

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de Mestrado

Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno)acetofenona em camundongos

Fernanda Severo Sabedra Sousa

Pelotas, 2016

Fernanda Severo Sabedra Sousa

Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno)acetofenona em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Dr^a Lucielli Savegnago

Co-orientadora: Dr^a Ethel Antunes Wilhelm

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S725 Sousa, Fernanda Severo Sabedra

Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno) acetofenona em camundongos / Fernanda Severo Sabedra Sousa ; Lucielli Savegnago, orientadora ; Ethel Antunes Wilhelm, coorientador. – Pelotas, 2016.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Selênio. 2. Nocicepção. 3. Serotonina. 4. Noradrenalina. 5. Dopamina. I. Savegnago, Lucielli, orient. II. Wilhelm, Ethel Antunes, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Fernanda Severo Sabedra Sousa

Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno)acetofenona em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/02/2016

Banca examinadora:

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

Lucielli Savegnago.....

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

Cristiane Luchese.....

Dr. Juliano Alex Roehrs
Doutor em Ciências (Química Orgânica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Juliano Alex Roehrs.....

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Jeferson e Marilia, ao meu irmão
Felipe e ao meu querido grupo de
pesquisa em Neurobiotecnologia.***

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por sempre me guiar e iluminar;

Gostaria de agradecer aos meus pais, Jeferson e Marilia, por terem me dado educação, valores por todo o apoio, dedicação, oportunidades e amor que eles têm comigo. Por sempre estarem ao meu lado nas horas difíceis. Amo vocês

Gostaria de agradecer ao meu irmão, Felipe, por todo o companheirismo, amizade, por me divertir nas horas difíceis, por me ajudar sempre, amo-te.

Ao meu namorado, Alexandre, por sempre estar no meu lado, apoiando.

Aos meus avôs, João e Vani e a minha avó Terezinha por sempre estarem presentes em todas as horas, me apoiando, ajudando e contribuindo para o meu crescimento.

A minha orientadora Lucielli, por sempre acreditar em mim, me dar força e oportunidade, por sempre compartilhar seus ensinamentos com muito carinho. Muito obrigada por tudo, sem a tua dedicação nada disso estaria acontecendo.

A minha co-orientadora Ethel, por sempre ter disponibilidade de me ajudar, orientar e contribuir com os meus ensinamentos, muito obrigada.

Ao meu grupo de pesquisa GPN por todo o apoio, felicidade, ajuda, companheirismo, amizade, se não fosse por vocês não chegaria a essa nova etapa. Obrigada por estarem presentes na minha vida.

Ao grupo de pesquisa LASOL, principalmente a Renata e o Diego por sempre estarem dispostos a me ajudar e ensinar, muito obrigada pela perceria.

Ao biotério pela ajuda com os animais, por sempre contribuindo com os nossos projetos, muito obrigada por tudo.

Gostaria de agradecer ao professor Carl Schiesser e seu grupo de pesquisa da Universidade de Melbourne, pela oportunidade de passar quatro meses aprendendo novas técnicas laboratoriais em seu grupo de pesquisa, além de aprimorar o meu inglês. Muito obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos pelos bons momentos, pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, por todo apoio, amizade, ensinamentos.

Ao Cristian, secretário do programa de Pós-Graduação, por toda a paciência, ajuda com que resolveu os meus problemas.

FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Programa de Pós-Graduação em bioquímica e Bioprospecção e a UFPEL pela oportunidade e apoio.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

Resumo

SOUSA, Fernanda Severo Sabedra. **Avaliação da atividade antinociceptiva da α -(fenilseleno)acetofenona em camundongos.** 2016. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A dor é uma condição que afeta diariamente a população mundial e é considerada como um fenômeno multidimensional que pode ser evidenciada como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão potencial ou real dos tecidos. Os fármacos utilizados para o tratamento desta patologia são da classe dos opióides e antiinflamatórios não esteroidais, estes fármacos são eficientes, porém apresentam vários efeitos adversos. Desta forma, é importante a busca por novas moléculas que possam ser empregadas para o tratamento da dor que melhorem a qualidade de vida dos pacientes diminuindo os efeitos adversos. Neste sentido, o selênio tem sido alvo de interesse para diversos grupos de pesquisa devido às suas propriedades farmacológicas e biológicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva do composto orgânico de selênio, α -(fenilseleno)acetofenona (PSAP) em camundongos, além de elucidar o possível mecanismo envolvido na sua atividade antinociceptiva. Para a investigação da possível ação antinociceptiva da PSAP, foram desenvolvidos os ensaios de nocicepção induzida por dois agentes químicos, a formalina e o glutamato. A administração intragástrica (i.g.) do PSAP (10 - 50 mg/Kg) preveniu a nocicepção induzida pela injeção intra plantar (i.pl.) de formalina (20 μ L) na fase neurogênica além de reduzir a formação do edema de pata. Da mesma maneira que, na fase inflamatória, o PSAP (1 - 50 mg/Kg, i.g.) reduziu o tempo de lambida induzido pela formalina (i.pl.). A PSAP (0,1 - 50 mg/Kg, i.g.) diminuiu o tempo de lambida no teste de nocicepção induzida por glutamato (20 μ L, i.pl.) em camundongos. A contribuição do sistema serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico na atividade antinociceptiva da PSAP (1 mg/Kg, i.g.), foi verificada através do teste do glutamato. O pré-tratamento dos camundongos com sulpirida (antagonista dos receptores dopaminérgicos D₂ e D₃, 5mg/Kg, i.p.), prazosin (antagonista do receptor α_1 adrenérgico, 0,15 mg/Kg, i.p) e yohimbina (antagonista do receptor α_2 adrenérgico, 1,0 mg/Kg, i.p), bloquearam a atividade antinociceptiva do PSAP (1 mg/Kg, i.g.). Por outro lado, o pré-tratamento com SCH23390 (antagonista do receptor dopaminérgico D₁, 0,05 mg/Kg, i.p.), WAY100635 (antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1a}, 0,7 mg/Kg, i.p), ketanserina (antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2a/2c}, 0,3mg/Kg, i.p) e ondansetron (antagonista seletivo do receptor serotoninérgico 5-HT₃, 0,5mg/Kg, i.p.), não causaram redução na atividade antinociceptiva do PSAP (1 mg/Kg, i.g.) no teste do glutamato em camundongos. Assim, sugere-se que há envolvimento tanto do sistema dopaminérgico quanto do sistema noradrenérgico na ação antinociceptiva do PSAP. Foi observado que a PSAP, os antagonistas e a interação antagonista x PSAP não alteraram a atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto. De acordo com o presente trabalho pode-se concluir que o PSAP possui atividade antinociceptiva e, pode-se sugerir que esta atividade envolva a participação do sistema dopaminérgico e adrenérgico.

Palavras-chave: Selênio, nocicepção, serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamato, formalina.

Abstract

SOUSA, Fernanda Severo Sabedra. **Evaluation of antinociceptive activity of α -(phenylalanyl) acetophenone in mice.** 2016. Dissertation- Master Degree- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The feeling of pain is a condition that affects daily, thousands of people around the world and, still yet, it does not exist a completely efficient treatment to this condition, a treatment which does not lead to side effects. So, it is of great importance the search for new molecules that can be applied for the treatment of pain and that does not present many side effects. Thus, the chemical element selenium has been a target of interest for many research groups due its pharmacological and biological properties. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antinociceptive activity of the organoselenium compound, α -(phenylalanyl) acetophenone (PSAP) in mice and also, to elucidate the mechanism that could be possibly involved with the antinociceptive activity of the compound. Objectifying the assessment of the possible antinociceptive action of PSAP, two nociception assays were realised, the glutamate and the formalin tests, which are both chemical nociception inducers. The intragastric administration (i.g.) of PSAP (10 – 50 mg/Kg) has prevented the nociception, induced by the intraplantar (i.pl.) injection of formalin (20 μ L), in the neurogenic phase. Also, PSAP was effective in reducing paw oedema formation. As well as in the neurogenic phase, in the inflammatory phase, PSAP (1 – 50 mg/Kg, i.g.) has reduced paw licking, induced by formalin (i.pl.). Besides that, PSAP (0.1 - 50 mg/Kg, i.g.) has also diminished the licking time of the paw in the glutamate test, showing a reduction in the nociception induced by glutamate administration (20 μ L, i.pl.) in mice. The contribution of the serotonergic, dopaminergic and noradrenergic systems to the antinociceptive activity of PSAP (1 mg/Kg, i.g.) was assessed by the glutamate nociception induced test. Mice pre-treatment with sulpiride (5 mg/Kg, i.p., a D₂ and D₃ dopaminergic receptors antagonist), prazosin (0.15 mg/Kg, i.p., an α ₁ adrenoreceptor antagonist) and yohimbine (1 mg/Kg, i.p., an α ₂ adrenoreceptor antagonist), blocked the antinociceptive effect caused by PSAP. Conversely, SCH23390 (0.05 mg/Kg, i.p., a D₁ receptor antagonist), WAY100635 (0.7 mg/Kg, i.p., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (0.3 mg/Kg, i.p., a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist) and ondansetron (0.5 mg/Kg, i.p., a selective 5-HT₃ receptor antagonist) did not change the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/Kg, i.g.) in the glutamate test performed in mice. These results indicate that PSAP antinociceptive action can be related to its interaction with dopaminergic and noradrenergic systems. Also, it was assessed mice locomotor activity through the open field test. It was observed that the administrations of PSAP, antagonists and the interaction between PSAP and antagonist did not modify the number of crossings of the animal in the open field apparatus. This present study has demonstrated that PSAP has antinociceptive action and it can be assumed that this action is related to its involvement with the dopaminergic and adrenergic systems.

Keywords: Selenium, nociceptive, anti-inflammatory, serotonin, dopamine, adrenergic, glutamate, formalin.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Estrutura química da α -(fenilselenil)acetofenona (PSAP)	20
Figura 2	Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, suas características e funções	25
Figura 3	Esquematização dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos	25
Figura 4	Diagrama esquemático demonstrando à diversa gama de mediadores químicos e suas diferentes classes	28
Figura 5	Estrutura química do disseleneto de difenila <i>m</i> -triflourometil [(<i>m</i> -CF ₃ -PhSe) ₂]	34
Figura 6	Estrutura química do composto disseleneto de difenila	35
Figura 7	Estrutura química do <i>p</i> -cloro-seleno-esteroides (PCS)	35
Figura 8	Estrutura química do ebselen	36
Figura 9	Estrutura química do 2-hidroxido -5-selenocianato ácido benzóico	36
Figura 10	Estrutura química do seleneto 2-butil (2-feniletinil)	37
Figura 11	Estrutura química da α -(fenilselenil)acetofenona (PSAP)	38

Manuscrito

Figura 1	Chemical structure of α -(phenylselanyl) acetophenone (PSAP)	62
Figura 2	Experimental protocol of nociception induced by formalin test in mice	63
Figura 3	Experimental protocol of nociception induced by glutamate test in mice and possible reversal of the same by the administration of PSAP	64
Figura 4	Effect of PSAP on licking and biting behavior induced by formalin in mice. (A) Neurogenic, first (0 - 5 min) phase and (B) inflammatory, second (15 - 30 min) phase of the formalin test. (C) Effect of PSAP on the paw oedema	65
Figura 5	Effect of PSAP on licking and biting behavior induced by glutamate in mice.	66
Figura 6	Effect of pretreatment of mice with (A) SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) and (B) sulpiride (5 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting	67
Figura 7	Effect of pretreatment of mice with (A) prazosin (0.15 mg/kg, i.p.) or (B) yohimbine (1 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting	68
Figura 8	Effect of pretreatment of mice with (A) WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.), (B) ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.) or (C) ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting.	69

Lista de Tabelas

Manuscrito

Tabela 1	Effect of administration of PSAP (0.01 - 50 mg/kg, i.g.) administered in mice 30 min before the open field test in mice.	70
Tabela 2	Effect of administration of PSAP and antagonists on behavior parameter in the open field test in mice.	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL	Micro litros
μg	Microgramas
AINE	Antiinflamatórios não-esteroidal
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GAP	Junção comunicante
GMPc	Guanosina monofosfatase cíclica
i.p.	Intra peritoneal
i.pl.	Intraplantar
i.g.	Intra gástrico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
MLX	Meloxicam
nNOS	Sintase de óxido nítrico neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PG	Prostaglandina

PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina reduzida
PKC	Proteína quinase C
RVM	Medula rostroventromedial
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TBARS	Espécies Reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Receptor vanilóide transiente tipo 1
TRPM8	Receptor do potencial transitório da melatonina 8
δ -ALA D	Delta-aminolevunilato desidratase

Lista de símbolos

$<$	Menor
$>$	Maior
$\leq$	Menor ou igual
μ	Micro
α	Alfa
$\pm$	Mais ou menos

Sumário

1.	Introdução	18
2.	Objetivos	21
	Objetivo Geral	21
	Objetivos específicos	21
3.	Revisão de literatura	22
	Dor e nocicepção	22
	Classificação da dor	22
	Transmissão da dor	23
	Processamento central da dor	26
	Mediadores químicos	27
	Selênio	31
	Compostos orgânicos de selênio	32
	Dor x Depressão	37
4.	Manuscrito	39
5.	Conclusão	72
6.	Perspectivas	73
	Referências	74
	Anexos	88

1. Introdução

A dor é um fenômeno multidimensional que pode ser evidenciada como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão potencial ou real dos tecidos (Scholz e Woolf, 2010). Na experiência sensorial existem receptores específicos, que permitem a detecção e dimensão de um estímulo doloroso. A nocicepção é o componente sensorial da dor, ou seja, os nociceptores são os receptores característicos dos neurônios sensoriais, os quais estão envolvidos com a percepção da dor. É através da ativação destes nociceptores que a dor é percebida (Ossipov, 2010). A dor serve como alerta para despertar a atenção de que há algo errado com o corpo, ela é o principal sintoma clínico que leva à busca por serviços de saúde (Brennan et al., 2007).

Existem dois tipos de classificação para dor, a dor aguda e a dor crônica. A dor aguda pode ser provocada por uma doença, uma disfunção, ou ainda pode ocorrer por um dano de natureza mecânica, térmica ou química. A dor aguda está envolvida com a ativação do sistema nervoso simpático e seus nociceptores (Woolf e Mannion, 1999). Em contraste, o estado de dor crônica pode ser caracterizado como um estado de doença (Grichnick et al., 1991). A dor crônica é um processo biológico de ocorrência natural em resposta a danos nos tecidos, chamado de resposta inflamatória (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 do dano. A relação entre nocicepção e 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).

Os fármacos opióides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) são as principais formas de tratamentos para analgesia existentes no mercado. Porém, fármacos de ambas as classes apresentam efeitos adversos (Woodcock et al., 2007; Katzung, 2015), sendo estes os fatores que impulsionam a constante busca por um tratamento, para as condições de dor e inflamação, que não apresentem estes efeitos e que seja eficaz (Song et al., 2014). Tendo em vista essa constante necessidade pela busca de novos fármacos antiinflamatórios e analgésicos o interesse por compostos orgânicos de selênio tem aumentado gradativamente, visto

que tais compostos apresentam aspectos farmacológicos promissores (Nogueira et al., 2004; Song et al., 2014).

O selênio é um micronutriente que tem sido amplamente estudado devido as suas diversas propriedades biológicas e farmacológicas. Ele é conhecido pela sua atividade antioxidante, aspectos terapêuticos, quimiopreventivos, antiinflamatórios e propriedades antivirais (Rayman, 2000; Chagas et al., 2014).

Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa e colaboradores, demonstraram inúmeras atividades desempenhadas por compostos orgânicos de selênio, tais como, atividades antioxidante (Savegnago et al., 2013; Fonseca et al., 2015; Martinez et al., 2015), neuroprotetivas (Abdel-Hafez, 2008; Jesse et al., 2008; Souza et al., 2013), anti-hiperalgesia (Donato et al., 2015), antimicrobiana (Victoria et al., 2012), antifúngica (Castro et al., 2014), antidepressiva (Savegnago et al., 2008; Jesse et al., 2008; Gerzson et al., 2012; Donato et al., 2013; Victoria et al., 2013, 2014; Martinez et al., 2014; Brod et al., 2016), antinociceptiva (Savegnago et al., 2007; Luchese et al., 2010; Chagas et al., 2014; Sari et al., 2014; Rosa et al., 2015; Donato et al., 2015) e anti-inflamatória (Chagas et al., 2014).

Dentre as atividades farmacológicas exercidas por compostos orgânicos de selênio, a atividade antinociceptiva têm se destacado, uma vez que compostos de selênio de diversas classes químicas exercem esse ação. Entre eles, destacam-se o *p-cloro-seleno-esteroide* (Sari et al., 2014), ácido 2-hidroxi-5-selenocianato benzóico (Chagas et al., 2014), disseleneto de difenila (Savegnago et al., 2007; Rocha et al., 2013; Rosa et al., 2015), Ebselen (Mugesh et al., 2001), *m*-trifluormetil-difenil disseleneto (Brüning et al., 2014), 3- alquinil selenofeno (Wilhelm et al., 2009), butilfenilseleno acetileno (Luchese et al. 2010), disseleneto de bis-4-metilbenzoíla (Donato et al., 2015) e selenetos bis-vinílicos (Sartori et al., 2013).

Estudos têm demonstrado uma forte relação entre a dor e a depressão (Simon et al., 1999; Corruble e Guelfi, 2000; Lin et al., 2014). A dor pode ser um fator de desencadeamento da depressão (Asmundson e Katz, 2009; Hilderink et al., 2012). No entanto, evidências sugerem que a dor e a depressão podem operar dentro de áreas similares do cérebro que regulam tanto o humor e componentes afetivos quanto a dor (Giesecke et al., 2005). Um estudo realizado por Gerzson et al., (2012) demonstrou-se os efeitos antioxidantes e tipo-antidepressivos do composto orgânico de selênio α -(fenilselenil)acetofenona (PSAP). Com isso, é interessante avaliar a

atividade antinociceptiva deste composto, pois vários estudos têm mostrado uma forte ligação entre estas duas patologias (depressão e dor).

Sendo assim, o presente estudo avaliou a atividade antinociceptiva do composto orgânico de selênio PSAP (Figura 1), através de ensaios de indução de nocicepção pelo teste da formalina e glutamato em camundongos. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do composto.

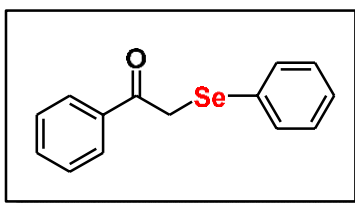


Figura 1. Estrutura química da α -(fenilselenil)acetofenona (PSAP).

2. Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar a possível ação antinociceptiva do PSAP e investigar os mecanismos envolvidos na sua ação em camundongos.

Objetivos Específicos

- Verificar a possível ação antinociceptiva do PSAP, no teste de nocicepção induzido por formalina;
- Avaliar a atividade do PSAP em reduzir o edema de pata formado pela injeção de formalina;
- Identificar a ação do PSAP no teste de nocicepção induzido por glutamato em camundongos;
- Estudar o possível envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico na ação antinociceptiva do PSAP através do ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos;
- Determinar se o PSAP apresenta alterações na atividade locomotora no teste do campo aberto;
- Analisar se os antagonistas e a interação antagonista x PSAP causa alterações na atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto.

3. Revisão de literatura

Dor e Nocicepção

A palavra dor é derivada da palavra em latim *dolore*, que significa desgosto, aflição, tristeza e sofrimento tanto físico quanto moral. 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 a 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.

A percepção de estímulos nocivos pelo sistema nervoso central (SNC) é feita pela dor, mais especificamente, por nociceptores, que são os próprios sistemas neurais, ou seja, o sistema nociceptivo. A dor parece ser influenciada tanto por fatores sensoriais quanto psicológicos, e a nocicepção refere-se apenas a parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. A nocicepção está relacionada com os sinais dolorosos reconhecidos pelo SNC e é mediada pelas terminações nervosas axônais livres, nas quais seus canais iônicos são sensíveis a inúmeros estímulos térmicos, químicos e mecânicos que formulam informações relacionadas à lesão (Tjølsen e Hole, 1997). Por meio da detecção dos receptores dos neurônios sensoriais periféricos, a nocicepção é capaz de detectar estímulos capazes de afetar a integridade física do organismo. Por outro lado, a percepção é de cunho psicológico, motivacional e emocional, porque cada pessoa reage de modo diferente a estímulos de dor (Apkarian et al., 2009).

Classificações da dor

A dor pode ser classificada de diversas maneiras. De acordo com a sua duração, a dor pode ser classificada em: dor aguda, transitória e crônica. Na dor aguda, ocorre ativação de nociceptores, sendo caracterizada como uma resposta a um estímulo nocivo que levou a um dano tecidual. Ela ocorre de maneira rápida e pode desaparecer antes mesmo do tecido se recuperar da lesão. A dor aguda é de caráter protetor e pode permanecer por até um mês.

Em comparação com a dor aguda, à dor transitória 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. Por outro lado, a dor crônica é uma dor persistente observada tanto em uma lesão tecidual prolongada como também em doenças crônicas. Esta dor 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).

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

Transmissão da dor

Os estímulos nocivos podem ser de natureza química (induzido por substâncias químicas tais como formalina e glutamato) ou física (impactos mecânicos ou estimulação térmica). Quando recebemos um estímulo doloroso ocorre 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 Wolf, 2010).

Os nociceptores das fibras A δ e C, localizadas nos diferentes tecidos periféricos, são ativados ao receberem um estímulo nocivo, o qual é reconhecido por moléculas nos nociceptores (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. Seguido da lesão tecidual e inflamação, ocorrerá à 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 a estímulos de diferentes naturezas. As fibras A α e A β não são caracterizadas como fibras nociceptivas, visto que estas respondem somente a estímulos que não geram, em situações normais, danos ao corpo. Os 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 se pode 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.

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, também estão envolvidas com a transmissão da nocicepção gerada pelos mesmos estímulos (Basbaum, 2000) (Figura 2).

Fibras A α e A β	Fibras A δ (I e II)	Fibras C
		
➤ Muito mielinizadas	➤ Pouco mielinizadas	➤ Não mielinizadas
➤ 10 μ m de diâmetro	➤ 2-6 μ m de diâmetro	➤ 0,4 - 1,2 μ m de diâmetro
➤ Não estão envolvidas com a nocicepção, somente percepção de estímulos não nocivos	➤ Estão envolvidas com a nocicepção mecânica, térmica e química.	➤ Estão envolvidas com a nocicepção mecânica, térmica e química.
➤ Velocidade de condução: 30 - 100 m/s	➤ Velocidade de condução: 1,2 – 30 m/s	➤ Velocidade de condução: 0,5 – 2 m/s

Figura 2. Representação esquemática dos diferentes tipos de neurônios sensoriais primários.
Adaptada de Julius e Basbaum (2001).

Os estímulos térmicos, mecânicos e/ou químico levam a sensibilização de nociceptores, que liberam diversos mediadores químicos, os quais facilitam a transmissão da informação ao SNC (Figura 3). Os mediadores são liberados por células não neuronais como plaquetas e células sanguínea ou por neurônios simpáticos e sensoriais. Estes mediadores também podem ser liberados a partir de células inflamatórias, quando é considerado estado crônico (Besson, 1999).

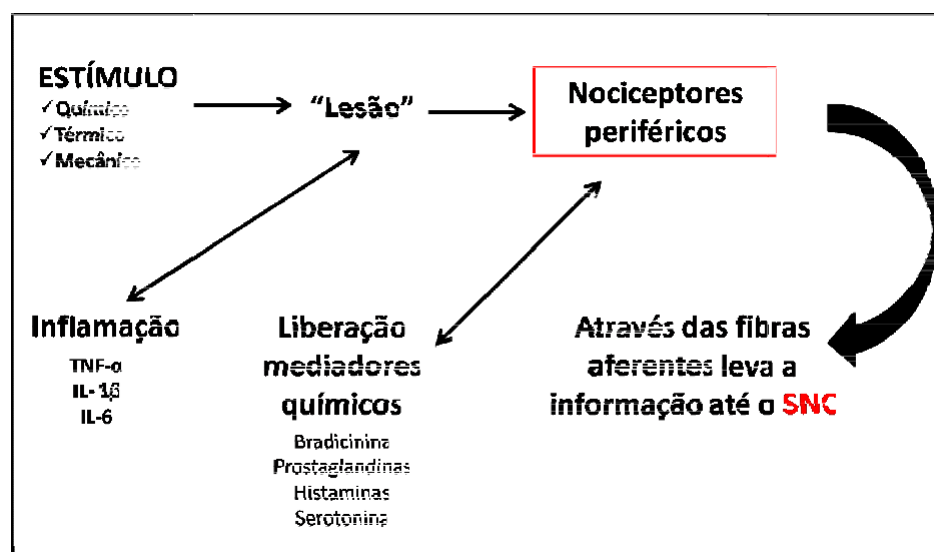


Figura 3: Esquematização dos fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos

Processamento central da dor

O estímulo nociceptivo gera informações que são levadas através das fibras aferentes até o SNC, para que possa ser gerada uma resposta adequada à dor. Como já 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 informações carregadas por fibras. 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 instante em que ocorre a integração dos impulsos elétricos no corno dorsal, as vias nociceptivas levam à ocorrência de diferentes projeções para as áreas corticais e supra-corticais (Almeida et al., 2004). Essas projeções são caracterizadas 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. As vias monossinápticas são de projeção direta para as estruturas cerebrais superiores, enquanto as vias polissinápticas possuem a característica de retransmissão de informação a neurônios de segunda ordem, que por sua vez, conduzirão a informação às estruturas superiores do cérebro (Almeida et al., 2004).

Muitas dessas vias realizam conexões com neurônios de terceira ordem, os quais estão presentes no tálamo. A projeção dos axônios desses neurônios do córtex somato sensorial até o giro pós-central está envolvida com a localização do estímulo sensorial nociceptivo. Já 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 a nível espinhal e que essa influência depende de mudanças geradas na medula, mais especificamente na medula rostroventromedial (RVM),

incluindo o núcleo magno da raphe (Millan, 1999, 2002; Venegas e Schaible, 2004). 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 a 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).

Mediadores químicos da dor

A ação indireta ou direta de mediadores químicos é de extrema importância na transmissão da informação nociceptiva tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (Scholz e Wolf, 2010). 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 (Mc Hugh, 2000) (Figura 4).

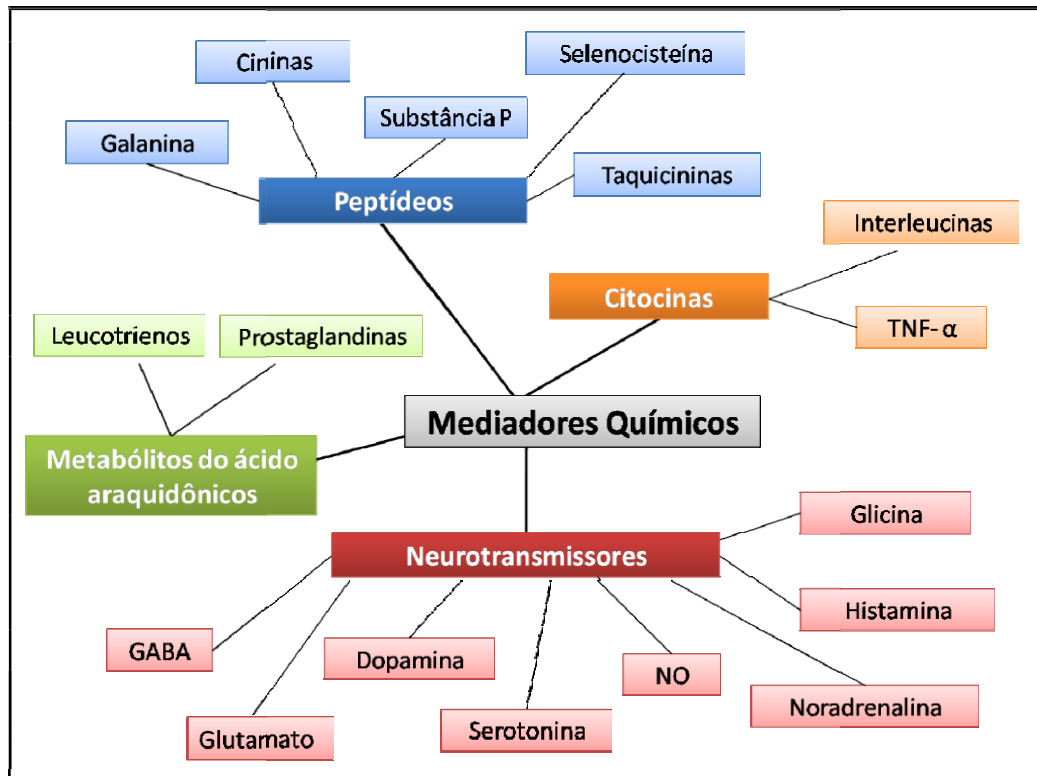


Figura 4. Diagrama esquemático demonstrando à diversa gama de mediadores químicos e suas diferentes classes. NO= óxido nítrico; TNF-α= Fator de necrose tumoral alfa; GABA= Ácido gama-amino-butírico (Adaptado de Anversa et al., 2015, TCC).

O glutamato e seus receptores são considerados o sistema de neurotransmissores excitatórios mais importantes do SNC. As ações desencadeadas pelo glutamato são mediadas através da ativação de receptores localizados nas membranas neuronais pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células glia. 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 (Neugebauer, 2002; Wiech et al., 2004).

O neurotransmissor inibitório GABA e glicina 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).

O neurotransmissor monoaminérgico serotonina é conhecido por modular os mecanismos de sinalização da dor. Juntamente com a bradicinina, histamina e prostaglandina, a serotonina faz parte da “sopa inflamatória”, a qual contribui com a dor gerada por injúria ou inflamação. A serotonina é liberada pelas plaquetas e interage com vários receptores presentes em diversos tecidos. Resultados descritos por Aira et al., (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).

Outro neurotransmissor monoaminérgico envolvido na sinalização da dor é a dopamina. Os receptores de dopamina do tipo D₁ e D₂ são utilizados para mediar a função inibidora da dopamina em modelos animais de dor persistente (Hagelberg et al., 2003). Estudos relatam que a administração de agonistas dopaminérgicos dos receptores do tipo D₂, aumenta o efeito antinociceptivo da morfina, enquanto que o bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂, dentro do núcleo acumens reduzem estes efeitos (Tricklebank et al., 1984; Zarrindast et al., 1999). O sistema dopaminérgico parece estar relacionado com o controle da nocicepção, em alguns modelos de dor (Zarrindast et al., 1999; Hagelberg et al., 2003). Acredita-se que, quando um estímulo nocivo ocorre um aumento na atividade de vias descendentes dopaminérgicas aumentando a dopamina na fenda sináptica (Millan, 2002). Esta divergência entre os estudos pode ser devida a condições experimentais variarem e procedimentos, os modelos animais utilizados, bem como as áreas do cérebro investigadas (Altier e Stewart, 1999).

Em paralelo com o sistema serotoninérgico e dopaminérgico, o envolvimento do sistema noradrenérgico também está envolvido na fisiopatologia da nocicepção. Na medula espinhal, a noradrenalina é liberada a partir de vias descendentes e suprime a dor pela sua ação inibitória sobre os receptores α_2 -adrenérgicos nos terminais centrais dos nociceptores aferentes primários (inibição pré-sináptica) ou por ativação dos interneurônios inibitórios α_1 -adrenérgicos. O sistema

noradrenérgico modulador da dor interage com outros sistemas de neurotransmissores no nível da medula espinhal, incluindo os sistemas opióide, GABA, serotoninérgico e adenosinérgico (Pertovaara, 2006).

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. Ao serem ativadas, essas células iniciam 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) (De Jongh et al., 2003; Cui et al., 2012). Como resposta do organismo a essa liberação de citocinas inflamatórias, ocorre à liberação de citocinas antiinflamatórias, as quais são as interleucinas 4 (IL-4), 10 (IL-10) e 13 (IL-13). Essas interleucinas antiinflamatórias são responsáveis por modular a resposta imune no combate a 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 óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Dal Secco et al., 2003).

As prostaglandinas por sua vez, são mediadores de origem lipídica, as quais são produzidas pela ciclo-oxigenase a partir do ácido araquidônico. O mecanismo de ação dos AINE (antiinflamatórios não esteroidais) visa à 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, prostaglandina G₂ (PGG₂) e a prostaglandina H₂ (PGH₂) que ocorre quando a COX possui uma função de peroxidase, a qual reduz a PGG₂ a PGH₂. Esses dois precursores são posteriormente convertidos e prostaglandinas biologicamente ativas e em tromboxano, por meio da ação das enzimas isomerases. As prostaglandinas

biologicamente ativas (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGI_2) desempenham um importante papel na inflamação e dor, através da participação de processos de ocorrência de hiperalgesia e alodinia, atuando tanto a nível periférico quanto na medula espinhal (Zeilhofer, 2007).

O NO age como um mensageiro biológico através do aumento na produção de guanosina monofosfatase cíclica (GMPc) e está envolvido com 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 óxido nítrico sintase induzível (NOS): a endotelial (eNOS), a neural (nNOS) e a induzível (iNOS) (Sousa e Prado, 2001).

O 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 o 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 do NO em mediar o efeito analgésico de opióides e substâncias de caráter analgésico. Por outro lado, o NO também age na sensibilização dos neurônios da medula espinhal, possibilitando o sentimento de dor (Cury et al., 2011).

Selênio

O Selênio é um calcogênio o qual faz parte do grupo 16 da tabela periódica e que pode ser encontrado em quatro formas de oxidação: seleneto (Se^{-2}), Selênio elementar (Se^0), selenito (Se^{+4}) e selenato (Se^{+6}). Diversos estudos trazem a importância do selênio para com o nosso organismo e como este elemento químico deveria ser introduzido na dieta da população (Nogueira et al., 2004; Rocha et al., 2008). Sendo assim, o selênio pode ser caracterizado como sendo um micronutriente essencial para a saúde humana (Schwartz e Foltz, 1957). Porém, uma ingestão exagerada de selênio pode vir a causar toxicidade.

Grande parte da influência benéfica do selênio sobre a saúde humana é atribuída à sua presença dentro de pelo menos 25 proteínas (Kryukov et al., 2003). Ao contrário de outros elementos metálicos que interagem com as proteínas como co-fatores, o selênio está incorporado na cadeia polipeptídica como parte do aminoácido selenocisteína (Kryukov et al., 2003). Muito de seus papéis fisiológicos

está atribuída a presença de selênio dentro das selenoproteínas. Por exemplo, um dos processos celulares mais fundamentais, a síntese de DNA, depende da presença de selênio no sítio catalítico de tioredoxina redutase (TrxR) (Arner e Holmgren, 2000).

A deficiência de selênio tem sido associada a várias condições, tais como aumento do risco de infecção, infertilidade masculina, diminuição da função imune e da tireóide, e várias condições neurológicas, incluindo a doença de Alzheimer e de Parkinson (Fairweather-Tait et al., 2010). O aumento no consumo de selênio diminui o estado depressivo e outros sintomas negativos do humor como ansiedade, confusão e hostilidade (Benton e Cook, 1991).

Tendo em vista os benefícios que podem ser obtidos através da suplementação alimentar com selênio, esse elemento já foi reconhecido como sendo indispensável para a dieta e é recomendada por associações nutricionais uma ingestão diária de cerca de 55 µg deste calcogênio diariamente. Deve-se observar que não é recomendado ingerir mais que 400 µg de selênio diariamente, pois este elemento é tóxico e pode levar o indivíduo a ter selenoses (Dumont et al., 2006). Os seguintes alimentos ricos em selênio são recomendados: castanha-do-pará, salmão, carne vermelha, peixes, brócolis, oleaginosas e cereais.

Com o decorrer do tempo, o selênio passou a ser empregado em estruturas químicas, formando assim os compostos orgânicos de selênio, que por sua vez, tornaram-se alvos atrativos para farmacoterapia sintética (Moro et al., 2005) e devido as suas promissoras atividades biológicas (Nogueira et al., 2004).

Compostos orgânicos de selênio

Os compostos orgânicos de selênio ao longo dos anos vêm sendo alvo de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas e de suas propriedades farmacológicas e por apresentar menor toxicidade em relação às espécies inorgânicas (Nogueira et al., 2004; Fairweather-Tait et al., 2010; Alehagen e Aaseth, 2015, Solovyev, 2015). Vários estudos têm relatado as propriedades farmacológicas do selênio, tais como atividade antidepressiva, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antinociceptiva e anti-inflamatória (Victoria et al., 2012; Martinez et al., 2015; Donato et al., 2015; Brod et al., 2016). Dentre estes estudos, vale ressaltar a ação antinociceptiva (Savegnago et al., 2006; Brüning

et al., 2010; Brüning et al., 2014; Rosa et al., 2015) e a ação anti-inflamatória (Nogueira et al., 2003; Jesse et al., 2009; Chagas et al., 2014).

É de grande interesse a busca por compostos que tenham um bom efeito para a dor/nocicepção os quais diminuam os efeitos adversos aos pacientes. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa e colaboradores tem grande interesse em estudar compostos orgânicos de selênio para o tratamento da nocicepção. Dentre elas, podemos destacar o composto *m*-trifluormetil-difenil disseleneto $[(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2]$ (Figura 5), que em um estudo feito por Brüning et al (2014), mostrou atividade antinociceptiva em camundongos. Foi possível observar neste estudo que $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ (1- 50 mg/Kg, i.g.), assim como a morfina (substância padrão nos testes de nocicepção), reduziram o tempo de latência induzido por glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$). Além disso, foi possível observar que os receptores HT_{1A} e $5\text{-HT}_{2A/2C}$ estão envolvidos na atividade antinociceptiva do composto.

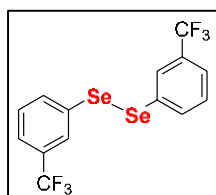


Figura 5. Estrutura química do disseleneto de difenila *m*-trifluorometil $[(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2]$.

Outro composto orgânico de selênio com atividade antinociceptiva é o disseleneto de difenila (Figura 6). Este composto é amplamente estudado por apresentar atividade mimética a glutathione peroxidase (Meotti et al., 2004). Estudos recentes demonstram que o disseleneto de difenila quando administrado por via subcutânea ou pela via oral apresenta ação antinociceptiva e anti-inflamatória tanto em camundongos quanto em ratos (Zasso et al., 2005; Rocha et al., 2013). O possível mecanismo envolvido na ação antinociceptiva do disseleneto de difenila parece envolver a via glutamatérgica, adenosinérgica, canais de potássio, via do óxido-nítrico/l-arginina e serotoninérgica (Savegnago et al., 2007). Além disso, o disseleneto de difenila tem se apresentado como um bom agente antioxidante na redução da peroxidação lipídica (Posser et al., 2006).

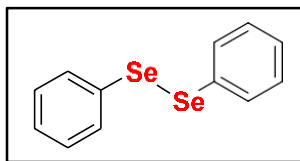


Figura 6. Estrutura química do disseleneto de difenila.

Derivados oxigenados de colesterol representam um grupo de biomoléculas que tem recebido mais atenção devido as suas bioatividades, tais como uma possível regulação da homeostase do colesterol (Gill et al., 2008), citotoxicidade (Vejux et al., 2008), e até mesmo atividades antitumorais e anti-leucêmicas para induzir apoptose (Ayala-Torres et al., 1999). A combinação destes derivados oxigenados do colesterol e o selênio não são comuns e a síntese destes compostos tem um grande potencial para a criação de um novo conjunto de moléculas com aplicações biológicas. A partir deste contexto, o artigo publicado por Sari et al., (2014) traz o composto *p*-cloro-seleno-esteróide (PCS) (Figura 7), como um promissor composto com atividade antinociceptiva. Neste estudo, foi possível verificar que o tratamento com PCS (10 mg/Kg, i.g.) reduziu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,6%, intraperitoneal) em camundongos. Além disso, o composto também teve a capacidade de diminuir o tempo de lambida na fase neurogênica e inflamatória, causada pela formalina (2,5%) intraplantar (i.pl.). O PCS (10 mg/Kg, i.g.) reduziu o edema formado pela formalina. No teste de indução a nocicepção por glutamato, o PCS (10 mg/Kg, i.g.) reduziu o tempo de lambida. Além disso, foi possível observar que a atividade antinociceptiva deste composto é através dos sistemas serotoninérgico e adenosinérgico (Sari et al., 2014).

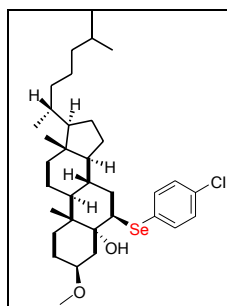


Figura 7. Estrutura química do *p*-cloro-seleno-esteróide (PCS).

O Ebselen (Figura 8) é um composto multifuncional, que é capaz de catalisar diversas reações essenciais, visando à proteção de componentes celulares aos danos gerados por estresse oxidativo e radical livre (Antony e Bayse, 2011). 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; 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 H₁ sintase, da NOS, da proteína quinase C (PKC), entre outras (Schewe, 1995; Takasago et al., 1997).

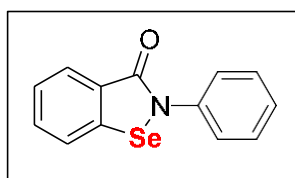


Figura 8. Estrutura química do Ebselen.

Entre os medicamentos analgésicos existentes disponíveis para o alívio da dor, os derivados de salicilatos, uma classe de fármacos antiinflamatórios não-esteróideais (AINEs), é um dos mais amplamente utilizados. O composto 2-hidroxido-5-selenocianato ácido benzóico (Figura 9) é um composto orgânico de selênio derivado do ácido salicílico. No estudo feito por Chagas et al., (2014), avaliou a atividade antinociceptiva do composto ácido 2-hidroxi-5-selenocianato benzóico administrado por via intra-gástrica em camundongos. Este estudo demonstra que o ácido 2-hidroxi-5-selenocianato benzóico (50 mg/Kg, i.g.) diminui o tempo de lambida induzido pela formalina nas duas fases (neurogênica e inflamatória). Paralelamente, este composto também reduziu o edema de pata induzido pela formalina. O mesmo foi observado no teste do glutamato, no qual houve uma redução no tempo de lambida quando o 2-hidroxi-5-selenocianato benzóico (50 mg/Kg, i.g.) foi administrado 30 min antes do teste.

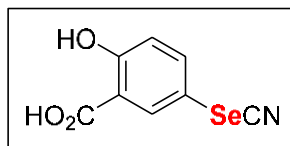


Figura 9. Estrutura química do 2-hidroxido -5-selenocianato ácido benzóico.

Um estudo feito por Luchese et al., (2010) avalia a atividade antinociceptiva do composto butilselênio fenilacetileno (Figura 10) no teste de nocicepção induzido por formalina em camundongos. Este artigo relata que o composto butilselênio fenilacetileno na dose de 10 mg/Kg (i.g.), causa uma inibição no tempo de lambida na fase neurogênica. Além disso, o butilselênio fenilacetileno (25 mg/Kg, i.g.) inibiu o tempo de lambida na fase inflamatória e reduziu o edema formado pela injeção de formalina. O efeito antinociceptivo deste composto parece estar envolvido com os sistemas serotoninérgico e adenosinérgico.

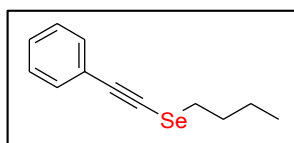


Figura 10. Estrutura química do butilselênio fenilacetileno.

Os compostos da classe arilselenil-acetofenonas são compostos orgânicos de selênio que possuem atividades biológicas interessantes. Estudos têm demonstrado que α -(fenilselênio) acetofenona (PSAP) (Fig. 11) exibe atividade mimética a enzima glutathione peroxidase (Nikolic, 2007), além de ter a capacidade de inibir tumor induzido pela regulação promotora da comunicação intercelular entre as células epiteliais do fígado, através da junção GAP (junção comunicante) (Hu et al., 1995). Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, demonstra que o PSAP administrado em altas doses (400 mg/Kg, por via intra-gástrica [i.g.]) não alterou os níveis de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), a atividade das enzimas delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) e catalase em camundongos. Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstra que o tratamento agudo com PSAP (1, 5, 10, 50, 200 mg/Kg, i.g.) e crônico (1, 10, 50, 200 mg/Kg, i.g.) não causou genotoxicidade no ensaio com leucócitos de camundongos. O composto apresentou efeito citotóxico no ensaio *in vitro* com células de ovários de Hamster chinês apenas a na concentração de 500 mM após 24h de administração e em 250 e 500 mM após 48 e 72h de administração (Casaril et al., 2015). Neste estudo

também foi avaliado os testes bioquímicos toxicológicos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina, confirmando que este composto não apresenta toxicidade em camundongos (Casaril et al., 2015).

Segundo Gerzson et al. (2012), o PSAP possui a capacidade de reduzir o tempo de imobilidade nos testes que induzem um estado tipo depressivo em camundongos. Além disso, também foi demonstrado que o PSAP reduziu a peroxidação lipídica e possui atividade de capturar radicais livres sintéticos em testes antioxidantes *in vitro*. Sendo assim, os resultados deste artigo sugerem que o PSAP possui propriedades tipo antidepressiva e antioxidante. Este composto pode ser um agente terapêutico promissor tanto para o tratamento de desordens depressivas como para o tratamento da dor. Somando-se a isso, é de interesse investigar outra classe de compostos orgânicos de selênio que obtenham uma menor dose nos testes de nocicepção e que não apresentem toxicidade tanto em testes *in vitro* quanto em testes *ex vivo*.

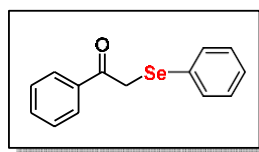


Figura 11. Estrutura química da α -(fenilseleno)acetofenona (PSAP).

Dor x Depressão

Um complexo de comunicação entre o sistema imunológico e o SNC, foi reportado, tendo a neuroinflamação como um mediador comum de comorbidade dor-depressão (Walker et al., 2014). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV), (APA, 2010), a dor não é um sintoma de diagnóstico em transtorno de depressão maior. As queixas de dor estão incluídas apenas como características associadas à depressão. Evidências têm sugerido que a dor e a depressão podem operar dentro de áreas similares do cérebro que regulam tanto os componentes afetivos do humor, quanto os sintomas de dor (Giesecke et al., 2005). Algumas das afirmativas de que a dor esta relacionada com a depressão pode ser explicada biologicamente, em que a dor e depressão parecem compartilhar caminhos e neurotransmissores comuns (Bair et al., 2003). A natureza da relação entre depressão e dor ainda é não esta bem esclarecida. Algumas pesquisas indicam que existe uma relação causal entre os dois (Fishbain et al., 1997). Outros sugerem que a depressão e dor são

indistinguíveis e que a dor crônica é realmente uma forma de depressão (Blumer e Heilbronn, 1982).

A dor crônica e depressão ocorrem com alta prevalência na população em geral (Arnow et al., 2006), sugerindo um mecanismo subjacente comum que pode ser responsável por tal agrupamento. Uma pesquisa indicou a inflamação como denominador comum de dor e depressão, que poderia ativar algumas vias que podem desencadear a transição de dor aguda induzida por inflamação à depressão e dor crônica, levando a um "comportamento doentio" (Walker et al., 2014). De fato, o aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, tem sido observado em pacientes deprimidos e o aumento dos níveis de IL-1 β e IL-6 foram encontrados no fluido cerebrospinal de pacientes com dor crônica (Alexander et al., 2005; Sluzewski et al., 1996).

Três teorias têm sido postuladas para explicar a relação entre dor e depressão (Bair et al, 2003; Lepine e Briley, 2004). A primeira teoria sugere que a dor é causada por depressão (Leino e Magni, 1993; Pine et al., 1996; Larson et al., 2004). A segunda teoria propõe que a depressão é causada pela dor (Nicassio e Wallston, 1992; Dohrenwend et al., 1999; Patten, 2001). A terceira teoria sugere que a depressão e dor podem interagir bidirecionalmente (Hotopf et al., 1998; Gureje, 2007).

Baseado no que foi exposto, a PSAP, como descrito anteriormente (Gerzson et al., 2012), possui propriedades tipo antidepressivas. Sendo assim, a PSAP pode ser um avanço promissor para o tratamento de desordens depressivas e de dor, já que ambas estão interligadas.

4 Manuscrito

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra assim organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo.

O manuscrito se encontra nas normas da revista *European Journal of Pharmacology*.

Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of α - (phenylalanyl) acetophenone

Fernanda Severo Sabedra Sousa ^a, Roberta Gonçalves Anversa^a, Paloma Taborda Birmann^a, Maurice Neto de Souza ^a, Renata Balaguez^b, Diego Alves ^b, Ethel Antunes Wilhelm^{a*}, Lucielli Savegnago^{a*}

^a Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, GPN, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

This study evaluated the antinociceptive action of α -(phenylalanyl) acetophenone (PSAP) in mice. In addition, it was assessed whether serotonergic, adrenergic and dopaminergic systems are involved in PSAP antinociceptive activity. PSAP was administered by intragastric route (i.g.) 30 min prior to formalin or glutamate test and compared with standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.). The treatment with PSAP (10 - 50 mg/kg, i.g.) caused inhibition in neurogenic phase and reduced the paw oedema formation caused by intraplantar (i.pl.) injection of formalin. PSAP (1 - 50 mg/kg, i.g.) decrease the nociceptive response in the inflammatory phase in the formalin test. The licking and biting behavior triggered by glutamate was reduced by PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.). The antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) was abolished when the animals were pretreated with prazosin (receptor antagonist α_1 adrenergic, 0.15 mg/kg, intraperitoneally [i.p.]), yohimbine (receptor antagonist, α_2 adrenergic, 1 mg/kg, i.p.) and sulpiride (antagonist of dopamine D₂ and D₃, 5 mg/kg, i.p.). By contrast, the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) was not abolished by WAY100635 (selective antagonist of serotonergic 5HT_{1a}, 0.7 mg/kg, i.p.), ketanserin (selective antagonist of serotonergic 5HT_{2A/2c}, 0.3 mg/kg, i.p.), ondansetron (selective antagonist of serotonergic 5HT₃, 0.5 mg/kg, i.p.) and SCH23390 (D₁ dopamine receptor antagonist, 0.05 mg/kg, i.p.) in the glutamate test. No change in the locomotor activity was observed in the animals treated with PSAP and/or antagonists in the open field test. Therefore, these results showed the antinociceptive activity of the PSAP in formalin and glutamate tests and the involvement of dopaminergic and adrenergic systems in the antinociceptive action of this compound.

Keywords: selenium, organoselenium, mice, glutamate, formalin, nociception.

1. Introduction

The feeling of pain is a condition that affects daily, thousands of people around the world. The pain is defined second International Association for the Study of Pain (IASP) as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” (IASP 1994). Pain typically involves a noxious stimulus or event that activates nociceptors in the body’s tissues that convey signals to the central nervous system where they are processed and generate multiple responses (Ossipov, 2010; Scholz e Woolf, 2010). There is no completely efficient treatment to this condition, which does not leads to side effects.

Our research group and collaborators have much attention to organoselenium compounds. These compounds have become promising drugs since many pharmacological effects were presented (Martinez et al., 2015; Brod et al., 2015). Among these actions it is highlighted the nociceptive and anti-inflammatory effect (Savegnago et al., 2007; Luchese et al., 2010; Brüning et al., 2014; Donato et al., 2015). However, these compounds have been described as effective in relatively high doses, which becomes a problem depending on toxicity. Moreover, it is important to note that this compound often do not have a simple synthesis and in good yield and are used solvents that pollute the environment. Therefore, the search for organic compounds of selenium that is associated with a good yield and using chemical clean for their synthesis has been highlighted.

Among the organoselenium compounds, arylselenylacetophenones are a class that has a number of interesting biological activities. Studies have shown that α -(phenylalanyl) acetophenone (PSAP) exhibits glutathione peroxidase-like activity (Cotgreave et al., 1992; Nikolic, 2006) and have the capacity to inhibit tumor promoter-induced down regulation of intercellular communication between liver epithelial cells, via gap junction (Hu et al., 1995). Previous study by our research group, demonstrated that oral administration of high doses PSAP (400 mg/kg, i.g.) *ex vivo* did not alter the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) and catalase activities, this indicates that the PSAP at high doses does not cause acute toxicity in mice. In this regard, in the same study was investigated the antioxidant activity of PSAP and this compound was presented good results in the free radicals scavenging activity and protected against lipid peroxidation (Gerzson et al., 2012). According Casaril et al., 2015, PSAP has no toxicity in toxicological tests such as aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), sticks are not genotoxic in the comet assay.

Therefore, the aim of this study was to assess the antinociceptive activity of PSAP in formalin and glutamate tests and the contribution of noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems in the antinociceptive effect this compound.

2. Materials and methods

Animals

The experiments were conducted using male adult Swiss mice (25 - 35g) from our own breeding colony. The animals were kept in a separate animal room, on a 12 h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m., at room temperature (22 ± 1 °C) with free access to water and food. All experimental procedures were conducted in accordance to the guidelines of the Committee of Ethics in Research of the Federal University of Pelotas, Brazil (3301-2015). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

Drugs

The compound α -(Phenylselanyl) acetophenone (PSAP, Fig. 1) was prepared and characterized at the Laboratory of Clean Organic Synthesis (LASOL) according to the method described by Victoria et al. (2009). An analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. PSAP was dissolved in canola oil. WAY100635, ketanserin, ondansetron, sulpiride, SCH23390, yohimbine and prazosin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were dissolved in saline solution (0.9%). The formalin solution (0.92% of formaldehyde) was dissolved in saline solution (0.9%) and the sodium L- glutamate 1- hydrate (20 μmol) was dissolved in distilled water. All the other chemicals were obtained of the highest available commercial grade.

[Insert Figure 1 here]

Chemical models of nociception

Nociception and paw oedema induced by formalin

The formalin test was carried out as described by Hunskaar and Hole (1987). Animals received 20 μl of 2.5% formalin solution (0.92% of formaldehyde), injected intraplantarly (i.pl.) in the ventral right hind paw. Animals were treated with PSAP by intragastric route (0.1

- 50 mg/kg, i.g.), vehicle (canola oil, 10 ml/kg, i.g.) or standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.) (Aguirre-Bañuelos and Granados- Soto, 2000; Fleischmann et al., 2002), 30 min before the formalin administration. The dose of meloxicam was chosen according to the lowest dose of compound with effect in all the tests made.

PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.) was administered 30 min before the animal was subjected to the tests, given the literary data showing that organoselenium compounds have a time of action beginning approximately 30 minutes (Gerzson et al., 2012). After formalin injection, the animals were observed from 0 to 5 min (first phase, neurogenic phase) and 15 - 30 min (second phase, inflammatory phase) and the time spent licking and biting the injected paw was recorded with a chronometer and considered as indicative of nociception (Fig. 2).

Group (1) received canola oil (10 ml/kg, i.g.);

Groups (2, 3, 4, 5) received PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.), 30 min before the test respectively;

Group (6) received meloxicam (10 mg/kg, i.g.) 30 min before the formalin.

In order to asses if PSAP inhibit oedema associated with inflammatory pain, paw oedema was measured by comparing the difference between the weight of the formalin-treated paw and the weight of the contra lateral paw treated with saline solution. For this purpose, animals were euthanized 30 min after formalin injection and both paws were cut at the ankle joint and immediately weighed on an analytical balance (Santos and Calixto, 1997).

[Insert Figure 2 here]

Nociception induced by glutamate

The glutamate-induced nociception test investigates if PSAP has antinociceptive effect (Fig. 3). The procedure used was similar to that of described previously (Beirith et al., 2002). Mice were treated with the PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.) or vehicle (canola oil, 10 ml/kg, i.g.) 30 min before injection of sodium L- glutamate 1- hydrate (20 μ mol, 20 μ l/paw, i.pl.) on the ventral right hind paw. Mice were observed individually for 15 min following glutamate injection and the amount of time spent licking and biting the injected paw was recorded and was considered as a nociceptive behavior. Meloxicam (10 mg/kg, i.g.), given 30 min before the test, was used with standard drug in this model.

Group (1) received canola oil (10 ml/kg, i.g.);

Groups (2, 3, 4, 5) received PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.), 30 min before the test respectively;

Group (6) received meloxicam (10 mg/kg, i.g.) 30 min before the glutamate.

[Insert Figure 3 here]

Analysis of possible mechanism of action of PSAP

In the order to address of the mechanism involved in the PSAP antinociceptive action, distinct groups of animals were pretreated with different classes of drugs. So that, the glutamate test was used to all tested mechanisms, because its rapid onset, short duration and the involvement of peripheral and spinal and sites of action (Beirith et al., 2002).

The antagonists were dissolved in saline solution (0.9%) (vehicle) and administered by an intraperitoneal (i.p.) route in a single dose. Fifteen minutes after the antagonists was administered PSAP (1 mg/kg, i.g.) or vehicle. It was chosen for this test the lowest dose of PSAP (1 mg/kg, i.g.), which has antinociceptive activity in both the formalin and glutamate tests. Thirty minutes later, mice performed the open field test (see Section 2.5), to assess if the interaction between drug and PSAP could cause any alterations in the locomotor. All the antagonists were used at subeffetive doses as previously reported (Santos et al., 2005; Lopes et al., 2009)

Involvement of dopaminergic system

To evaluate the possible contribution of the dopaminergic system in the antinociceptive action of PSAP, animals were pretreated with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p., a selective antagonist at dopamine D₁ receptor), sulpiride (5 mg/kg, i.p., an antagonist at dopamine D₂ and D₃ receptors), or vehicle (saline solution).

Involvement of noradrenergic system

To investigate the role played by the alfa-adrenergic system in the antinociceptive effect caused by PSAP on the glutamate test, mice were pretreated with prazosin (0.15 mg/kg, i.p., α_1 -adrenoreceptor antagonist) or yohimbine (1 mg/kg, i.p., α_2 -adrenoreceptor antagonist) or vehicle (saline solution).

Involvement of serotonergic system

In an effort to assess the participation of the serotonergic system in the antinociceptive action of PSAP was investigated using WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (0.3mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} receptors) and ondansentron (0.5mg/kg, i.p., a selective antagonista5-HT₃ receptor) or respective vehicle (saline solution).

Open field test

Spontaneous locomotor (number of segments crossed with the four paws) behaviours were assessed using the open-field test. The open-field was made of plywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open-field was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3), 45 cm in length and 45 cm in width. Animals were evaluated 30 min after vehicle or PSAP (0.01 - 50 mg/kg, i.g.) or 45 min after the antagonists, WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.), ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.), SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.), sulpiride (5 mg/kg, i.p.), prazosin (0.15 mg/kg, i.p.) and yohimbine (1 mg/kg, i.p.) administration. Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 6 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) (Walsh and Cummins, 1976).

Statistical analysis

All experiments results are given as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). The results obtained the behaviour nociceptive tests were statistically analyzed by one-way ANOVA and, when appropriate subjected to the consecutive application of post hoc Newman–Keul’s test. The information related to the involvement of different systems in the antinociceptive action caused by PSAP (antagonists x PSAP) were evaluated by two-way ANOVA and, if proper, followed by the post hoc Newman–Keuls test. A value of $P < 0.05$ was considered significant. All the results were assessed using “GraphPad Software” (GraphPad Software, San Diego, CA) and are reported as median effective dose accompanied by their respective 95% confidence limits

3. Results

Effect of PSAP on animal model of nociception

3.1.1. Nociception and paw oedema induced by formalin

The effect of PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.) on the time spent licking and biting the formalin-injected paw during the neurogenic (0 - 5 min) and inflammatory (15 - 30 min) phases are depicted in Fig. 4A and 4B, respectively. On the first phase (neurogenic) (Fig. 4A) PSAP at doses of 10 and 50 mg/kg produced a significant inhibition of the licking and biting 51.4% and 86% respectively, behaviour in the formalin test, the same was observed to meloxicam at dose of 10 mg/kg (inhibit 31.77%).

On the second phase PSAP at doses of 1, 10, 50 mg/kg inhibit the licking and biting time, 98 - 100% respectively (inflammatory phase) ($P < 0.001$) in the formalin test (Fig. 4B).

This decrease in licking and biting time was also observed for meloxicam (inhibit 52%) (standard drug, 10 mg/kg).

In the Fig 4C, PSAP at doses of 10 and 50 mg/kg, effectively inhibited the mice paw oedema formation by i.pl. injection of formalin. However, meloxicam (10 mg/kg, i.g.) was not effective in inhibition to paw oedema.

[Insert Figure 4 here]

3.1.2 Nociception induced by glutamate

Results presented in Fig. 5 show that PSAP (0.01 - 50 mg/kg, i.g.) and meloxicam (10 mg/kg, i.g.) produced a significant reduction of the licking behaviour induced by glutamate i.pl. injected. According to this result, there was in a significant inhibition of glutamate-induced nociception from the dose of PSAP (0.1 mg/kg, i.g.) inhibitory effect of 23.33% up to a dose of PSAP (50 mg/kg, i.g.) inhibitory effect of 100%. This reduction in paw licking and biting time was also observed in standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.) inhibitory effect of 50%.

[Insert Figure 5 here]

Analyses of possible antinociceptive mechanism of PSAP action

Involvement of dopaminergic system

Results illustrated in Fig. 6A show that the pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p., a selective antagonist at dopamine D₁ receptor) was not effective in blocking the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) in glutamate test. The two-way ANOVA revealed a significant main effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,28} = 257.39$, $P < 0.0001$], but did not reveal effect in SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) [$F_{1,28} = 1.93$, $P = 0.1753$] and SCH23390 x PSAP interaction [$F_{1,28} = 0.28$, $P = 0.6026$].

Pretreatment of mice with sulpiride (5 mg/kg, i.p., an antagonist at dopamine D₂ and D₃ receptors) reduced the antinociceptive effect caused by PSAP administration in the glutamate test (Fig. 6B). The two-way ANOVA of data demonstrated significant main effects caused by systemic treatment of animals with PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,30} = 93.53$, $P < 0.0001$], PSAP x sulpiride interaction [$F_{1,30} = 16.93$, $P = 0.0003$] but not sulpiride (5 mg/kg, i.p.) [$F_{1,30} = 0.34$, $P = 0.5615$].

[Insert Figure 6 here]

Involvement of noradrenergic system

Fig. 7A show that pretreatment of mice with prazosin (0.15 mg/kg, i.p., an α_1 -selective antagonist), given 15 min beforehand, blocked the antinociception caused by PSAP (1 mg/kg, i.g.) in glutamate induced-licking and biting in mice. The two-way ANOVA of data demonstrated significant main effects caused by systemic treatment of animals with PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,24} = 25.20$, $P < 0.0001$] and a PSAP x prazosin interaction [$F_{1,24} = 4.96$, $P = 0.0355$], but not prazosin pretreatment [$F_{1,24} = 5.05$, $P = 0.0340$] in the glutamate induced-licking and biting in mice.

The results in Fig. 7B show that the pretreatment of mice with yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -selective antagonist) also blocked effect caused by PSAP (1 mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Two-way ANOVA revealed significant main effects of PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,22} = 59.35$, $P < 0.0001$], PSAP x yohimbine (1 mg/kg, i.p.) interaction [$F_{1,22} = 15.62$, $P = 0.0007$], but not yohimbine alone (1 mg/kg, i.p.) [$F_{1,22} = 7.05$, $P = 0.0145$].

[Insert Figure 7 here]

Involvement of serotonergic system

The results depicted in Fig. 8 shows pretreatment with WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} receptors) and ondansetron (0.5 mg/kg, i.p., a selective antagonist at 5-HT₃ receptor) did not reverse the antinociceptive effect caused by PSAP (1 mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,28} = 41.41$, $P < 0.0001$], but not of WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.) [$F_{1,28} = 0.17$, $P = 0.680$] or of PSAP x WAY100635 interaction [$F_{1,28} = 0.09$, $P = 0.762$]. Likewise, the two-way ANOVA of data showed a significant main effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,29} = 94.31$; $P < 0.0001$], but did not show of ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.) [$F_{1,29} = 0.49$, $P = 0.488$] and PSAP x ketanserin interaction [$F_{1,29} = 1.17$, $P = 0.288$] (Fig. 8B).

The two-way ANOVA revealed a significant main effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) [$F_{1,31} = 55.16$, $P < 0.0001$] but did not present of ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.) [$F_{1,31} = 0.19$, $P = 0.668$] and PSAP x ondansetron interaction [$F_{1,31} = 0.03$, $P = 0.869$] (Fig. 8C).

[Insert Figure 8 here]

3.3. Open Field

Treatment of mice with PSAP (0.01 - 50 mg/kg, i.g.) administered 30 min before the open field test did not cause any significant change in the number of crossings when compared to control (Table 1). In the table 2, the statistic one-way ANOVA revealed no significant effect for antagonists and antagonists x PSAP interaction, to number of crossings in the open field test.

[Insert Table 1 here]

[Insert Table 2 here]

4. Discussion

In this study we extended our results on antinociceptive action of PSAP and provided behavioural evidence for the involvement of dopaminergic, noradrenergic and serotonergic system in this action. The administration of PSAP reduced the nociceptive response induced by glutamate and formalin injection (i.pl.) and antagonists (dopaminergic and noradrenergic) blocked the effect of PSAP.

Pain is a debilitating condition which affects thousands of people every day, and even with the wide range of analgesic drugs available on the market, there is still not drug that provides a completely effective treatment without causing the onset of adverse effects (Mendell and Sahenk, 2003). It is therefore of great importance to search for new drugs, safe and effective, which may be used to treat pain and inflammation.

In this study, at the lowest dose tested, PSAP (0.1 mg/kg, i.g.) already had a significant antinociceptive effect in glutamate test. PSAP when compared then other organoselenium compounds compared presented effect at low doses, such as, *p*-methoxyl-diphenyl diselenide (10 mg/kg, i.g.) (Jesse et al., 2009), 2-hydroxyl-5-selenocyanatobenzoic acid (50 mg/kg, i.g.) (Chagas et al., 2014), 3-alkynyl selenophene (5 - 50 mg/kg, i.g.) (Wilhelm et al., 2009), *p*-chloro-selenosteroid (10 mg/kg, i.g.) (Sari et al., 2014), bis selenide (5 - 50 mg/kg, i.g.) (Jesse et al., 2009) and *bis*(4-methylbenzoyl) diselenide (ED₅₀ of 28.7 mg/kg, i.g.) (Donato et al., 2015). Regarding these data, the PSP (0.1 mg / kg, e.g.) has the more low effective dose, compared to other organoselenium compounds in nociception test induced by glutamate in mice.

Glutamate is the major excitatory amino acid neurotransmitter present in the central nervous system, where it participates in a great diversity of biological functions, such as learning and memory, neurodegenerative diseases and neuronal death. Apart from these

actions, glutamate is found in sensory C fibres where it is believed to play a relevant role in transmission of nociceptive mechanisms at the spinal cord (Hudspith, 1997). According Beirith et al., (2002), nociception induced by glutamate causes releases of NO inflammatory mediators and neuropeptides involved in the transmission of pain.

Based on what was discussed, the results of this study demonstrated that PSAP (0.1 - 50 mg/kg, i.g.) reduce the licking and biting time in nociception test induced by glutamate. Thus, as noted, the compound PSAP has a possible interaction with the glutamatergic system. An important observation is that PSAP at any dose did not alter the locomotion activity in the open field test. The effects of PSAP were evaluated in the open field test, a classical animal model used to evaluate the autonomic effects of drugs and the general activity of the animals (Walsh and Cummins, 1976). Therefore the compound and the antagonists did not induce non-specific locomotor disturbances, discarding possible false-positive responses in the behavioural tests.

Another test performed in this study was the induction of nociception induced by formalin. According Gonçalves et al. (2008) formalin-induced pain model evaluates two distinct phases: the first phase which produces an intense stimulation of nociceptor, thus, mediates this phase of acute pain (Le Bars et al., 2001). In the second phase, there is the release of pro-inflammatory mediators such as histamine, prostaglandins and leukotrienes, and this can be seen by a local oedema and hyperalgesia (Capuano et al., 2009; Santos et al., 2005). The results also indicate that PSAP at low doses, elicited a reduction of the formalin induced nociceptive behaviour in both phases neurogenic and inflammatory, as well as prevented the paw oedema.

PSAP (10 - 50 mg/kg, i.g.) reduced the licking and biting time neurogenic phase in nociception induced by formalin. The same was observed with standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.). This can be related to the fact that the meloxicam is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and the mechanism of action was inhibiting the biosynthesis of prostaglandins. Thus, just as in the inflammatory phase is the presence of inflammatory mediators; meloxicam has higher activity in the second phase of the formalin test (Shibata et al., 1989). Regarding the inflammatory phase, PSAP was effective in reducing the licking and biting time at the doses of 1 - 50 mg/kg, when compared with the control, acting similarly to meloxicam. PSAP (10 - 50 mg/kg, i.g.) are also able to reduce paw oedema formalin-induced, but this effect is not observed in standard drug. Meloxicam has not activity in reducing oedema formation induced by formalin, in this study; maybe this has occurred due to the low dose of meloxicam used (Aguirre-Bañuelos and Granados-Soto, 2000).

Previous studies from our research group showed that the PSAP has antidepressant-like effect. This study evaluated the effect of PSAP on mice in a tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). Gerzson et al., (2012) showed the PSAP (5 - 10 mg/kg, i.g.) had the ability to reduce the immobility time in these tests, meaning that this compound has antidepressant-like activity. To assess the *in vitro* antioxidant properties, PSAP was evaluated in four test systems: 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2-Azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and inhibition of lipid peroxidation. PSAP (100 - 500 μ M) showed potent antioxidant activity and protected against lipid peroxidation (Gerzson et al., 2012).

Another study realized for our research group investigated the *in vitro* toxicity of PSAP in Chinese Hamster ovary cells (through MTT assay) and analysed its genotoxicity using the comet assay in mice leukocytes after acute or chronic treatments, alongside with biochemical analyses. The results demonstrate that the oral administration of PSAP in acute (1, 5, 10, 50, 200 mg/kg) and chronic (1, 10, 50, 200 mg/kg) doses did not cause genotoxicity. The compound presented cytotoxic effect in the MTT assay just at 500 μ M after 24h of administration and at 250 and 500 μ M after 48 and 72h of administration. According to biochemical analysis, PSAP presented a minor toxic effect by altering δ -ALA-D activity in liver and catalase activity in kidney at the highest tested concentration. Taking together, these data indicate that PSAP has low toxic effects after chronic administration in mice. Moreover, it was performed aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) test in liver, kidney and brain of mice given chronic treatment. The plasmatic levels of AST and ALT were not altered by the oral administration of PSAP at 1, 10, 50 or 200 mg/kg (Casaril et al., 2015).

It was also investigated the possible involvement of the descending inhibitory pathways, serotonergic, noradrenergic and dopaminergic, in the antinociceptive effect of PSAP. Studies have reported that the spinal serotonergic system may suppress incoming noxious input to the spinal cord and inhibit pain transmission, highlighting its role in the modulation of pain and nociception (Millan, 2002). Accordingly, it is well postulated that the activation of spinal serotonergic subtype receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ produces antinociception (Bardin et al., 2000). None of the serotonergic antagonists tested was effective to abolish the antinociceptive action of PSAP, suggesting that PSAP action is not related to an interaction with serotonergic system.

In parallel with the serotonergic system, involvement of the noradrenergic system is also suggested in the pathophysiology of nociception. In the spinal cord, norepinephrine

released from descending pathways suppresses pain by its inhibitory action on α_2 -adrenoceptors on the central terminals of primary afferent nociceptors (presynaptic inhibition), by direct α_2 -adrenergic action on pain-relay neurons (postsynaptic inhibition), and by α_1 -adrenoceptor-mediated activation of inhibitory interneurons. The noradrenergic pain modulatory system interacts with other neurotransmitter systems at the level of spinal cord, including opioid, GABA, serotonin and adenosine (Pertovaara, 2006). This study has been possible to observe that the adrenergic antagonists with prazosin (α_1 -adrenoreceptor antagonist) and yohimbine (α_2 -adrenoreceptor antagonist) blocked the analgesic effect of the PSAP. These results suggest the involvement of adrenergic α_1 and α_2 receptors in the PSAP action to reduce the nociception induced by glutamate.

The dopaminergic system seems to be related to nociception control in some models of pain (Zarrindast et al., 1999; Hagelberg et al., 2003). It is believed that when a harmful stimulation occurs, suggesting augmentation in the activity of descending dopaminergic pathways there having an increase in dopamine “turnover” in specific nervous system regions (Millan, 2002). Even though some studies confirm the involvement of this system in the antinociception, contradictory data have been reported. Whereas the stimulation of D₁-like (D₁/D₅) receptors (an excitatory G-protein coupled receptor), an increasing in the neuronal activity and the activation of D₂-like (D₂/D₃/D₄) receptors (an inhibitory G-protein coupled receptor), results in the opposite, leads to an inhibition of neuronal activity. Both events directly influence the transmission of stimulus (Sheng et al., 2009). Additionally, some studies also indicate that both kinds of receptors are simultaneously implicated in modulation of nociceptive effects under different conditions of pain (Altier and Stewart, 1998; Lopez-Avila et al., 2004). This divergence among the studies may be due to varied experimental conditions and procedures, animal models used, as well as the brain areas investigated (Altier and Stewart, 1999). Pretreatment with SCH23390 (a selective antagonist at dopamine D₁ receptor) do not abolish the PSAP antinociceptive action and sulpiride (an antagonist at dopamine D₂ and D₃ receptors) reversed the PSAP antinociceptive effect, suggesting the involvement of the dopaminergic receptors D₂ and D₃ in this action.

In conclusion, the results of this study show that the PSAP has antinociceptive effect on nociception induction tests (the formalin and glutamate tests). The PSAP have ability in reduced the paw oedema formed by formalin. Also this compound does not cause changes in locomotor activity of animals. It was demonstrated the noradrenergic and dopaminergic system contribution in antinociceptive action to PSAP. Further studies will allow

understanding the exact mechanisms involved in the PSAP action and support its beneficial role in treatment of pain.

Acknowledgments

The project was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES), CNPq, FAPERGS and UFPEL.

References

- Aguirre-Bañuelos, P., Granados-Soto, V., 2000. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 395, 9-13.
- Altier, N., Stewart, J., 1998. Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 285, 208-215.
- Altier, N., Stewart, J., 1999. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci.* 65, 2269-2287.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschaliere, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive 5-HT in rats. *Pain.* 86, 11-18.
- Beirith, A., Santos, A.R., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924, 219-228.
- Brod, L.M.P., Fronza, M.G., Wilhelm, E.A., Luchese, C., Vargas, J. P., Lüdtke, S., Savegnago, L. 2016. 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.
- Brüning, C.A., Gai, B.M., Soares, S.M., Martini, F., Nogueira, C.W., 2014. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. *Pharmacol. Biochem. Be.* 125, 15-20.
- Capuano, A., De Corato, A., Treglia, M., Tringali, G., Dello Russo, C., Navarra, P., 2009. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 605, 57-62.
- Casaril, A.M., Martinez, D.M., Ricordi, V.G., Alves, D., Lenardão, E.J., Schultze, E., Collares, T., Seixas, F.K., Savegnago, L. 2015. Evaluation of the toxicity of α -(phenylselenanyl) acetophenone in mice. *Regulat.Tox. Pharmacol.* 73, 868 – 874.
- 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., 2014. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. *Pharm. Biochem. Be.* 118, 87-95.

Cotgreave, I.A., Moldéus, P., Brattsand, R., Hallberg, A., Andersson, C.M., Engman, L., 1992. α -(Phenylselenenyl) acetophenone derivatives with glutathione peroxidase-like activity: a comparison with ebselen. *Biochem. Pharmacol.* 43, 793-802.

Donato, F., Pavin, N. F., Goes, A.T.R., Souza, L.C., Soares, L. C., Rodrigues, O.E.D., Jesse, C. R., Savegnago, L., 2015. Antinociceptive and anti-hyperalgesic effects of bis(4-methylbenzoyl) diselenide in mice: Evidence for the mechanism of action. *Pharm. Biol.* 53, 395-403.

Fleischmann, R., Iqbal, I., Slobodin, G., 2002. Meloxicam. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 3, 1501-1512.

Gerzson, M., Victoria, F., Radatz, C., Gomes, M., Boeira, S., Jacob, R., Alves, D., Jesse, C., Savegnago L., 2012. In vitro antioxidant activity and in vivo antidepressant-like effect of α -(phenylselenenyl) acetophenone in mice. *Pharm. Biochem. Be.* 102, 21-29.

Gonçalves, J.C., de Oliveira F. S., Benedito, R.B., de Sousa, D.P., de Almeida, R.N., de Araujo, D.A., 2008. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1017-1020.

Hagelberg, N., Forssell, H., Aalto, S., Rinne, J.O., Scheinin, H., Taiminen, T., Nagren, K., Eskola, O., Jaaskelainen, S.K., 2003. Altered dopamine D₂ receptor binding in atypical facial pain. *Pain.* 106, 43-48.

Hu, J., Engman, L., Cotgreave, I.A., 1995. Redox-active chalcogen-containing glutathione peroxidase mimetics and antioxidants inhibit tumour promoter-induced down regulation of gap junctional intercellular communication between WB-F344 liver epithelial cells. *Carcinogenesis.* 16, 1815-1824.

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

Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30, 103-114.

IASP. IASP task force on taxonomy., 1994. In: HMaNBogduk, editor. *Classification of chronic pain.* Seattle: IASP Press. 2, 209-214.

Jesse, C.R., Savegnago, L., Nogueira, C.W., 2009. Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis selenide in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 623 - 630.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597-652.

Lopes, L.S., Pereira, S.S., Silva, L.L., Figueiredo, K.A., Moura, B.A. Almeida, F.R.C., Sousa, F.C.F., 2009. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. *Life Sci.* 84, 105-110.

Lopez-Avila, A., Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J.M., Del Angel, R., Pellicer, F., 2004. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain.* 111, 136-143.

Luchese, C., Prigol, M., Acker, C.I., Nogueira, C.W., 2010. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidence for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 644, 49-54.

Martinez, D. M., Barcellos, A., Casaril, A. M., Perin, G., Schiesser, C.H., Callaghan, K. L., Lenardão, E. J., Savegnago, L., 2015. Twice acting antioxidants: synthesis and antioxidant properties of selenium and sulfur-containing zingerone derivatives. *Tetrahedron Letters.* 56, 2243-2246.

Mendell, J.R., Sahenk, Z., 2003. Painful sensory neuropathy. *New Engl. J. Med.* 348, 1243-1255.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Progress. Neurobiol.* 66, 355-474.

Nikolic, K.M., 2006. QSAR study of aromatic organochalcogens with glutathione peroxidase like antioxidant activity. *QSAR Comb. Sci.* 26, 358-367.

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

Pertovaara, A., 2006. Noradrenergic pain modulation. *Prog. Neurobiol.* 80, 53-83.

Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides.* 37, 381-389.

Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, H.M., Souza, M.M., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B., 2005. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology.* 48, 1021-1034.

Sari H. M. M., Souza, A. C. G., Suzan, R.G., Souza, D., Rodrigues O.E.D., Nogueira, C.W., 2014. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *Eur. J. Pharmacol.* 725, 79-86.

Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Antinociceptive properties of diphenyldiselenide: evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 555, 129-138.

Scholz, J., Woolf, C.J., 2010. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience supplement.* 5, 1062-1067.

Sheng, H.Y., Qu, C.L., Huo, F.Q., Du, J.Q., Tang, J.S., 2009. D-2-like but not D-1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: a GABAergic modulation mechanism. *Exp. Neurol.* 215, 128-134.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38, 347-458.

Victoria, F.N., Radatz, C.S., Sachini, M., Jacob, R.G., Perin, G., Silva, W.P., Lenardão, E.J., 2009. KF/Al₂O₃ and PEG-400 as a recyclable medium for the selective α -selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents. *Tetrahedron Lett.* 50, 6761-6763.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. Open-Field Test critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482-504.

Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Bortolatto, C.F., Nogueira, C.W., Savegnago L., 2009. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. *Pharmacol. Biochem. Be.* 93, 419- 425.

Zarrindast, M.R., Nassiri-Rad, S., Pazouki, M., 1999. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. *Gen. Pharmacol.* 32, 517-522.

Legends

Figure 1. Chemical structure of α -(phenylselanyl) acetophenone (PSAP).

Figure 2. Experimental protocol of nociception induced by formalin test in mice and possible reversal of the same by the administration of PSAP. Neurogenic phase (0 - 5 min) comprises nociception process, while the inflammatory phase (15 - 30 min) comprises the process of activation of inflammatory cascades in response to a noxious stimulus. *Abbreviations:* i.g. = intragastric; i.pl. = intraplantar; PSAP = α -(phenylselanyl) acetophenone).

Figure 3. Experimental protocol of nociception induced by glutamate test in mice and possible reversal of the same by the administration of PSAP. *Abbreviations:* i.g. = intragastric; i.pl. = intraplantar; PSAP = α -(phenylselanyl) acetophenone).

Figure 4. Effect of PSAP on licking and biting behavior induced by formalin in mice. (A) Neurogenic, first (0 - 5 min) phase and (B) inflammatory, second (15 - 30 min) phase of the formalin test. (C) Effect of PSAP on the paw oedema. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. *Abbreviations:* (C) Control indicates animals treated with canola oil and (M) indicates animals treated with the standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.; 60 min of treatment). Asterisks denote significance levels when compared to the control group (one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test). (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$.

Figure 5. Effect of PSAP on licking and biting behavior induced by glutamate in mice. Mice were treated with PSAP at doses 0.01 - 50 mg/kg (i.g.) 30 min before the glutamate test. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. *Abbreviations:* (C) Control indicates animals treated with canola oil and (M) indicates animals treated with the standard drug, meloxicam (10 mg/kg, i.g.; 60 min of treatment). Asterisks denote significance levels when compared to the control group (one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test). (*) $P < 0.05$ and (***) $P < 0.001$.

Figure 6. Effect of pretreatment of mice with (A) SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.) and (B) sulpiride (5 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting. Each column represents to mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls' test. (***) $P < 0.001$ as compared with the vehicle treated (control). (#) $P < 0.05$ compared to PSAP pretreated with vehicle.

Figure 7. Effect of pretreatment of mice with (A) prazosin (0.15 mg/kg, i.p.) or (B) yohimbine (1 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting. Each column represents to mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls' test. (***) $P < 0.001$ as compared with the vehicle treated (control). (#) $P < 0.05$ compared to PSAP pretreated with vehicle.

Figure 8. Effect of pretreatment of mice with (A) WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.), (B) ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.) or (C) ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.) in the antinociceptive effect of PSAP (1 mg/kg, i.g.) against the glutamate-induced paw licking and biting. Each column represents to mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls' test. (***) $P < 0.001$ as compared with the vehicle treated (control).

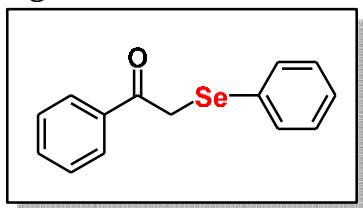
Figure 1

Figure 2

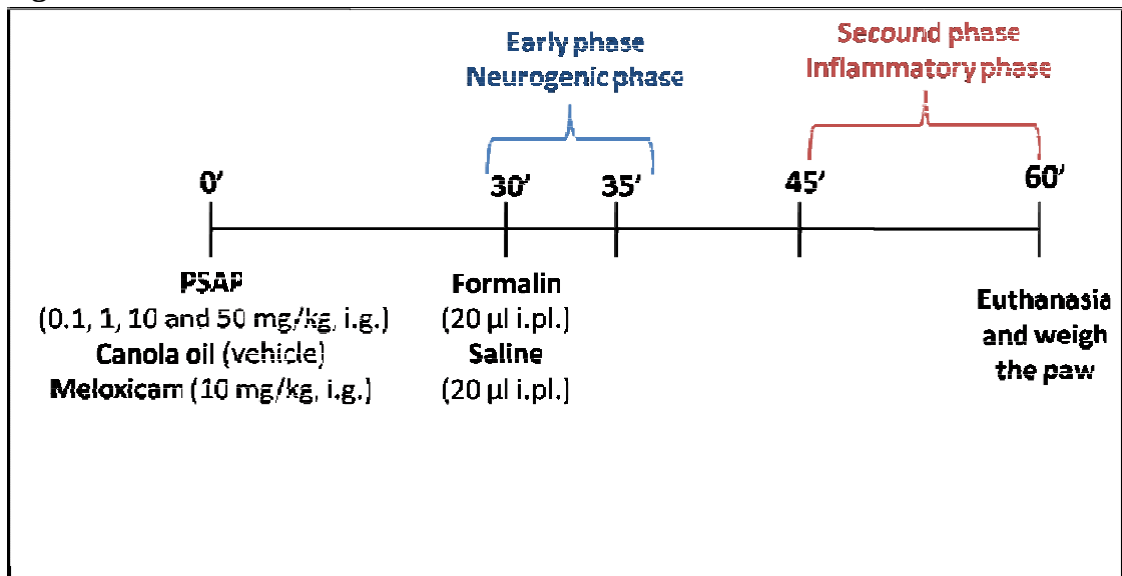


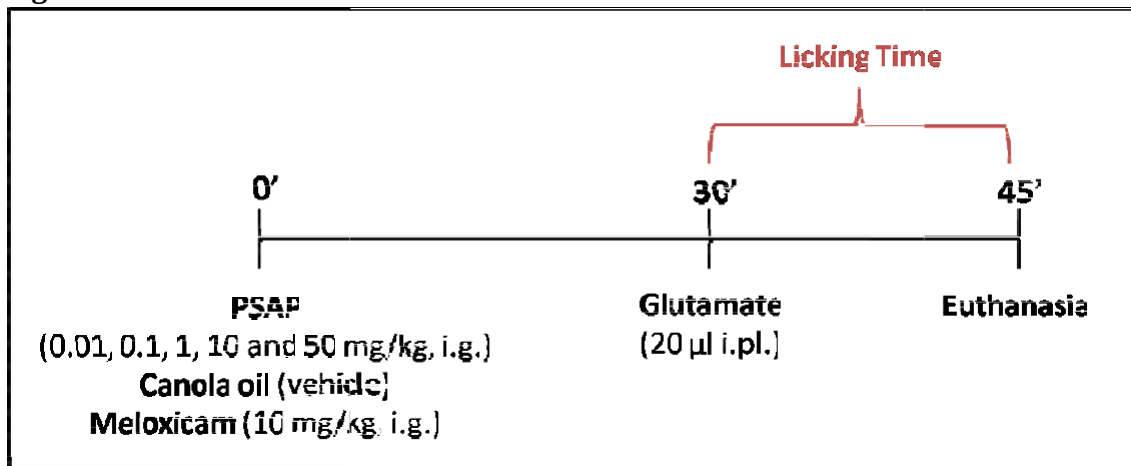
Figure 3

Figure 4

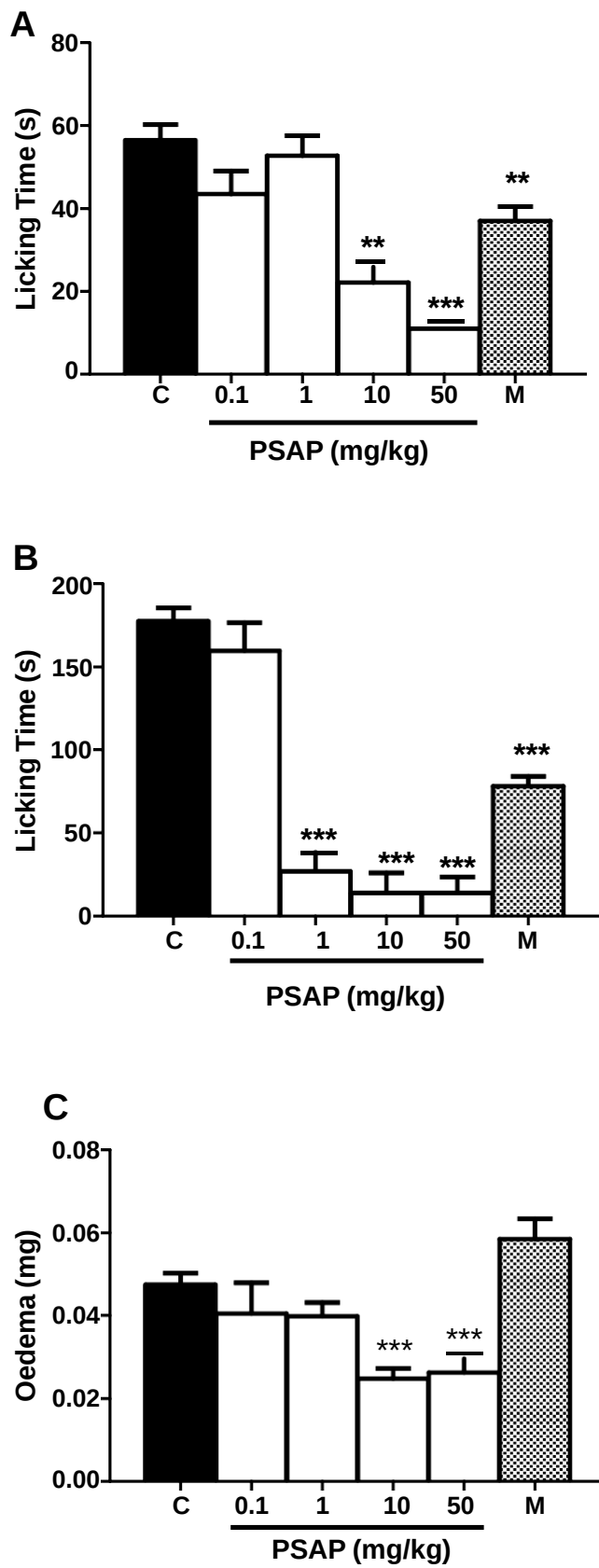


Figure 5

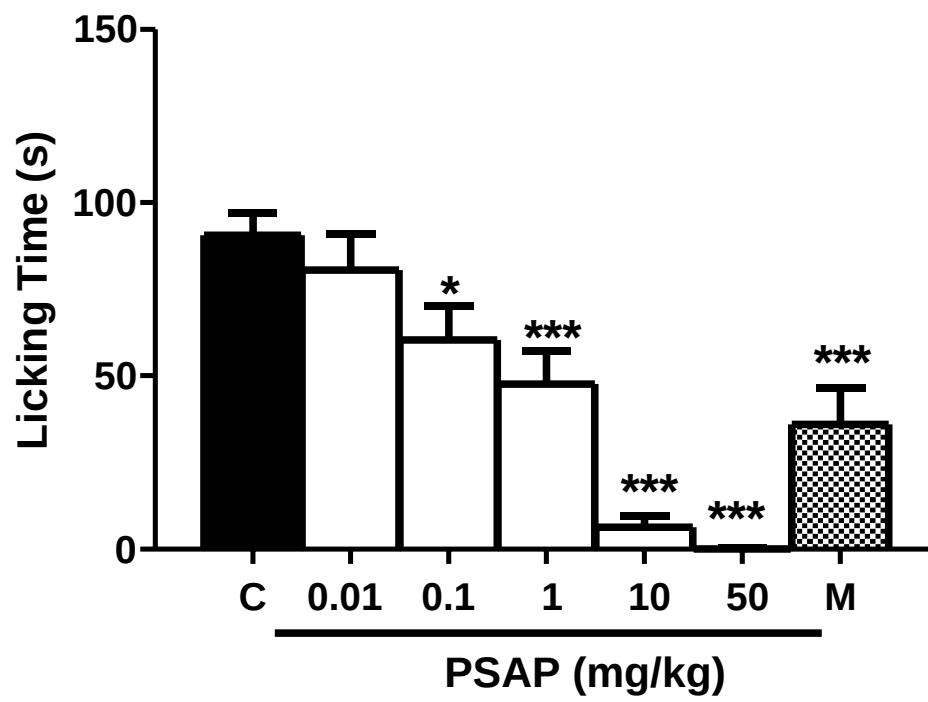


Figure 6

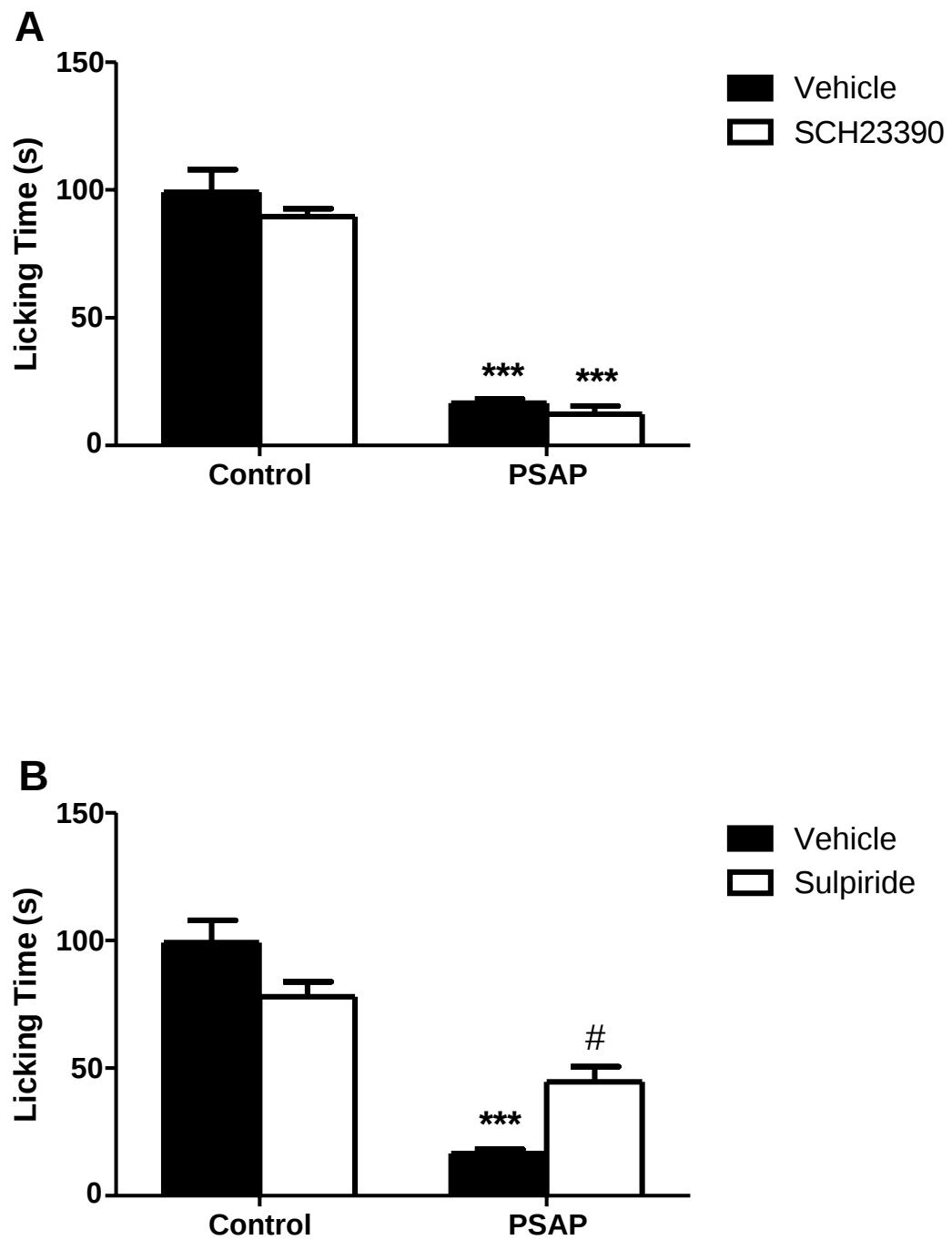


Figure 7

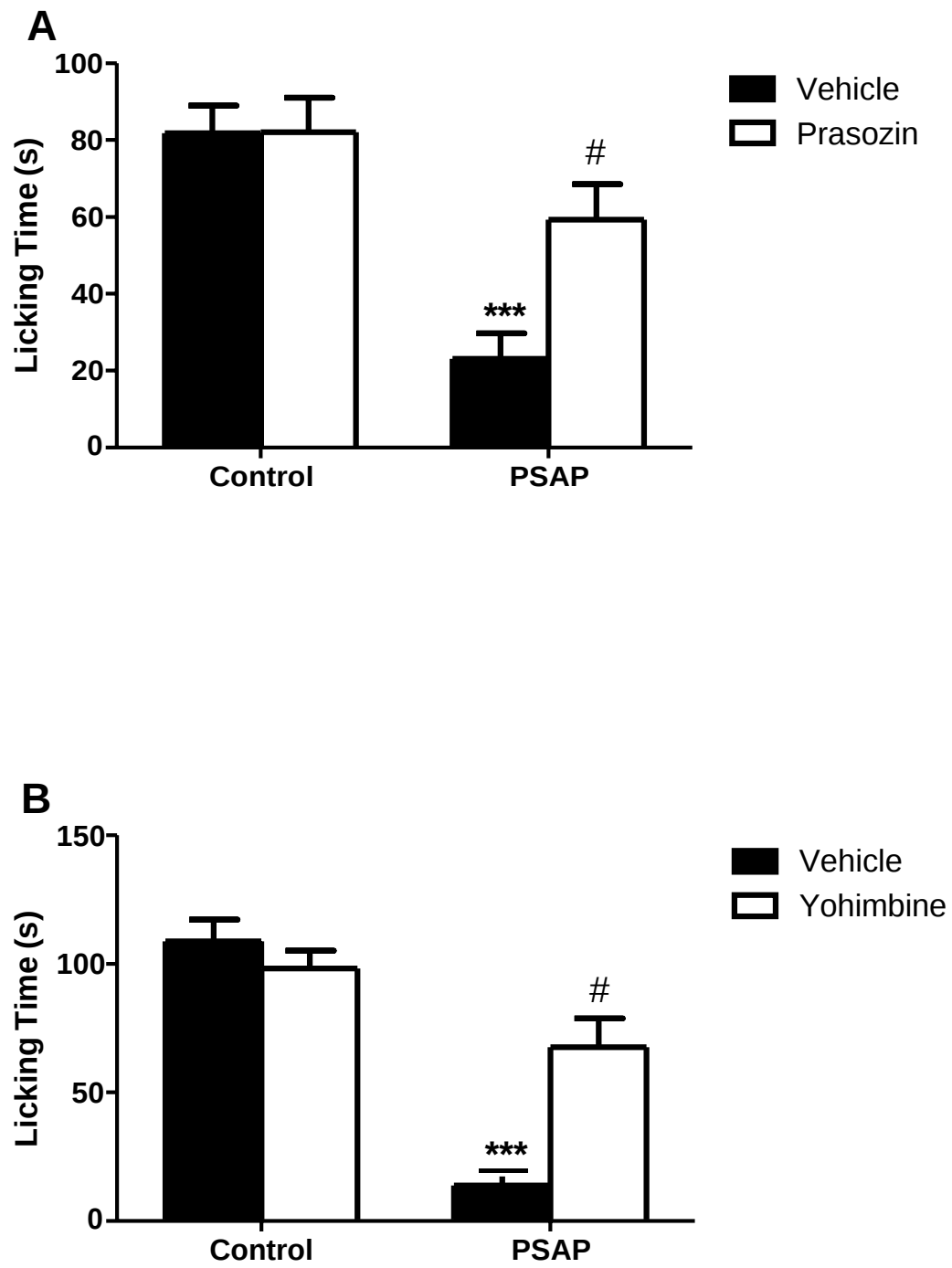


Figure 8

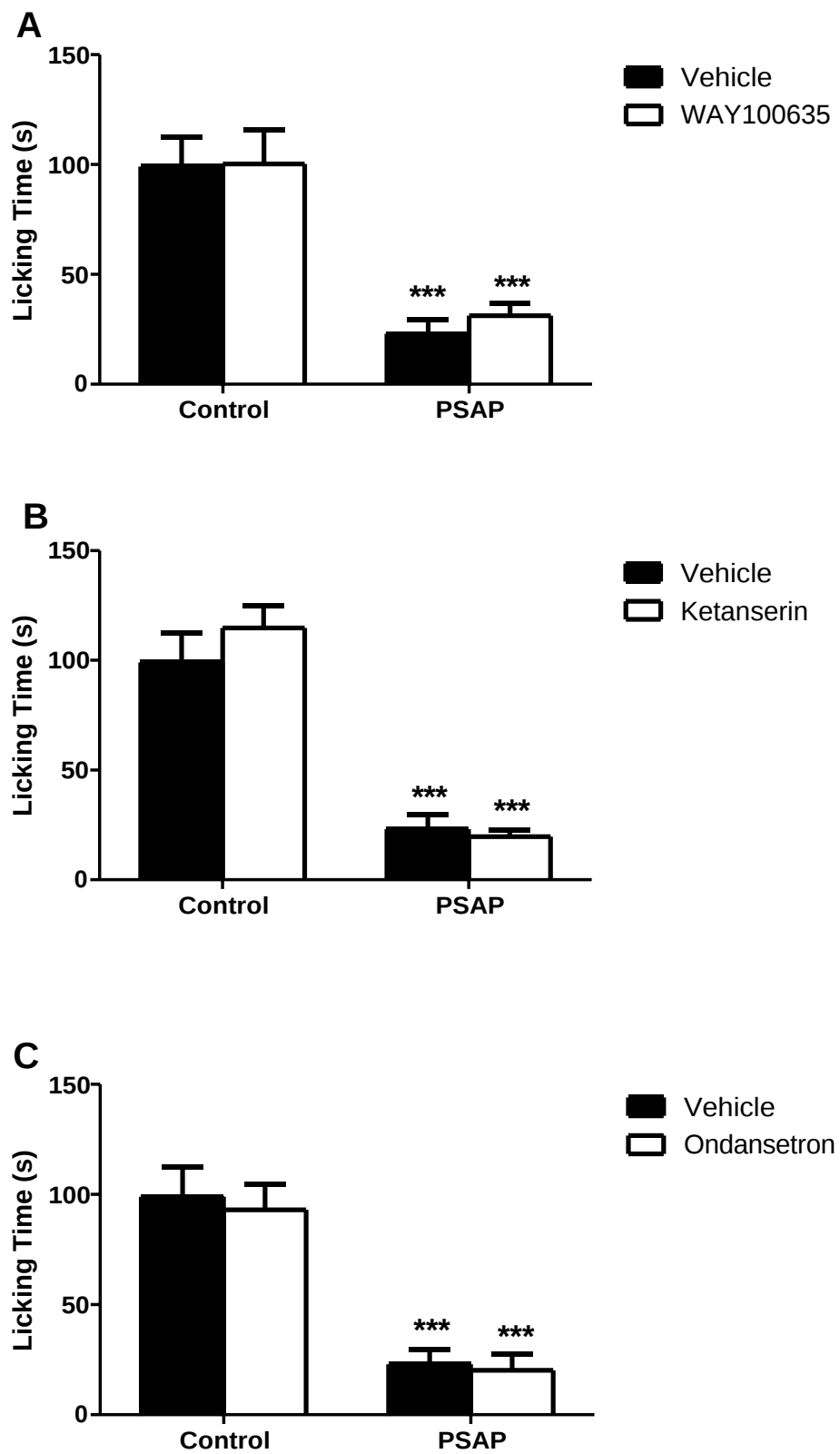


Table 1. Effect of administration of PSAP (0.01 - 50 mg/kg, i.g.) administered in mice 30 min before the open field test in mice.

Experimental groups	Number of crossings
Control (Canola oil)	88.00 $\pm$ 2.78
PSAP (0.01 mg/kg)	103.55 $\pm$ 7.73
PSAP (0.1 mg/kg)	88.82 $\pm$ 5.13
PSAP (1 mg/kg)	87.38 $\pm$ 7.57
PSAP (10 mg/kg)	62.00 $\pm$ 5.92
PSAP (50 mg/kg)	62.25 $\pm$ 0.07

The effect of treatment with PSAP behavior of mice in the open-field test. was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Data presented are mean values $\pm$ S.E.M.

Table 2. Effect of administration of PSAP and antagonists on behavior parameter in the open field test in mice.

Experimental groups	Number of crossings
Vehicle (saline 0.9%)	87.14 ± 8.63
PSAP (1mg/kg)	89.23 ± 5.25
WAY100635 (0.7 mg/kg)	116.3± 11.30
WAY100635 + PSAP	91.50 ± 11.20
Vehicle (saline 0.9%)	87.14 ± 8.63
PSAP (1mg/kg)	89.23 ± 5.25
Ketanserin (0.3 mg/kg)	106.0 ± 9.80
Ketanserin + PSAP	90.86 ± 6.36
Vehicle (saline 0.9%)	87.14 ± 8.63
PSAP (1mg/kg)	89.23 ± 5.25
Ondansetron (0.5 mg/kg)	116.3 ± 6.71
Ondansetron + PSAP	95.43 ± 12.18
Vehicle (saline 0.9%)	98.57 ± 13.07
PSAP (1mg/kg)	86.29 ± 11.84
SCH23390 (0.05 mg/kg)	63.83 ± 7.80
SCH23390 + PSAP	63.00 ± 4.789
Vehicle (saline 0.9%)	98.57 ± 13.07
PSAP (1mg/kg)	86.29 ± 11.84
Sulpiride (5 mg/kg)	97.75 ± 9.77
Sulpiride + PSAP	85.75 ± 8.11
Vehicle (saline 0.9%)	103.6 ± 6.67
PSAP (1mg/kg)	96.00 ± 6.29
Prasozin (0.15 mg/kg)	120.3 ± 6.78
Prasozin + PSAP	106.8 ± 5.85
Vehicle (saline 0.9%)	103.6 ± 6.67
PSAP (1mg/kg)	96.00 ± 6.29
Yohimbine (1 mg/kg)	84.63 ± 6.53
Yohimbine + PSAP	82.17 ± 4.62

The effect of treatment with PSAP behavior of mice in the open-field test. was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Data presented are mean values ± S.E.M.

5 Conclusão

- ✓ Baseado no que foi apresentado a PSAP teve a capacidade de reduzir a nocicepção induzida através da injeção tanto de formalina quanto de glutamato em diferentes doses testadas;
- ✓ O PSAP reduziu o tempo de lambida no teste de nocicepção induzido por formalina, assim como reduziu a formação de edema. Isto sugere que este composto apresenta atividade antinociceptiva e antiinflamatória;
- ✓ Além disso, o PSAP também reduziu a nocicepção induzida por glutamato, mais um fator que indica que este composto apresenta atividade antinociceptiva;
- ✓ Neste estudo foi possível identificar que a atividade antinociceptiva do PSAP pode estar envolvida com os sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos;
- ✓ O PSAP e a interação entre o composto e os antagonistas não alteraram a atividade locomotora no teste do campo aberto, descartando qualquer resposta falso-positiva nos testes comportamentais.

6 Perspectivas

Mais estudos de nocicepção serão investigados, para melhor compreender os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do PSAP. Estudo de nocicepção induzida por agente térmico através do ensaio da placa quente e da imersão da cauda. Estímulos induzidos por agentes mecânicos, como o teste de Von-Frey. Objetivando investigar os mecanismos envolvidos com a atividade antiinflamatória do PSAP, serão testados diferentes indutores de inflamação, como por exemplo, a carragenina, o cinamaldeído, o TNF- α , entre outros.

Referências

ABDEL-HAFEZ SH. H., Selenium containing heterocycles: synthesis, anti-inflammatory, analgesic and anti-microbial activities of some new 4-cyanopyridazine-3(2H) selenone derivatives. **European Journal Medical Chemistry**, v. 43, p. 1971-1977, 2008.

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**, v. 168, p. 831-841, 2010.

ALEXANDER, G.M.; VAN RIJN, M.A.; VAN HILTEN, J.J.; PERREAULT, M.J.; SCHWARTZMAN, R.J. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. **Pain**, v. 116, p. 213-239, 2005.

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**, v. 31, p. 157-161, 2015.

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

ALTIER, N.; STEWART, J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. **Life Science**, v. 65, p. 2269 - 2287, 1999.

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

ANVERSA, Roberta Gonçalves. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 1,2-bis-(4-metoxifenil-selenil) estireno em camundongos**. 2015. (Trabalho de conclusão de curso)- Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

APA, Practice Guideline for the Treatment of Patients with Major Depressive Disorder, Third Edition American Psychiatric Association. **American Journal of Psychiatry**, p. 1-152, 2010.

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

ARNER, E.S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxinreductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6102-6109, 2000.

ARNOW, B.A.; HUNKELER, E.M.; BLASEY, C.M.; LEE, J.; CONSTANTINO, M.J.; FIREMAN, B.; KRAEMER, H.C.; DEA, R.; ROBINSON, R.; HAYWARD, C. Comorbid depression, chronic pain, and disability in primary care. **Psychosomatic medicine**, v. 68, p. 262-268, 2006.

ASMUNDSON, G.J.; KATZ, J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. **Depression and Anxiety**, v. 26, p. 888-901, 2009.

AYALA-TORRES, S.; ZHOU, F.; THOMPSON, E.B. Apoptosis induced by oxysterol in CEM cells is associated with negative regulation of c-Myc. **Experimental Cell Research**, v. 246, p. 193-202, 1999.

BAIR, M.J.; ROBINSON, R.L.; KATON, W.; KROENKE, K. Depression and pain comorbidity: a literature review. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, p. 2433-2445, 2003.

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

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

BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p.1610 -1615, 1999.

BLUMER, D.; HEILBRONN, M. Chronic pain as a variant of depressive disease: the pain-prone disorder. **Journal Nervous Mental Disorder**, v. 170, p. 381-406, 1982.

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

BROD, L.M.P.; FRONZA, M.G.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C.; VARGAS, J. P.; LÜDTKE, 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**, v.65, p. 201-207, 2016.

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**, v. 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-trifluoromethyldiphenyldiselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.125, p. 15-20, 2014.

CASARIL, A.M.; MARTINEZ, D.M.; RICORDI, V.G.; ALVES, D.; LENARDÃO, E.J.; SCHULTZE, E.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K.; SAVEGNAGO, L. Evaluation of the toxicity of α -(phenylselanyl) acetophenone in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 868 – 874, 2015.

CASTRO, M.; VICTORIA, F. N.; OLIVEIRA, D. H.; JACOB, R.G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D.,. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 242-250, 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**, v. 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**, v. 6. p. 13-19, 2010.

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

CORRUBLE, E.; GUELF, J.D. Pain complaints in depressed inpatients. **Psychopathology**, v. 33, p. 307-309, 2000.

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**, v. 12, p. 8-11, 2012.

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

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F. DE Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p.153-64, 2003.

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**, v. 96, p. 1096-103, 2003.

DOHRENWEND, B.P.; RAPHAEL, K.G.; MARBACH, J.J.; GALLAGHER, R.M. Why is depression comorbid with chronic myofascial face pain? A family study test of alternative hypotheses. **Pain**, v. 83, p. 183–192, 1999.

DONATO, F.; GOMES, M.G.; GOES, A.T.R.; SEUS, N.; JESSE, C. R.; SAVEGNAGO, L. Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect caused by 4-phenyl-1-(phenylselenanylmethyl)-1,2,3-triazole. **Life Science**, v. 93, p. 393-400, 2013.

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

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 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**, v. 14, p.1337-1383, 2010.

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

FISHBAIN, D.A.; CUTLER, R.; ROSOMOFF, H.L.; ROSOMOFF, R.S. Chronic pain associated depression: antecedent or consequence of chronic pain? A review. **Clinical Journal of pain**, v. 13, p. 116-137, 1997.

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 chrysin. **New Journal of Chemistry**, v. 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**, v.3. p. 175-182, 2009.

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

GIESECKE, T.; GRACEY, R.H.; WILLIAMS, D.A.; GEISSER, M.E.; PETZKE, F.W.; CLAUW, D.J. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, p. 1577-1584, 2005.

GILL, S.; CHOW, R.; BROWN, A.J. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 391-404, 2008.

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

GUREJE, O. Psychiatric aspects of pain. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 20, p. 42-46, 2007.

HAGELBERG, N.; FORSSELL, H.; AALTO, S.; RINNE, J.O.; SCHEININ, H.; TAIMINEN, T.; NÄGREN, K.; ESKOLA, O.; JÄÄSKELÄINEN, S.K. Altered dopamine D2 receptor binding in atypical facial pain. **Pain**, v. 106, p. 43 – 48, 2003.

HILDERINK, P.H.; BURGER, H.; DEEG, D.J.; BEEKMAN, A.T.; OUDE VOSHAAR, R.C. The temporal relation between pain and depression: results from the longitudinal aging study amsterdam. **Psychosomatic medicine**, v. 74, p. 945-951, 2012.

HOTOPF, M.; MAYOU, R.; WADSWORTH, M.; WESSELY, S. Temporal relationships between physical symptoms and psychiatric disorder. Results from a national birth cohort. **British Journal of Psychiatry**, v. 173, p. 255-261, 1998.

HU, J., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A. Redox-active chalcogen-containing glutathione peroxidase mimetics and antioxidants inhibit tumour promoter-induced

down regulation of gap junctional intercellular communication between WB-F344 liver epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1815-1824, 1995.

IASP. IASP task force on taxonomy. In: H. Maibohg, editor. Classification of chronic pain. 2nd ed. Seattle: IASP Press, p. 209-214, 1994.

JESSE, C.; BORTOLATTO, C.; SAVEGNAGO, L.; ROCHA, J.; NOGUEIRA, C. Involvement of L-arginine nitric oxide cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. **Progress Neuro-Psychopharmacology**, v. 32, p. 1838-1843, 2008.

JESSE, C.R.; WILHELM, E.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Introduction of Trifluoromethyl Group into Diphenyl Diselenide Molecule Alters its Toxicity and Protective Effect against Damage Induced by 2-Nitropropane in Rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, p. 197-203, 2009.

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

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

KATZUNG, B.G. Basic & clinical pharmacology. 13th ed. Appleton and Lange. Kidd, B.L.; Urban, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anesthesia**, v. 87, p. 3-11, 2015.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O.; GUIGO, R.; GLADYSHEV, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439-443, 2003.

LARSON, S.L.; CLARK, M.R.; EATON, W.W. Depressive disorder as a long-term antecedent risk factor for incident back pain: a 13-year follow-up study from the Baltimore Epidemiological Catchment Area sample. **Psychological Medicine**, v. 34, p. 211-219, 2004.

LEINO, P.; MAGNI, G. Depressive and distress symptoms as predictors of low back pain, neck-shoulder pain, and other musculoskeletal morbidity: a 10-year follow-up of metal industry employees. **Pain**, v. 53, p. 89-94, 1993.

LEPINE, J.P.; BRILEY, M. The epidemiology of pain in depression. **Human Psychopharmacology**, v.19, p. S3–S7, 2004.

LIN, CHING-HUA.; YEN, YUNG-CHIEH.; CHEN, MING-CHAO.; CHEN, CHENG-CHUNG. Depression and pain impair daily functioning and quality of life in patients with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 166, p. 173-178, 2014.

LUCHESI, 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**, v.644, p. 49-54, 2010.

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

MARTINEZ, D.M.; BARCELLOS, A.; CASARIL, A.M.; SAVEGNAGO, L.; LERNARDÃO, E.J. Antidepressant-like activity of dehydrozingerone: Involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 127, p. 111-117, 2014.

MARTINEZ, D.M.; BARCELLOS, A.; CASARIL, A. M.; PERIN, G.; SCHIESSER, C.H.; CALLAGHAN, K. L.; LERNARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. Twice acting antioxidants: synthesis and antioxidant properties of selenium and sulfur-containing zingerone derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 2243-2246, 2015.

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

MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ Research**, v. 94, p. 276-82, 2004.

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

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

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 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 trischalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 5257-68, 2005.

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

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

NICASSIO, P.M.; WALLSTON, K.A. Longitudinal relationships among pain, sleep problems, and depression in rheumatoid arthritis. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 101, p. 514-520, 1992.

NIKOLIC, K.M. QSAR study of aromatic organochalcogens with glutathione peroxidase like antioxidant activity. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 26, p. 358-367, 2007.

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

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

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

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

PATTEN, S.B. Long-term medical conditions and major depression in a Canadian population study at waves 1 and 2. **Journal of affective disorders**, v.63, p. 35-41, 2001.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 80, p. 53-83, 2006.

PINE, D.S.; COHEN, P.; BROOK, J. The association between major depression and headache: results of a longitudinal epidemiologic study in youth. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, v. 6, p. 153–164, 1996.

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

POSSER, T.; MORETTO, M.B.; DAFRE, A.L.; FARINA, M.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; FERREIRA, J.D.; LEAL, R.B.; FRANCO, J.L. Antioxidant effect of diphenyldiselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation. **Chemico-Biological Interactions**, v.164, p. 126 - 135, 2006.

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

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

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

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

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

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

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**, v. 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. Bisselenide alkene derivatives: A class of potential antioxidant and antinociceptive agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 221-229, 2006.

SAVEGNAGO, L.; PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; ALVES, D.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyldiselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v.555, p. 129-138, 2007.

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

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**, v.54, p. 40-44, 2013.

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

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience supplement**, v.5, p. 1062-1067, 2010.

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

SIMON, G.E.; VONKORFF, M.; PICCINELLI, M.; FULLERTON, C.; ORMEL, J. An international study of the relation between somatic symptoms and depression. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1329-1335, 1999.

SLUZEWSKA, A.; RYBAKOWSKI, J.; BOSMANS, E.; SOBIESKA, M.; BERGHMANS, R.; MAES, M.; WIKTOROWICZ, K. Indicators of immune activation in major depression. **Psychiatry Research**, v. 64, p.161-167, 1996.

SOLOVYEV, N.D. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.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**, v.109, p. 37-43, 2014.

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

SOUZA, L. C.; FILHO, C.B.; GOES, A.T.R.; FABBRO, L.D.; GOMES, M.G.; SAVEGNAGO, L.; OLIVEIRA, M.S.; JESSE, C.R. Neuroprotective Effect of Physical Exercise in a Mouse Model of Alzheimer-s Disease Induced by β -Amyloid1-40 Peptide. **Neurotoxicity Research**, v. 24, p. 148-163, 2013.

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

TRICKLEBANK, M.D.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Involvement of dopamine in the antinociceptive response to footshock. **Psychopharmacology**, v. 82, p. 185 - 188, 1984.

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**, v.122, p. 1251-1256, 1997.

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

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

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Review**, v.46, p. 295-309, 2004.

VEJUX, A.; MALVITTE, L.; LIZARD, G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 545-556, 2008.

VICTORIA, F.N.; RADATZ, C.S.; SACHINI, M.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; MOTTA, A.S.; SILVA, W.P.; LENARDÃO, E.J. Further analysis of the antimicrobial activity of α -phenylseleno citronellal and α -phenylselenocitronellol. **Food Control**, v.23, p. 95-99, 2012.

VICTORIA, F.N.; BRAHM, A. S.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 105-109, 2013.

VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R.; PENTEADO, F.; CASTRO, M.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. Antioxidant and antidepressant-like activities of semi-synthetic α -phenylseleno citronellal. **European Journal of Pharmacology**, v. 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**, v.716, p. 8-16, 2013.

WALKER, A.K.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C.J.; DANTZER, R. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacology Review**, v. 66, p. 80-101, 2014.

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**, v. 56, p. 196-203, 1999

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

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

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; BORTOLATTO, C.F.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO L. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, p. 419- 425, 2009.

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

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

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.

ZARRINDAST, M.R.; NASSIRI-RAD, S.; PAZOUKI, M. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. **General Pharmacology**, v 32, p. 517 - 522, 1999.

ZASSO, F.B.; GONÇALES, C.E.P.; JUNG, E.A.C.; ARALDI, D.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C. W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyldiselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 283-9, 2005.

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

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

Anexos

Anexo A: Carta de Submissão do Manuscrito.

----- Mensagem encaminhada -----

De: The European Journal of Pharmacology

<ees.ejp.0.386814.e8905fac@eesmail.elsevier.com>

Para: luciellisavegnago@yahoo.com.br

Enviadas: Segunda-feira, 4 de Abril de 2016 12:45

Assunto: Submission Confirmation for Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of <alpha>- (phenylalanyl) acetophenone

Dear Dr. Lucielli Savegnago,

Your submission entitled "Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of <alpha>- (phenylalanyl) acetophenone"(Research Paper) has been received by journal European Journal of Pharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Please take a moment to fill out a survey on content

innovation: <http://survey.confermit.com/wix/p3076477586.aspx?acronym=3&jnlname=3>

Kind regards,

European Journal of Pharmacology