos

do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio, que além de ocasionar em inflamação, pode levar também à formação de edema mais severo, eritema e necrose (Brown et al., 1975; Wilmer et al., 1994; Murray et al., 2007; Chibli et al., 2014; Da Silva et al., 2015; Pinto et al., 2015). O composto BMOSE foi eficaz em reduzir o edema de orelha gerado pela administração s.c. de fenol na dose de 100 mg/Kg, podendo assim, seu mecanismo de ação ser similar ao da DEXA.

O presente estudo apresentou o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do BMOSE em doses que não apresentaram toxicidade. A segurança de um composto é a característica mais importante que o mesmo deve conter, e é item indispensável em estudos de compostos que apresentam potencial farmacêutico. O BMOSE demonstrou ser um composto que possivelmente não apresenta toxicidade, impulsionando assim, o desenvolvimento de mais estudos envolvendo o mesmo, especialmente estudos que busquem investigar diferentes mecanismos de ação que também possam estar envolvidos com a ação antinociceptiva do BMOSE.

7 Conclusão

Os dados apresentados acima indicam que o BMOSE foi capaz de reduzir a nocicepção induzida através da injeção tanto de glutamato quanto de formalina, em diferentes doses testadas, demonstrando assim, sua ação tanto à nível periférico quanto à nível central. Pôde-se observar que o composto BMOSE apresenta interação com a via serotoninérgica, mais especificamente com o receptor 5-HT₃, resultado o qual demonstra que a ação antinociceptiva desse composto está envolvida com essa via de neurotransmissor.

Portanto, conclui-se que o BMOSE é um atrativo candidato à composto antinociceptivo e que mais estudos de nocicepção podem vir a ser investigados, tais como estudo de nocicepção induzida por agente térmico através do ensaio da placa quente e da imersão da cauda. Objetivando investigar outros mecanismos envolvidos com a atividade anti-inflamatória do BMOSE, diferentes indutores de inflamação, como por exemplo a carragenina, o cinamaldeído, o TNF- α , entre outros, podem vir a ser empregados nos próximos estudos com esse composto.

Referências

AIRA, Z.; BUESA, I.; SALGUEIRO, M.; BILBAO, J.; AGUILERA, L.; ZIMMERMANN, M.; AZKUE, J.J. Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. **Neuroscience**. 168. p. 831-841.

ALMEIDA, T.F.; ROIZEZBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. 1000. p. 40-56, 2004.

AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**. 395. p. 9-13, 2000.

ALEHAGEN, U.; AASETH, J. Selenium and coenzyme Q10 interrelationship in cardiovascular diseases - a clinician's point of view. **Journal of trace elements in medicine and biology**. 31. p. 157-161, 2015.

ANTONY, S.; BAYSE, C.A. Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. **Inorganic Chemistry**. 50. p. 12075-12084, 2011.

APKARIAN, A.V.; BALIKI, M.N.; GEHA, P.Y. Towards a theory of chronic pain. **Progress in Neurobiology**. 87. p. 81-89, 2009.

BARDIN L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. **Behavior Pharmacology**. 22. p. 390-404, 2011.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T.M. Em: **Principles of Neuroscience**. New York, 472–491, 2000.

BEDNARIK, J.; VLOCKOVA-MORAVCOVA, E.; BURSOVA, S. Etiology of small-fiber neuropathy. **Journal of Peripheral Nervous System**. 14. p. 177-183, 2009.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**. 924. p.219-228, 2002.

BERTOLINI, T.M.; GIORGIONE, J.; HARVEY, D.F.; NEWTON, A.C. Protein kinase C translocation by modified phorbol esters with functionalized lipophilic regions. **Journal of Organic Chemistry**. 68. p. 5028-5036, 2003.

BOSCH-MORELL, F.; ROMÁ, J.; MARÍN, N.; ROMERO, B.; RODRIGUEZ-GALIETERO, A. Role of oxygen and nitrogen species in experimental uveitis: anti-inflammatory activity of the synthetic antioxidant ebselen. **Free Radical Biology and Medicine**. 33. p. 669-675, 2002.

BRENNAN, F.; CARR, D.B.; COUSINS, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesthesia and analgesia**. 105. p. 205 -221, 2007.

BROD, L.M.P ; FRONZA, M.G ; WILHELM, E.A ; LUCHESE, C ; VARGAS, J. P. ; LÜDTKE, DIOGO S ; SAVEGNAGO, L. . Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside in the mouse tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 65. p. 201-207, 2016.

BROWN, V.K.H.; BOX, V.L.; SIMPSON, B.J. Decontamination procedures for skin exposed to phenolic substances. **Archives of Environmental Health**. 30. p. 1-6, 1975.

BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; ROEHRS, J.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidences for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. **European Journal of Pharmacology**. 644, p. 49-54, 2010.

BRÜNING, C.A.; GAI, B.M.; SOARES, S.M.; MARTINI, F.; NOGUEIRA, C.W. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 125. p. 15-20, 2014.

CHAGAS, P.M.; ROSA, S.G.; SARI, M.H.M.; OLIVEIRA, C.E.S.; CANTO, R.F.S.; DA LUZ, S.C.A.; BRAGA, A.L.; NOGUEIRA, C.W. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 118. p. 87-95, 2014.

CHEN, Y.; BOETTGER, M.H.; REIF, A.; SCHMITT, A.; UCEYLER, N.; SOMMER, C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Molecular pain**. 6. p. 13-19.

CHIBLI, L.A.; RODRIGUES, K.C.; GAPARETTO, C.M.; PINTO, N.C.; FABRI, R.L.; SCIO, E.; ALVES, M.R. Anti-inflammatory effects of Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**. 154. p. 330-338, 2014.

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

COHEN, M.; QUINTER, J.; BUCHANAN, D. Is chronic pain a disease? **Pain medicine**. 14. p. 1284-1288, 2013.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Reviews in Neuroscience**. 32. p. 1-32, 2009.

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? **Biochemistry and Pharmacology**. 38. p. 649-656, 1989.

CUI, G.B.; AN, G.Z.; ZHANG, N.; ZHAO, M.G.; LIU, S.B, JI, L. Elevated interleukin-8 enhances prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. **Molecular Pain**. 12. p. 8-11, 2012.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 521. p. 22-39, 2003.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Pain and analgesia**. 25. p. 243-254, 2011.

DA SILVA, J.M.; CONEGUNDES, J.L.; MENDES, R.F.; PINTO, N.C.; GUALBERTO, A.C.; RIBEIRO A.; GAMEIRO, J.; DE AGUIAR, J.A.; CASTAÑO, M.C.; SCIO, E. Topical application of the hexane fraction of *Lacistema pubescens* reduces skin inflammation and cytokine production in animal model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 67. p. 1613-1622, 2015.

DE JONGH, R.F.; VISSERS, K.C.; MEERT, T.F.; BOOJI, L.H.; DE DEYNE, C.S.; HEYLEN, R.J. The role of interleukin-6 in nociception and pain. **Anesthesia and Analgesia**. 96. p. 1096-1103, 2003.

DONATO, F. ; PAVIN, N. F.; Goes, A.T.R ; Souza, L.C ; SOARES, L. C. ; Rodrigues, O.E.D; JESSE, Cristiano R.; SAVEGNAGO, L . Antinociceptive and anti-hyperalgesic effects of bis(4-methylbenzoyl) diselenide in mice: Evidence for the mechanism of action. **Pharmaceutical Biology**. 53. p. 395-403, 2015.

DUMAN, E.N; KESIM, M.; KADIOGLU, M.; YARIS, E.; KALYONCU, N.I.; ERCIYES, N. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **Journal of Pharmacological Sciences**. 94. p.161-165, 2004.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 385. p.1304-1323, 2006.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; BAO, Y.; BROADLEY, M.R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J.E.; HURST, R. Selenium in human health and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**. 14. p.1337-1383, 2010.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.I. Prostaglandin, hyperalgesia, a cAMP/calcium²⁺ dependent process. **Prostaglandins**. 18. p. 179-190, 1979.

FISHBAIN, D.A.; CUTLER, R. ROSOMOFF, H.L.; ROSOMOFF, R.S. Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. **Pain Medicine**. 1. p. 310-6, 2000.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; Central nervous system mechanisms of pain modulation. Em: Wall PD, Melzack R, eds. **Textbook of pain**. 3rd ed. Edinburgh. p. 243-57, 1994.

FLEISCHMANN, R.; IQBAL, I.; SLOBODIN, G. Meloxicam. Expert Opinion on **Pharmacotherapy**. 3. p. 1501-1512, 2002.

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

FONSECA, S.F.; LIMA, D.B.; ALVES, D.; JACOB, R.G.; PERIN, G.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. Synthetis, characterization and antioxidant activity of organoselenium and organotellurium compound derivatives of crhysin. **New Journal of Chemistry**. 39. p. 3043-3050, 2015.

FREIRE, M.A.; GUIMARAES, J.S.; LEAL, W.G.; PEREIRA, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Frontiers in neuroscience**. 3. p. 175-182, 2009.

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

GÁBOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. **Akademiai Kiadó**, Budapest, 2001.

GERZSON, M.F.B.; VICTORIA, F.N.; RADATZ, C.S.; DE GOMES, M.G.; BOEIRA, S.P.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; JESSE, C.R.; SAVEGNAGO, L. In vitro antioxidant activity and in vivo antidepressant-like effect of -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 102, p. 21-29, 2012.

GRICHNIK, K.P.; FERRANTE, F.M. The **Mount Sinai Journal of Medicine**. 58. p. 217-220, 1991.

HAMMOND, D.L. Control systems for nociceptive afferent processing: the descending inhibitory pathways. Em: Yaksh T, eds. Spinal afferent processing. New York: **Plenum Press**. p. 363-390, 1986.

HAMON, M.; BOURGOIN, S. Serotonin and its receptors in pain controls. Em: Sawynok, J.; Cowan, A. Novel Aspects of Pain Management: **Opioids and Beyond**. John Wiley and Sons, New York. p. 203-228, 1999.

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

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Reviews of Biochemistry**. 54. p. 237-271, 1985.

HU, Y.; McIntosh, G.H.; YOUNG, G.P. Selenium-rich foods: a promising approach to colorectal cancer prevention. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 13. p. 165-172, 2012.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**.14. p. 69-76, 1985.

JANG, J.H.; NAM, T.S.; PAIK K.S.; LEEM, J.W. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. **Neuroscience Letters**. 360. p. 129-132, 2004.

JESSE, C.R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C.W. Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis selenide in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 61. p. 623-630, 2009.

JI, R.R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science**. 252. p. 1-19, 2004.

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

KATZUNG, B.G. Basic & clinical pharmacology. 13th ed. Appleton and Lange; 2015.

KIDD, B.L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anesthesia**. 87. p. 3-11, 2001.

KIPP, A.P.; STROHM, D.; BRIGÉLIUS-FLOHÉ, R.; SHOMBURG, L.; BECHTOLD, A.; LESHICK-BONNET, E.; HESEKER, H.; LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Antiinflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 2. p. 787-795, 2002.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. Em: Wall, Textbook of pain; Fourth edition, London: Churchill Livingstone, 59 -84, 1999.

GONÇALVES, L.C.C.; VICTÓRIA, F.N.; LIMA, D.B., BORBA.; P.M.Y.; PERIN, G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. CuI/glycerol mediated stereoselective synthesis of 1,2-bis-chalcogen alkenes from terminal alkynes: synthesis of new antioxidants. **Tetrahedron Letters**. 55. p.5275-5279, 2014.

LOTSCH, J.; GEISSLINGER, G. Morphine-6-glucoronide: an analgesic of the future? **Clinical Pharmacokinetics**. 40. p. 485-499, 2001.

LUCHESE, C.; PRIGOL, M.; ACKER, C.I.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidences for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. **European Journal of Pharmacology**. 644. p. 49-54, 2010.

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. p. 31-40, 1997.

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 Research**. 598. p. 271-278, 1992.

MARCONDES, S.; MARCEL H.; SOUZA, A.; GONÇALVES, R.S.; SOUZA, D.; DORNELES, R.O.E.; NOGUEIRA, C.W. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. **European Journal of Pharmacology**. 725. p. 79-86, 2014.

MASON, R.P.; CASU, M.; BUTLER, N.; BREDA, C.; CAMPESAN, S.; CLAPP, J.; GREEN, E.W.; DHULKHED, D.; KYRIACOU, C.P.; GIORGINI, F. Glutathione peroxidase activity is neuroprotective in models of Huntington's disease. **Nature Genetics**. 45. p. 1249-1254, 2013.

MCHUGH, J.M.; MCHUGH, W.B. Pain: neuroanatomy, chemical mediators and clinical implications. **AACN Clinical Issues**. 11. p. 168-178, 2000.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **New England Journal of Medicine**. 348. p. 1243-1255, 2003.

MERSKEY, B. Classification of chronic pain. 2nd edition, **IASP press**, 1994.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. 57. p. 1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. 66. p. 355-474, 2002.

MORO, A.V.; NOGUEIRA, C.W.; BARBOSA, N.B.V.; MENEZES, P.H.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G. Highly stereoselective one-pot producers to prepare bis- and tris chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. **Journal of Organic Chemistry**. 70. p.5257-68, 2005.

MUGESH, G.; DU MONT, W.W.; SIES, H. Chemistry of biologically important Organoselenium compounds. **Chemical Reviews**. 101. p. 2125-2179, 2001.

MÜLLER, A.; GABRIEL H.; SIES, H. A novel biologically active selenoorganic compound. IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**. 34. p. 1185-1189, 1985.

MURRAY, A.R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M.R.; SHVEDOVA, A.A.; Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**. 20. p. 1769-1777, 2007.

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

NIEDZIELSKI, P.; RUDNICKA, M.; WACHELKA, M.; KOZAK, L.; RZANY, M.; WOZNIAK, M.; KASKOW, Z. Selenium species in selenium fortified dietary supplements. **Food Chemistry**. 190. p. 454-459, 2016.

NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.S.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of diphenyl diselenides. **Inflammation Research**. 52. p. 56-63, 2003.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**. 85. p. 1313-1359, 2011.

NOGUEIRA, C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**. 104. p. 6255-6285, 2004.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39. p. 490-496, 2007.

OMS. The global burden of disease: 2004 update. Em: Mathers C, Fat D, eds, 2008.

ORTUÑO, J., ROS, G.; PRIAGO, M.; MARTINEZ, C.; LOPEZ, G. Selenium bioavailability and methods of evaluation. **Food Science and Technology International**. 2. p. 135-150. 1996.

OSSIPOV, M. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**. 11. p. 3779-3787, 2010.

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

PARNHAM, M.J.; SIES, H. The early research and development of ebselen. **Biochemical Pharmacology**. 86. p. 1248-1253, 2013.

PINTO, N.C.C.; MACHADO, D.C.; SILVA, J.M.; CONEGUNDES, J.L.M.; GAMEIRO, J.; CHEDIER, L.M. *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**. 173. p. 330-337, 2015.

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

REDDI, D. An introduction to pain pathways and mechanisms. **British Journal of Hospital Medicine**. 72. p. 188-191, 2013.

ROCHA, J.T.; PINTON, S.; GAI, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl Diselenide Reduces mechanical and thermal nociceptive behavioral responses after unilateral intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in rats. **Biological Trace Element Research**. 154. p. 372-378, 2013.

ROCHA, J.B.T.; FRANCO, J.; DOS SANTOS, D.; RIGON, A.; FARINA, M.; DAFRE, A.; LEAL, R. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**. 1199. p. 138-147, 2008.

ROMAN, M. Selenium: Properties and Determination. **Encyclopedia of Food and Health**. 734-746, 2016.

ROSA, S.G.; QUINES, C.B.; DA ROCHA, J.T.; BORTOLATTO, C.F.; DUARTE, T.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. **European Journal of Pharmacology**. 758. p. 64-71, 2015.

SARI, H.M.M.; SOUSA, A.C.G.; ROSA, S.G.; SOUZA, D.; DORNELLES, O.E.R.; NOGUEIRA, C.W. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. **European Journal of Pharmacology**. 725. p. 79-86, 2014.

SAITO, I.; ASANO, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; ABE, H.; YOSHIMOTO, T. Neuroprotective effect of an antioxidant, Ebselen, in patients with delayed neurobiological deficits after aneurismal subarachnoid haemorrhage. **Neurosurgery**. 42. p. 269-77, 1998.

SARTORI, G.; NETO, J.S.S.; PESARICO, A.P.; BACK, D.F.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Bis-vinyl selenides obtained via iron (iii) catalyzed addition of phseseph to alkynes: synthesis and antinociceptive activity. **Organic & biomolecular chemistry**. 11. p. 1199-1208, 2013.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; MORO, A.V.; BORGES, V.C.; SANTOS, F.W.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Bis selenide alkene derivatives: A class of potential antioxidant and antinociceptive agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 83. p. 221-229, 2006.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; SANTOS, A.R.S.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 60. p. 1679-1686, 2008.

SAVEGNAGO, L.; PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; ALVES, D.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**. 555. p. 129-18, 2007.

SAVEGNAGO, L.; VIEIRA, I. A.; SEUS, N.; GOLDANI, B.S.; CASTRO, M.R.; LENARDÃO, E.J.; ALVES, D. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. **Tetrahedron Letters**. 54. p. 40-44, 2013.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen – an anti-inflammatory antioxidant. **General Pharmacology**. 26. p. 1153-1169, 1995.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience supplement**. 5. p. 1062-1067, 2002.

SCHWARTZ, K.; FOLTSZ, P.J. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of American Chemical Society**. 79. p. 200-212, 1957.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. 2004. Mechanisms of the inflammation response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. 18. p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**. 38. p. 347-458, 1989.

SOLOVYEV, N.D. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 153. p. 1-12, 2015.

SONG, E.; CHUANYANG, U.; JUALING, F.; XIAOMIN, X.; SIYU, Y.; CONGXUE, X.; BIN, L.; HONGJUN, C.; ZHIYIN S.; SHANMEI W.; YANG, S. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. **Life Sciences**. 109. p. 37-43, 2014.

SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**. 897. p. 9-19, 2001.

SUN, J.H.; YANG, B.; DONNELLY, D.F. MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia. **Journal of Neurophysiology**. 40. p. 1804-1809, 2006.

TAKASAGO, T.; PETERS, E.E.; GRAHAM, D.I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I.M. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with antiinflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **British Journal of Pharmacology**. 122. p. 1251-1256, 1997.

TINTINGER, G.R.; THERON, A.J.; STEEL, H.C.; COCKERAN, R.; PRETORIUS, L.; ANDERSON, R. Protein kinase C promotes restoration of calcium homeostasis to platelet activating factor-stimulated human neutrophils by inhibition of phospholipase C. **Journal of Inflammation**. 6. p.29-35, 2009.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the reduction of prostaglandins in carrageen-induced inflammation. **Anesthesiology**. 101. p. 983-990, 2004.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLALOGGIA, R. The croton-oil ear test revisited. **Agents Actions**. 17. p. 347-349, 1986.

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. p.1393-1396, 1990.

VICTORIA, F.N.; ANVERSA, R.G.; PENTEADO, F.; CASTRO, M.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. Antioxidant and antidepressant-like activities of semi-synthetic [α]-phenylseleno citronellal. **European journal of pharmacology**. 742. p. 131-138, 2014.

VIGUIER, F.; MICHOT, B.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms - Implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. **European Journal of Pharmacology**. 716. p. 8-16, 2013.

VON HEHN, C.A.; BARON, R.; WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**. 73. p. 638-652, 2012.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. Open-FieldTest—critical-review. **Psychology Bulletin**. 83. p.482-504, 1976.

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. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. 56. p. 196-203, 1999.

WANG, B.S. Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves in mice. **Food Chemistry**. 138. p. 751–756, 2013

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D; MAIER, S.F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 521. p.1-21, 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- Daspatic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesthesiology and Analgesia**. 98.p. 408-413, 2004.

WILHEM, E.A.; MACHADO, N.; PEDROSO, A.; GOLDANI, B.; SEUS, N.; MOURA, S.; SAVEGNAGO, L.; JACOB, R.G.; ALVES, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. **RSC Advances**. 4. p. 41437-41445, 2014.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**. 102. p. 915-922, 1994.

WILSON, S.R.; ZUCKER, P.A.; HUANG, R.C.; SPECTOR, A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **Journal of American Chemical Society**. 111. p. 5936-5939, 1989.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R.A. Stimulating the development of mechanism based, individualized pain therapies. **Nature Reviews**. 6. p. 703-710, 2007.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. 152. p. 2-15, 2011.

ZEILHOFER, H.U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**. 73. p. 165-174, 2007.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anaesthesiology clinics**. 45. p. 27-37, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. 16. p. 109-118, 1983.

YAKSH, T. Biology of transmission in the pain pathway. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. Meeting abstract, La Jolla, California, USA, 2010.

YAMAGUSHI, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; SAITO, I.; SHINOHARA, Y.; ASANO, T. Ebslen in acute ischemic stroke: a placebo controlled, double-blind clinical trial. **Stroke**. 29. p.7-12, 1998.