

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:

Bioquímica

EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DAS PURINAS:

ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS.

TESE DE DOUTORADO

Enderson Dias Alves de Oliveira

Porto Alegre, RS, Brasil

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Dias Alves de Oliveira, Enderson
Efeitos antinociceptivos das purinas: estudos
experimentais e clínicos / Enderson Dias Alves de
Oliveira. -- 2016.
128 f.

Orientador: André Prato Schmidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Antinocicepção. 2. Purinas. 3. Dor. 4.
Guanosina. 5. Guanina. I. Prato Schmidt, André,
orient. II. Título.

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DAS PURINAS:

ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS.

Anderson Dias Alves de Oliveira

Prof. Dr. André Prato Schmidt

(Orientador)

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:

Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor

em Bioquímica

Porto Alegre, dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais Sonia e Altivo pela luta realizada para minha formação desde minha juventude que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este doutorado, e aos meus irmãos Carlos e Lucien, pelo apoio e incentivo na busca dos meus objetivos. A todos vocês meus eternos agradecimentos!

Em especial a minha amada esposa Fernanda pela paciência, amor, carinho e intensa participação durante toda a realização deste trabalho. Sem dúvidas sem você nada disso seria possível.

Ao meu orientador André, por toda sua compreensão, amizade e pela confiança em mim depositada, pelos conselhos, questionamentos e discussões que ajudaram na realização deste trabalho, e sobretudo pela paciência em esperar tanto tempo pelo término desta tese. Um espelho profissional e de ser humano para seguir.

Ao Professor Diogo Souza pela oportunidade de iniciar juntamente com o início da graduação no mundo científico, propiciando esse trabalho e atuando como co-orientador desta tese, pela paciência e viabilidade do trabalho.

Aos meus bolsistas Aecio, Michael e Marcos, pela amizade, pela ajuda incondicional, pela dedicação, pela lealdade, pelo companheirismo, por serem fundamentais na realização dos trabalhos desta tese.

A todos meus amigos da bioquímica, em especial ao Marcelo, Roberto, Luis Valmor, Diogo Losch, a Lisi, Luciana, Débora e Gisele que de alguma forma contribuíram com este trabalho. A Cléia e aos demais integrantes da secretaria de pós-graduação, pelas inúmeras ajudas solicitadas por mim nestes anos, e que foram sempre eficazmente atendidas.

Aos meus amigos de fora do meio acadêmico, pela amizade, pela paciência, e pela compreensão, sempre me apoiando nesses anos de dedicação ao doutorado.

Aos membros da banca, pela leitura e exame da presente tese. Agradeço, enfim, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade.

SUMÁRIO

PARTE I

| | |
|--|----|
| Prefácio | 02 |
| Lista de Abreviaturas | 03 |
| Resumo | 05 |
| Abstract | 06 |
| Apresentação | 07 |
| I.1. Introdução | 08 |
| I.1.a. Dor | 08 |
| I.1.b. Transmissão da dor | 11 |
| I.1.c. Transmissão da dor – Mecanismos periféricos | 13 |
| I.1.d. Dor - Processamento e sensibilização central | 15 |
| I.1.e. Dor - mediadores químicos | 20 |
| I.1.f. Dor patológica: dor crônica neuropática | 22 |
| I.1.g. O sistema purinérgico: Papel na transmissão dolorosa | 24 |
| I.2. Objetivos e estrutura da tese | 27 |
| I.2.a. Trabalhos experimentais com modelos animais | 27 |
| I.2.b. Trabalhos experimentais com modelos humanos | 27 |

PARTE II

| | |
|---|----|
| II.1. Resultados experimentais com modelos animais | 30 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.1.a. Mechanisms involved in the antinociception induced by spinal administration of inosine or guanine in mice | 30 |
| II.1.b. The antinociceptive effects of guanosine in inflammatory and neuropathic pain models | 43 |
| II.2. Resultados experimentais com modelos humanos | 68 |
| II.2.a. Clinical effects of allopurinol on perioperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy | 68 |

PARTE III

| | |
|---|-----|
| III.1. Discussão dos resultados | 100 |
| III.1.a. Efeitos antinociceptivos da inosina, da guanina e da guanosina | 100 |
| III.1.b. Efeitos antinociceptivos do alopurinol: o papel do sistema purinérgico | 110 |
| III.2. Considerações finais | 113 |
| III.3. Perspectivas | 114 |
| III.4. Referências | 115 |

PARTE I

Onde é descrita uma introdução e os objetivos são traçados.

PREFÁCIO

Dentro do abrangente campo da pesquisa em neurociências, e mais especificamente dentro da área da dor, a presente tese de doutorado versa sobre o papel das purinas, em especial da guanina, da inosina e guanosina, na transmissão da dor.

A tese é dividida em três partes. A primeira delas é destinada a uma breve revisão a cerca dos conhecimentos necessários para o entendimento da segunda parte, onde são apresentados os resultados obtidos através de artigos científicos. Esta segunda parte da tese pode ainda ser dividida em dois conjuntos de resultados: o primeiro conjunto abordando os resultados obtidos através de procedimentos experimentais com animais realizados dentro do Departamento de Bioquímica da UFRGS; e um segundo conjunto de resultados que foi obtido através de estudo experimental com humanos, avaliados em um hospital universitário brasileiro. Por fim, na terceira parte da tese os resultados obtidos são um pouco mais explorados e discutidos, desta vez de forma um pouco mais informal do que a exigida pelos padrões atuais adotados na preparação de manuscritos científicos. Espero que esta terceira parte também ajude na integração dos resultados e na geração de perspectivas para futuras pesquisas.

De uma maneira geral, acredito que ainda temos muito a avançar na descoberta de novos fármacos no tratamento da dor. Creio que esta tese demonstra, ainda que de maneira incipiente, uma tentativa de propor novos fármacos ou mesmo novos alvos para desenvolvimentos de alternativas terapêuticas mais eficazes no tratamento da dor.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ADP – adenosina-5'-difosfato

AMP – adenosina-5'-monofosfato

AMPc – adenosina-3',5'-monofosfato-cíclico

ATP – adenosina-5'-trifosfato

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GMP – guanosina-5'-monofosfato

GMPc – guanosina 3',5'-monofosfato-cíclico

GDP – guanosina-5'-difosfato

GTP – guanosina-5'-trifosfato

i.c.v. – intracerebroventricular

i.p. – intraperitoneal

i.t. – intratecal

LCR – líquido cefalorraquidiano

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

NMDA – N-metil-D-aspartato

NGF – fator de crescimento neural

PAF – fator de ativação plaquetário

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

(DE OLIVEIRA EDA – EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DAS PURINAS: ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS) – Os objetivos da presente tese de doutorado foram os de investigar o papel das purinas, em especial da guanina, da inosina e da guanosina, na nocicepção e compreender os mecanismos responsáveis pelos efeitos extracelulares desses compostos. Os resultados estão divididos em três partes, de acordo com sua natureza, em revisão da literatura (parte um), experimental, em animais e em humanos (parte dois) e discussão (parte três). Para o desenvolvimento da primeira parte, uma extensa revisão da literatura em relação ao papel extracelular das purinas na nocicepção foi realizada. Na segunda parte desta tese, procedimentos experimentais em animais demonstraram que a guanina e a inosina administradas por via intratecal, são antinociceptivas em diversos modelos de dor, além da guanosina administrada via intraperitoneal com seu efeito antinociceptivo em modelo de dor neuropática em camundongos. A administração intratecal de guanina e inosina causou um aumento significativo nos níveis de inosina e oxipurinas no líquido cefalorraquiano (LCR). Os níveis de guanina no LCR não foram detectados de forma acurada através da presente metodologia cromatográfica. Diversos testes comportamentais demonstraram o baixo potencial de toxicidade apresentado pelas purinas administradas por via intratecal. A seguir, os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antinociceptivos da guanina e da inosina foram investigados através de métodos farmacológicos, demonstrando que ambos parecem compartilhar mecanismos semelhantes, envolvendo a ativação de receptores adenosinérgicos. Também demonstramos que o alopurinol, um derivado das purinas e inibidor da xantina oxidase normalmente utilizado para o tratamento de hiperuricemia, também produziu efeito analgésico em pacientes em pós-operatório imediato de histerectomia abdominal, além de apresentarem aumento de xantina e diminuição de ácido úrico no LCR. Apesar da utilização clínica das purinas ser demasiadamente precoce, podemos inferir que a utilização de alopurinol poderia ser uma excelente estratégia para testar nossas hipóteses, pois demonstra a vantagem de estar aprovado para uso comercial, apresentar boa tolerabilidade e baixo custo. Os resultados apresentados nesta tese ratificam o papel das purinas nos mecanismos de transmissão da dor e um novo papel para a guanina, a inosina e a guanosina é proposto: a modulação da dor. Diversos derivados purinérgicos são alvos para desenvolvimento de novos fármacos e podem ser úteis no tratamento de dor relacionada a hiperestimulação do sistema adenosinérgico e glutamatérgico.

ABSTRACT

(DE OLIVEIRA EDA – ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF PURINES: EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES) – The aim of this thesis was to investigate the role of purines, especially guanine, inosine and guanosine, against the nociception and to understand the mechanisms responsible for the extracellular effects of these compounds. The results are divided into three parts, according to their nature, in review of the literature (part one), experimental, in animals and humans (part two) and discussion (part three). For the development of the first part, an extensive review of the literature regarding the extracellular role of purines in the nociception was performed. In the second part of this thesis, experimental procedures in animals demonstrated that guanine and inosine administered intrathecally are antinociceptive in several models of pain. Additionally, guanosine, administered intraperitoneally, produced antinociceptive effects in a model of neuropathic pain in mice. Intrathecal administration of guanine and inosine caused a significant increase in inosine and oxypurine levels in the cerebrospinal fluid (CSF). The levels of guanine in the CSF were not accurately detected by the present chromatographic methodology. Several behavioral tests have demonstrated the low toxicity potential of intrathecal purines. Furthermore, the mechanisms of action involved in the antinociceptive effects of guanine and inosine have been investigated through pharmacological methods, demonstrating that both seem to share similar mechanisms, involving the activation of adenosinergic receptors. We also demonstrated that allopurinol, a purine derivative and xanthine oxidase inhibitor commonly used for the treatment of hyperuricemia, also produced an analgesic effect in patients in the immediate postoperative period of abdominal hysterectomy, in addition to increased xanthine and decreased uric acid in the CSF. Although the clinical use of purines is too premature, we can infer that the use of allopurinol could be an excellent strategy to test our hypotheses, since it demonstrates the advantage of being approved for commercial use, presenting good tolerability and low cost. The results presented in this thesis confirm the role of purines in pain transmission mechanisms and a new role for guanine, inosine and guanosine is proposed: pain modulation. A number of purinergic derivatives are targets for the development of novel drugs and may be useful in the treatment of pain related to hyperstimulation of the adenosinergic and glutamatergic system.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado apresenta os resultados sob a forma de artigos científicos, as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências bibliográficas encontram-se nos próprios artigos. Os itens Introdução, Discussão e Conclusões encontradas nesta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre todos os artigos científicos contidos neste trabalho. As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão desta tese.

Detalhes técnicos mais precisos sobre a metodologia empregada em cada trabalho podem ser encontrados nos artigos científicos correspondentes.

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.a. Dor

A dor é uma das grandes preocupações da humanidade, uma sensação desagradável da pele ou de outros órgãos expostos a dano ou estímulos nocivos. O homem sempre tentou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência da dor e com isso oferecer estratégias de tratamento para seu controle. Componente fundamental da homeostase, a dor tem como seu propósito inicial alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual, permitindo que mecanismos de defesa ou fuga sejam adotados [Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001].

Entretanto, a dor pode perder seus propósitos protetores, tornar-se persistente ou crônica em determinadas situações, no qual o organismo não é mais capaz de produzir resolução da lesão ou quando são estabelecidos mecanismos adaptativos inadequados [D’Mello e Dickenson, 2008]. Estas alterações neuroplásticas podem ocorrer em diversas situações como após lesão ou disfunção nervosa (dor neuropática) [Zhuo, 2007]. Nestes casos, os pacientes apresentam dor de característica persistente, em virtude de alteração no processamento sensorial, associada a hiperalgesia (percepção exagerada de estímulos dolorosos) e alodinia (estímulos inócuos gerando resposta dolorosa) [Millan, 1999]. Devido ao intenso sofrimento e difícil tratamento desse tipo de dor, como queda da qualidade de vida e diminuição da capacidade funcional, torna-se um grande desafio o seu controle [Zimmermann, 2001]. Além disso, os custos dos quadros dolorosos agudos e principalmente crônicos são elevados, tanto custo direto (gastos em saúde), quanto indireto (faltas ao trabalho, licenças médicas, etc). Em virtude disso, é fundamental o entendimento da fisiopatologia da dor a fim de buscar novas alternativas terapêuticas.

A dor possui um carácter multifatorial, envolvendo componentes sensoriais, cognitivos e emocionais [Julius e Basbaum, 2001]. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos [Loeser e Melzack, 1999]. Sua transmissão ao longo do sistema nervoso apresenta extensa modulação, principalmente no cérebro [Stucky et al., 2001]. Considerando estes aspectos, o componente sensorial da dor pode ser definido como nocicepção, que representa a sensação determinada pela estimulação de receptores presentes nas fibras aferentes primárias [Millan, 1999]. Enquanto a dor envolve a percepção e interpretação de estímulos nocivos, a nocicepção corresponde às manifestações neurofisiológicas e neuroquímicas geradas pelo estímulo nocivo. Logo, a avaliação da dor em modelos animais é feita de forma indireta através de respostas comportamentais, resultando em modelos de nocicepção [Millan, 1999].

A classificação da dor pode ser em eventual ou transitória, aguda e crônica. Dor eventual é transmitida pelos nociceptores periféricos e não está relacionada a um estímulo nocivo ou lesão significativos (exemplo: uma vacina, venóclise, etc). Dor aguda está relacionada a algum estímulo nocivo com substancial lesão tecidual (queimadura, incisão cirúrgica, etc), onde nociceptores, conexões nervosas no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA) já estão envolvidos. Já a dor crônica trata-se da dor que persiste mesmo após o processo de cicatrização do organismo ou, muitas vezes, nem está relacionado a processo nocivo detectado (fibromialgia, neuralgia pós-herpética, etc) [Millan, 1999]. Entretanto, não é apenas a duração que caracteriza o tipo de dor, mas também a capacidade do organismo de reparar o sítio de lesão e o processamento neural responsável pela transmissão dolorosa [Hill, 2001]. A dor apresenta diversos componentes, desde a

sensibilização da periferia pelo estímulo nocivo (nocicepção) até alterações neuroplásticas adaptativas, tais como sensibilização central, alterações na capacidade modulatória de neurônios inibitórios na medula espinhal, reorganização do circuito neuronal e vias nervosas, entre outras alterações [Millan, 1999; Hill, 2001; Zimmermann, 2001]. Estas peculiaridades da transmissão dolorosa geram comportamentos dolorosos diversos que podem ser, por exemplo, de retirada no caso de um estímulo agudo ou de posição antálgica em quadros dolorosos crônicos. [Apkarian et al., 2008].

Quanto a sua origem, a dor pode ser classificada em quatro tipos principais: i. Dor nociceptiva: originada da estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele e alguns outros órgãos; ii. Dor neurogênica: desencadeada por dano do tecido neuronal na periferia ou no SNC; iii. Dor neuropática: ocasionada por disfunção ou lesão nervosa; iv. Dor psicogênica: não causada por fonte somática detectável e pode refletir forte influência de fatores psicológicos [Millan, 1999].

Alguns fatores como novos hábitos de vida, maior longevidade, prolongamento da sobrevivência de doentes portadores de afecções letais, modificações ambientais, e, principalmente, maior diagnóstico e reconhecimento dos quadros dolorosos, tenham provável influência na ocorrência crescente de dor, especialmente crônica [Tunks et al., 2008]. No Brasil e em outros países, até 50% dos indivíduos procuram clínicas médicas devido ao sintoma dor [Rocha et al., 2007; Nampiampil, 2008; Tunks et al., 2008]. Mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, a queixa de dor esta presente, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos [Rocha et al., 2007]. Esses argumentos enfatizam a importância da busca de elementos que permitam uma melhor abordagem da dor aguda e crônica. Considerando que a dor é um evento altamente complexo, provavelmente nunca teremos um tratamento único e ideal

para todos os pacientes e afecções clínicas. Portanto, a necessidade de investigação de novas terapêuticas adjuvantes é extremamente importante, buscando maior conhecimento de neurofarmacologia e de fisiopatologia da dor, possibilitando novas modalidades de tratamento, principalmente para os quadros mais refratários.

I.1.b. Transmissão da dor

Em 1965, Melzack e Wall publicaram a primeira importante publicação sobre os mecanismos de transmissão dolorosa, a famosa “teoria dos portões”, que procura explicar como ocorre a diferenciação entre estímulos sensoriais nocivos (dor) e não-nocivos (tato) [Melzack e Wall, 1965]. A publicação desta teoria voltou a atenção dos pesquisadores para novas descobertas nos mecanismos de transmissão da dor, que hoje se encontram muito mais complexos do que a teoria inicial. A fundação de órgãos para estudar e divulgar o tema (IASP) e a criação de periódicos específicos para divulgar o conhecimento na área contribuíram de forma significativa para o estado atual do conhecimento. A formação médica tem cada vez mais discutido o tema, colaborando para o avanço de novos conhecimentos sobre mecanismos de transmissão dolorosa, fundamental no desenvolvimento de novas terapêuticas.

O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central [Zhang e Bao, 2006]. Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A δ e C [Fitzgerald, 2005] e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação. As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C

(nociceptores) são capazes de traduzir um estímulo nocivo (de natureza térmica, química ou mecânica) em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central através da medula espinhal e interpretado no córtex cerebral como dor [Wood, 2004]. As fibras A δ são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ (2 a 6 mm de diâmetro), em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida (12 a 30 m.s⁻¹), enquanto as fibras C (0,4 a 1,2 mm de diâmetro) são responsáveis pela transmissão lenta da dor (0,5 a 2 m.s⁻¹). [Schaible, 2007]. Também é relevante citar as fibras A β , caracterizadas por serem mais espessas (mais de 10 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m.s⁻¹), que normalmente não participam da transmissão da dor, entretanto, caso ocorram alterações neuroplásticas, estas fibras podem auxiliar no processo de amplificação da dor em nível medular [Millan, 1999; D'Mello e Dickenson, 2008].

Estímulos como mudança de temperatura, lesão tecidual direta, hipóxia e isquemia, entre outros, sensibilizam os nociceptores. Alguns deles permanecem silentes durante estímulos de menor intensidade, mas são ativados em situações específicas como na inflamação, amplificando a resposta dolorosa [Julius e Basbaum, 2001]. A maioria das fibras C são polimodais, isto é, são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, já algumas delas são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem a estímulos térmicos. Essas fibras são classificadas de acordo com a presença de peptídeos e a localização dos terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinhal em fibras C peptidérgicas e não-peptidérgicas. As fibras C não-peptidérgicas expressam receptores purinérgicos do tipo P₂X₃ e receptores para o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF),

apresentando terminais sinápticos localizados mais internamente na substância gelatinosa da medula espinhal (lâmina II). As fibras peptidérgicas contêm peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores para o fator de crescimento neural (NGF), apresentando terminais sinápticos em regiões mais externas no corno dorsal da medula espinhal (lâmina I) [Millan, 1999]. As fibras A δ respondem principalmente a estímulos nocivos de origem mecânica e térmica, e apresentam-se subdivididas de acordo com o limiar de temperatura para a transmissão do estímulo através das vias ascendentes [Millan, 1999].

I.1.c. Transmissão da dor – Mecanismos periféricos

Algôgenicos são substâncias químicas presentes nos tecidos e que podem sensibilizar os nociceptores, entre eles se destacam: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário (PAF), íons potássio e hidrogênio, prostaglandinas, tromboxanos, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento neural (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) [Wood, 2004]. Quando o estímulo provoca a lesão tecidual, há o desencadeamento de processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas também liberam diversas enzimas de seu interior, que no ambiente extracelular degradam ácidos graxos e formam cininas, tais como a bradicinina. Esta provoca intensa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória [Millan, 1999; Huang et al., 2006]. Associado a este processo, fosfolipase A desencadeia a liberação de ácido araquidônico na membrana celular. Este é metabolizado através de sistemas enzimáticos, produzindo: i. prostaglandinas, tromboxanos, e prostaciclina (ciclooxigenase); ii.

leucotrienos e lipoxinas (lipoxigenase); iii. os produtos da via da epoxigenase (citocromo P-450). Essas substâncias promovem a diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores [Huang et al., 2006].

A substância P e a neurocinina A produzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, contribuindo também para a geração e manutenção do processo inflamatório. A bradicinina, a prostaglandina E₂, o NGF e as interleucinas também exercem papel fundamental nos mecanismos de sensibilização periférica à dor. A prostaglandina e a bradicinina causam alterações em receptores específicos (TRPV₁) acoplados a canais iônicos ligante-dependente via ativação do AMPc, e das proteínas cinases A (PKA) e C (PKC), reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa. O NGF e outras neurotrofinas aumentam a síntese, o transporte axonal anterógrado e quantidade de substância P e CGRP nas fibras C e reduzem a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA) nas terminações nervosas periféricas e centrais [Hill, 2001; Julius e Basbaum, 2001]. As neurotrofinas provocam mudanças nos receptores TRPV₁ de fibras A δ acoplados a canais iônicos ligante-dependente e acionam as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) que podem fosforilar o AMPc e iniciar a transcrição genética responsável por alterações fenotípicas, as quais contribuem para a amplificação da eficácia sináptica [Hill, 2001; Julius e Basbaum, 2001]. A persistência da agressão causa modificações no sistema nervoso periférico e sensibilização de fibras nervosas, com conseqüente ativação de nociceptores silentes, hiperalgesia e aumento dos níveis de AMPc e cálcio nos nociceptores. Esse fenômeno ocorre por ação dos mediadores inflamatórios e conseqüente atividade espontânea dos neurônios, aumento da resposta a estímulos supraliminares e diminuição do limiar de ativação dos nociceptores [Huang et al.,

2006]. Após a liberação dos mais diversos mediadores químicos da lesão, os nociceptores desenvolvem descargas espontâneas, tornando-se capazes de responder de maneira intensa a estímulos nociceptivos e não-nociceptivos [Huang et al., 2006].

Em vista disso, a agressão tecidual resulta na liberação de diversos mediadores químicos que culminam em alterações na permeabilidade vascular, no fluxo sanguíneo local e produção dos sinais clássicos inflamatórios de rubor, calor, dor, tumor e impotência funcional. Tem início o processo de sensibilização periférica com conseqüente exacerbação da resposta ao estímulo doloroso. Os mediadores periféricos levam a despolarização da membrana neural por tempo prolongado, com conseqüente aumento da condutividade dos canais de sódio e cálcio e redução do influxo de potássio e cloro para o meio intracelular. Em situações onde este evento seja prolongado, alterações neuroplásticas em nível central podem ocorrer, desencadeando os mecanismos de sensibilização central [Apkarian, 2008].

I.1.d. Dor - Processamento e sensibilização central

A liberação de diversos mediadores algogênicos conseqüente a lesão periférica desencadeiam um processo de transmissão do estímulo doloroso até níveis mais centrais [Millan, 1999]. Essa transmissão dos estímulos nocivos através da medula espinhal não é um processo passivo. A interação entre os circuitos intramedulares têm a capacidade de alterar o estímulo e a conseqüente resposta dolorosa, o que determinará as mensagens que atingirão o córtex cerebral [Zhang e Bao, 2006]. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que estímulos nocivos provocam alterações no sistema nervoso central, modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes. A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade,

hiperalgesia – primária e secundária - e alodinia. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes. A presença de todos esses elementos sugere que a sensibilização periférica não é o único fenômeno responsável por todas essas mudanças e que deve haver envolvimento do SNC neste processo [Zhuo, 2007].

Os impulsos nociceptivos são transmitidos através de aferentes primários até o corno dorsal da medula espinhal - área primária de recebimento da maioria das informações sensoriais [D'Mello e Dickenson, 2008], o qual é dividido morfológica e funcionalmente em lâminas com base em sua citoarquitetura, sendo que cada lâmina se caracteriza por receber diferentes tipos de informações [Millan, 1999]. As fibras aferentes primárias do tipo A δ e C realizam suas sinapses primárias nas lâminas mais superficiais, ocorrendo integração dos impulsos nervosos no corno dorsal da medula espinhal com diferentes projeções em territórios superiores, como estruturas subcorticais e corticais [Fitzgerald, 2005].

Entretanto, é importante ressaltar o papel fundamental de mecanismos inibitórios endógenos presentes em nosso organismo. Além da existência de mediadores químicos endógenos de caráter antinociceptivo, diversas estruturas espinhais e supra-espinhais descendentes modulam fortemente a resposta dolorosa [Zhang e Bao, 2006; Yoshimura e Furue, 2006]. Esta modulação se dá através de vias descendentes provenientes de diversas estruturas do SNC como o tálamo, tronco cerebral, hipotálamo, córtex, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal, entre outras estruturas superiores [Yoshimura e Furue, 2006]. As vias descendentes modulam a resposta dolorosa através de ações sobre as

vias aferentes primárias e sobre interneurônios inibitórios e excitatórios em nível medular. Estas vias são provenientes principalmente do tronco cerebral até a medula espinhal e são predominantemente de caráter noradrenérgico e serotoninérgico [Yoshimura e Furue, 2006]. Estudos eletrofisiológicos demonstraram diversas características inibitórias das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas, dentre elas hiperpolarizam diretamente os neurônios situados no corno dorsal da medula, inibem a liberação de glutamato de fibras aferentes A δ e C e aumentam a liberação de GABA e glicina proveniente de interneurônios inibitórios na medula espinhal. Apesar de efeitos excitatórios terem sido descritos e relacionados a estas vias, o efeito predominante é antinociceptivo, demonstrando, portanto, o papel fundamental destas vias de transmissão nervosa descendente no controle endógeno da dor [Yoshimura e Furue, 2006].

Contudo, se o estímulo periférico for suficientemente sustentado ou intenso, ou em determinadas ocasiões, ocorrer uma disfunção intrínseca das vias de transmissão dolorosa, fenômenos neuroplásticos reversíveis ou até irreversíveis podem ocorrer em nível central [Zhuo, 2007]. Neste caso, começam a ocorrer mecanismos de sensibilização central, que podem, em muitas situações, desencadear síndromes dolorosas crônicas altamente refratárias [Tunks et al., 2008]. Esta sensibilização central implica em alterações dos impulsos periféricos, com adaptações positivas ou negativas podendo ocorrer redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal. Impulsos repetidos em fibras C amplificam sinais sensoriais em neurônios espinhais, enviando mensagens para o encéfalo [Zhuo, 2007].

Após a agressão tecidual, há liberação de neurotransmissores, como substância P, somatostatina, CGRP, neurocinina A, glutamato e aspartato, substâncias essas que estão relacionadas com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios [Millan, 1999]. Estímulos frequentes dos aferentes geram a soma dos potenciais de ação e consequente despolarização pós-sináptica cumulativa. O aumento do cálcio tem como consequência a ativação da enzima óxido nítrico sintase e a estimulação da transcrição de proto-oncogenes, que são genes localizados no SNC e estão envolvidos na formação de dinorfinas e encefalinas. As encefalinas têm ação antinociceptiva e estão envolvidas no processo de redução da neuroplasticidade e hiperalgesia. Entretanto, as dinorfinas têm um efeito mais complexo, já que possuem ação algôgena e antinociceptiva dependendo da situação. Estudos recentes têm sugerido que a ativação do c-fos e c-jun promove a transcrição de RNAm responsável pela síntese de proteínas fundamentais, as quais estão envolvidas na alteração da expressão fenotípica e, conseqüentemente, na perpetuação da hipersensibilidade neuronal [Delander et al., 1997; Jongen et al., 2005].

Os neuropeptídeos como a substância P e o CGRP ligam-se aos receptores para neurocininas do tipo NK₁ e NK₂, enquanto as neurotrofinas possuem como receptores as tirosinases tipo A e B (trkA, trkB) [Hill e Oliver, 2007]. Após a liberação de aminoácidos excitatórios, peptídeos e neurotrofinas e sua interação com receptores específicos, há a ativação de segundos mensageiros, do tipo AMPc, PKA, PKC, fosfatidil-inositol, fosfolipase C, fosfolipase A₂. Após ativação suficientemente intensa e persistente dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, inicia-se a ativação de receptores NMDA. Isto promove a abertura de canais de cálcio, aumentando o influxo de íons cálcio e a produção de prostaglandinas e óxido nítrico. Estes migram do intracelular em direção à fenda

sináptica e estimulam a liberação de glutamato, aspartato, substância P e CGRP, contribuindo para a ampliação do processo álgico [Birklein e Schmelz, 2008].

Os mecanismos que contribuem para o aumento da eficácia da transmissão sináptica podem ser decorrentes da fosforilação dos receptores de membrana e das alterações no tempo de abertura dos canais iônicos, ou da formação e do transporte de substâncias excitatórias do interior da célula para a fenda sináptica. Além disso, no corno dorsal da medula espinhal, as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) modulam a fosforilação dos receptores NMDA e AMPA, amplificando a resposta nociceptiva. A facilitação de longo termo envolve a ativação de fatores de transcrição e alterações na transcrição. Os fatores de transcrição modulam a relação entre o complexo receptor-neuromediador e as alterações na expressão gênica [Zhuo, 2007]. Durante o estabelecimento do fenômeno de sensibilização central na dor neuropática, através do que chamamos de excitotoxicidade (toxicidade mediada pelo glutamato), ocorre morte de neurônios inibitórios. Isto contribui de forma significativa para a manutenção do quadro doloroso em longo prazo [Zhuo, 2007].

Recentemente, estudos tem demonstrado o papel das células gliais nos mecanismos de transmissão e manutenção da dor, principalmente em se tratando de dor crônica de origem neuropática [Gao e Ji, 2010, ; Gosselin et al., 2010]. Em vista disso, as células gliais, predominantemente os astrócitos espinhais, estão relacionados ao estímulo doloroso prolongado devido a sua associação com os sistemas purinérgico e glutamatérgico conforme demonstrado em estudos prévios [Ohara et al., 2009; Sweitzer e De Leo, 2011].

I.1.e. Dor - mediadores químicos

Os mediadores químicos são responsáveis pela multiplicidade e complexidade de eventos que ocorrem durante a transmissão dolorosa periférica e central, por ação direta ou indireta [Fürst, 1999; Millan, 1999]. Os principais mediadores químicos envolvidos nestes processos são: prostaglandinas, leucotrienos, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), purinas (ATP), noradrenalina, serotonina, dopamina, óxido nítrico, cininas, taquicinas, substância P, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo vasoativo intestinal, citocinas, fatores tróficos neurais, entre outros [Millan, 1999]. Dentre os principais mediadores químicos relacionados à transmissão e manutenção da dor, abordaremos apenas os mais relevantes e envolvidos diretamente na realização desta tese. São eles: glutamato e as purinas. Considerando que a presente tese enfatiza revisar a influência do sistema purinérgico nos mecanismos de transmissão dolorosa, as substâncias derivadas deste sistema (purinas) serão abordadas em item à parte posteriormente.

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no SNC de humanos e mamíferos em geral [McLennan e Liu, 1982]. Baseados em estudos de biologia molecular e eletrofisiologia, de especificidade para agonistas e antagonistas e de acoplamento com sistemas de segundos mensageiros, receptores glutamatérgicos podem ser classificados em dois grandes grupos: ionotrópicos e metabotrópicos. Receptores ionotrópicos são canais iônicos modulados por agonistas (NMDA, AMPA, cainato); receptores metabotrópicos são acoplados a sistemas de segundos mensageiros através de proteínas G [Danbolt, 2001; Bleakman et al., 2006]. Descrições completas dos receptores envolvidos com a transmissão glutamatérgica estão amplamente divulgadas na literatura [Ozawa et al., 1998; Bleakman et al., 2006; Neugebauer, 2007].

A ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos por glutamato, aspartato ou agonistas dos receptores, podem modular a atividade de várias enzimas (adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C) e fluxos iônicos transmembrana. A modulação destes efetores altera os níveis de segundos mensageiros específicos (AMPc, diglicerídios e fosfo-inositóis) e variações de níveis iônicos intracelulares, que especificam respostas celulares à ativação de receptores glutamatérgicos [Bleakman et al., 2006; Neugebauer, 2007].

Além disso, o glutamato tem demonstrado papel essencial na transmissão de estímulos dolorosos [Bleakman et al., 2006]. Novas evidências farmacológicas, eletrofisiológicas, e comportamentais têm surgido embasando a hipótese de que os receptores glutamatérgicos apresentam papel fundamental nas vias de dor e que modulação destes receptores pode ser terapêutica efetiva para tratamento de quadros dolorosos crônicos [Bleakman et al., 2006]. Os receptores AMPA e NMDA para glutamato têm sido implicados na geração de estados centrais de hipersensibilidade e potenciam a transmissão de estímulos nocivos [Millan, 1999]. Estudos têm demonstrado que os receptores glutamatérgicos estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da nocicepção [Coggeshall e Carlton, 1997; Bleakman et al., 2006]. Resumidamente, o estímulo nocivo ocorre na periferia e desencadeia um potencial de ação transmitido até sinapses centrais no corno dorsal da medula espinhal. Este potencial de ação desencadeia a liberação de neurotransmissores excitatórios, primariamente o glutamato e secundariamente o aspartato, conhecidos como aminoácidos excitatórios. A frequência e a duração dos estímulos conduzidos até a medula espinhal determinam fenômenos de nocicepção com finalidade biológica (protetora) ou sua transformação em estados patológicos (dor persistente ou crônica).

Neste contexto, substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos [Wiech et al., 2004]. Antagonistas dos receptores de glutamato como cetamina e MK-801 podem atenuar estados dolorosos relacionados à reação inflamatória, dano tecidual agudo, isquemia ou dano nervoso [Wiech et al., 2004]. Entretanto, a grande limitação para o seu uso clínico são os efeitos adversos intoleráveis que muitos destes fármacos acarretam como sedação, disforia, alucinações, distúrbios motores, entre outros [Gardoni e Di Luca, 2006]. Portanto, a busca por novos fármacos que modulem a atividade glutamatérgica anormal e apresente menor perfil de efeitos adversos é constante.

I.1.f. Dor patológica: dor crônica neuropática

A definição de dor neuropática é a de dor decorrente de lesão ou disfunção do nervo como consequência de lesão ou doença do sistema somestésico [Zimmermann, 2001]. Apresenta um mecanismo biológico pouco esclarecido, envolvendo diversos mediadores químicos e imunes [Campbell e Meyer, 2006]. Apesar dos mecanismos desencadeadores da dor neuropática ainda não estarem completamente esclarecidos, excitabilidade aumentada, vias inibitórias com atividade reduzida e neuroplasticidade com mudança fenotípica na organização celular, estão envolvidos em alterações medulares após lesão nervosa. Em virtude disso, ocorre a produção e liberação de mediadores químicos, que desencadeiam uma cascata de eventos que mantem o potencial de ação. Por tratar-se de um evento crônico, uma das principais características desta doença é a ocorrência de eventos neuroplásticos relacionados a alterações gênicas de receptores, neurotransmissores e neuromoduladores,

canais iônicos, proteínas intracelulares, entre outras [Woolf e Thompson, 1999; Willis, 2001; Binns et al., 2005; Zhuo, 2007].

Após ativação suficientemente intensa e persistente de receptores AMPA, inicia-se a ativação de receptores NMDA com aumento do influxo de íons cálcio. No início do processo de sensibilização central, os interneurônios inibitórios, com a liberação dos neurotransmissores GABA e glicina, ainda permanecem ativos e modulam negativamente a dor. Durante o estabelecimento do fenômeno de sensibilização central, através do que chamamos de excitotoxicidade (toxicidade mediada pelo glutamato), ocorre morte de neurônios inibitórios. Isto contribui de forma significativa para a manutenção do quadro doloroso em longo prazo. Após este processo inicial, sinapses aberrantes ocorrem na medula (neuroplasticidade e memória de dor). Estas sinapses, somadas a perda de neurônios inibitórios, desencadeiam a amplificação do processo doloroso que se torna, em muitas ocasiões, espontânea [Gold, 2000; Zhuo, 2007]. Neste momento, tratar a dor que resulta deste evento torna-se tarefa difícil e muitos casos são refratários aos tratamentos existentes na atualidade.

Existem diversos modelos animais de dor neuropática descritos na literatura, a maioria deles foi desenvolvida em ratos a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas: ligadura do nervo espinhal, ligadura parcial do nervo ciático, lesão constritiva crônica do nervo ciático, lesão limitada do nervo tibial e fibular, lesão do plexo braquial, entre outros modelos de lesão nervosa direta ou indireta [Le Bars et al., 2001]. Outros métodos incluem a injeção intraperitoneal de estreptozocina para mimetizar neuropatia diabética ou de quimioterápicos (paclitaxel ou vincristina) para mimetizar neuropatia induzida por quimioterapia. Os modelos para dor central utilizam a contusão (trauma utilizando a força do impacto com deslocamento tissular), ou lesões isquêmicas por

compressão lenta por meio de pinçamento ou da insuflação com balonetes [Le Bars et al., 2001]. Métodos citotóxicos empregam a injeção de análogos de glutamato ou de substâncias que permitem a lesão de locais específicos do SNC. As técnicas descritas visam a provocar hiperalgesia mecânica e térmica e apresentam boa correlação com as alterações fenotípicas (clínicas e neuroquímicas) desenvolvidas em humanos [Le Bars et al., 2001; Campbell e Meyer, 2006].

Entender a neurobiologia da dor neuropática é um passo para melhoria dos resultados no tratamento dessa síndrome. Essa compreensão poderá resultar na elaboração de fármacos que visem a alvos específicos e que proporcionem respostas eficazes.

I.1.g. O sistema purinérgico: Papel na transmissão dolorosa

O sistema purinérgico é composto pelas bases purínicas, como adenina e guanina, e seus derivados nucleotídeos e nucleosídeos, que são moléculas amplamente distribuídas dentro e fora das células de organismos vivos. Essas moléculas são responsáveis por atuar em diversas funções biológicas, como na construção do DNA e RNA (adenina e guanina), nas vias bioquímicas envolvidas no metabolismo energético celular (ATP) e nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal como mensageiros secundários (AMPc e GMPc) [Bourne et al., 1990; Barnstable et al, 2004]. Contudo, nos últimos 20 anos, diversos trabalhos demonstraram o papel fundamental destas moléculas no espaço extracelular sobre a homeostase [Burnstock, 2007].

As purinas podem ser classificadas em derivados da adenina (ATP, ADP, AMP, adenosina, adenina) e derivados da guanina (GTP, GDP, GMP, guanosina e guanina), além dos metabólitos diretos destes derivados, como a inosina, a xantina, a hipoxantina e o ácido

úrico. Os derivados da adenina, principalmente o nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina são considerados os principais efetores do sistema purinérgico em nível extracelular [Ralevic e Burnstock, 1998]. O papel do ATP como neurotransmissor, em nível central e periférico, está amplamente estabelecido [Ralevic e Burnstock, 1998], ele é armazenado e liberado de terminais pré-sinápticos e age em receptores do tipo P₂. [Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2007]. A adenosina também possui efeitos neuromodulatórios amplamente reconhecidos e caracterizados, assim como seus substratos [Brundege e Dunwiddie, 1997]. Além disso, as purinas, principalmente a adenosina, são importantes moduladoras da atividade sináptica no sistema nervoso central, interagindo com vários sistemas, como glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico [Schmidt et al., 2007; Rathbone et al., 2008].

Na transmissão dolorosa, a adenosina e o ATP exercem múltiplas influências em sítios periféricos e centrais [Sawynok, 1998; Sawynok et al., 1999; Sawynok e Liu, 2003]. Efeitos antinociceptivos da adenosina estão relacionados à inibição intrínseca de neurônios pelo aumento da condutância ao K⁺ e inibição pré-sináptica dos terminais nervosos sensoriais, diminuindo a liberação de substância P e glutamato [Sawynok e Liu, 2003]. Adenosina, através de sua ação agonista em receptores A₁, atenua produção de óxido nítrico mediado pelo receptor glutamatérgico NMDA e está diretamente relacionada a analgesia opióide [Sawynok e Liu, 2003].

O ATP é um neurotransmissor clássico, mas também é liberado por células não-neuronais e tecido lesado. Age em receptores purinérgicos específicos (P₂), que podem ser subdivididos em P₂X e P₂Y que são acoplados, respectivamente, à proteína G e aos canais iônicos [Burnstock, 2007]. Em modelos experimentais de dor neuropática, há redução (após axotomia ou ligadura parcial do nervo) ou aumento (lesão constritiva crônica) de receptores

P₂X₃; contudo, mesmo na redução, há aumento da sensibilidade desses receptores [Jarvis et al., 2002]. O bloqueio de receptores P₂X₃ atenua a alodinia térmica e mecânica em ratos [Jarvis et al., 2002]. Os receptores P₂X₄ também aumentam sua expressão na microglia após a lesão de nervo e o bloqueio farmacológico do P₂X₄ reverte a alodinia [Tsuda et al., 2003]. Os receptores P₂X₇ estão presentes nas células T e macrófagos. Ratos que não expressam este receptor são resistentes ao desenvolvimento de dor neuropática [Chessell et al., 2005]. Por outro lado, os receptores P₂Y₁ aumentam em 70% após lesão do nervo ciáticos em ratos, e também podem estar relacionados ao desenvolvimento de quadros dolorosos [Xiao et al., 2002].

Contudo, ainda não existem fármacos que interajam diretamente com os receptores purinérgicos para uso clínico. A avaliação do potencial do sistema purinérgico na modulação da dor é de grande importância, já que encontram-se disponíveis para uso clínico fármacos que modulam a atividade da adenosina, como o alopurinol. O alopurinol é um inibidor da xantina oxidase, enzima responsável pela conversão de xantina em ácido úrico, passo final na degradação de purinas (que inclui a adenosina) [Day et al., 2007]. Em virtude disso, ocorre acúmulo de hipoxantina e xantina, além de seus respectivos substratos, adenosina e guanosina, e há redução do produto final ácido úrico, sendo por isso usado para o tratamento da hiperuricemia [Day et al., 2007]. Portanto, o alopurinol trata-se de um fármaco comercialmente distribuído, com perfil de segurança comprovado, e que pode ser um novo alvo de tratamento adjuvante a pacientes com dor crônica, pois causa aumento nos níveis plasmáticos e líquidos de guanosina e adenosina, importantes neuromoduladores com potencial antinociceptivo [Marro et al., 2006]. Este potencial do sistema purinérgico em modular a transmissão dolorosa foi uma das abordagens nesta tese e será descrita em detalhes posteriormente.

I.2. OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

Os trabalhos realizados na presente tese de doutorado foram divididos em dois conjuntos: os experimentais com animais e os trabalhos com humanos. Os objetivos gerais e específicos de cada uma destas partes estão expostos a seguir. A importância e o embasamento destes objetivos podem ser encontrados no capítulo de introdução desta tese.

I.2.a. TRABALHOS EXPERIMENTAIS COM MODELOS ANIMAIS

Objetivo geral: investigar os potenciais efeitos antinociceptivos dos derivados da guanina e da adenina em modelos animais de dor.

Objetivos específicos:

- investigar os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva dos derivados da guanina e da adenina.
- investigar a interação entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico na transmissão da dor.
- investigar a presença e a função dos integrantes do sistema purinérgico no líquido cefalorraquidiano de animais.
- investigar os efeitos antinociceptivos de análogos de purinas em animais.

I.2.b. TRABALHOS EXPERIMENTAIS COM MODELOS HUMANOS

Objetivo geral: investigar o efeito analgésico do alopurinol, inibidor da xantina oxidase, em pacientes submetidos à histerectomia abdominal total.

Objetivos específicos:

- avaliar por escalas de dor o efeito analgésico do alopurinol em pacientes submetidos a histerectomia abdominal.
- avaliar o efeito ansiolítico do alopurinol em pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico.
- investigar a concentração das purinas no líquido cefalorraquidiano dos pacientes submetidos a histerectomia abdominal e tratados com alopurinol.

PARTE II

Onde os resultados são apresentados.

II.1. RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM MODELOS ANIMAIS

II.1.a. Mechanisms involved in the antinociception induced by spinal administration of inosine or guanine in mice

European Journal of Pharmacology 2016; 772:71-82.

II.1.b. The antinociceptive effects of guanosine in inflammatory and neuropathic pain model

The antinociceptive effects of guanosine in inflammatory and neuropathic pain models.

Enderson O. Dias¹, Aécio C. Fagundes¹, Gisele Hansel¹, Jean P. Oses², Lisiane O. Porciúncula¹, Luís V. Portela¹, Elaine Elisabetsky³, Diogo O. Souza¹, André P. Schmidt^{1,4,5}(✉).

¹Department of Biochemistry, Institute of Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde e Hospital Universitário São Francisco de Paula, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. ³Department of Pharmacology, Institute of Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴Department of Anaesthesia and Perioperative Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵Division of Anaesthesia, Department of Surgery, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

(✉) André P. Schmidt, MD, PhD

Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Zip code: 90035-003

Porto Alegre - RS - Brazil

Phone: (55-51) 33085558 / 33085559

Fax: (55-51) 33085540 / 33085535

E-mail: aschmidt@ufrgs.br

Abstract:

Background and purpose: It is well known that adenine-based purines exert multiple effects on pain transmission. However, less attention has been given to the potential effects of guanine-based purines on pain transmission. The aim of this study was to investigate the effects of systemic administration of guanosine in inflammatory and neuropathic pain animal models.

Experimental approach: Mice received an intraperitoneal administration of vehicle (0.1 mN NaOH) or guanosine (30, 60 or 120 mg.kg⁻¹) and were evaluated in several inflammatory and neuropathic pain models.

Key results: Guanosine produced dose-dependent antinociceptive effects against the thermal and mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model. However, guanosine was ineffective in inflammatory pain models.

Conclusions and implications: This study has demonstrated antinociceptive effects of systemic administration of guanosine in a neuropathic pain model, complementing previous data on thermal and chemical pain models. These findings indicate that guanosine could be a useful drug for managing chronic neuropathic pain, but it is probably ineffective against inflammatory pain.

Keywords: Guanosine; Purines; Neuropathic Pain; Inflammation; Antinociception; Adenosine.

1. Introduction:

It is well known that the purinergic system, including ATP and its metabolite adenosine, plays a relevant physiological role in the control of pain at the peripheral and central nervous system (CNS) (Sawynok and Liu, 2003). ATP can stimulate sensory nerve endings causing pain and, by acting via P₂ receptors, is involved in the initiation of acute, inflammatory, neuropathic, and visceral pain (Burnstock, 2007). Endogenous ATP and its receptor system are crucial for the development of pathologic pain states, particularly in neuropathic pain, since it modulates excitatory (glutamatergic) and inhibitory (GABAergic and glycinergic) neurotransmission in dorsal horn neurons (Inoue et al., 2005). Adenosine can alter pain transmission by actions on both nociceptive afferent and transmission neurons, and these actions are mediated primarily by adenosine A₁ receptors (Sawynok and Liu, 2003). Additionally, adenosine A_{2A}, A_{2B}, and A₃ mediate actions on inflammatory cells at peripheral sites (Fredholm, 1997) and on glia in the CNS (Gebicke-Haerter et al., 1996), producing indirect effects on pain transmission (Sawynok and Liu, 2003).

Extracellular guanine-based purines (GBPs) exert biological effects unrelated to direct G-proteins modulation, including the modulation of glutamate activity (Souza and Ramirez, 1991; Schmidt et al., 2007). We demonstrated that intracerebroventricular injection of guanosine or GMP is antinociceptive against several chemical and thermal pain models in mice (Schmidt et al, 2008). Additionally, we have shown that spinal administration of guanosine and its derivatives produce significant inhibition of glutamate and non-NMDA agonist-induced biting behavior (Schmidt et al, 2009; De Oliveira et al., 2016). Notably, some of these effects appear to be related to guanosine-induced modulation of the glutamatergic and adenosinergic pathways (Schmidt et al, 2007; Souza and Ramirez, 1991; De Oliveira et al., 2016).

This study was designed to further investigate the antinociceptive effects of intraperitoneal administration of guanosine in mice models of inflammatory and neuropathic pain. Attempts have been made to investigate some of the possible mechanisms that underlie the antinociceptive action of guanosine.

2. Material and methods:

2.1. Animals

Male adult Swiss albino mice (30–40 g) were kept on a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 am) at temperature of 22 ± 1 °C housed in plastic cages (five per cage) with tap water and commercial food ad libitum. In all nociceptive behavioral experiments, the animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing. The ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010) were followed throughout. The number of animals and the number of intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

2.2. Drugs

Guanosine, complete Freund's adjuvant (CFA) and carrageenan, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The anesthetic sodium thiopental was obtained from Cristália (SP, Brazil). Guanosine was dissolved in 0.1 mN NaOH (30, 60 and 120 mg·kg⁻¹). The amount of NaOH caused no detectable effect.

2.3. Partial sciatic nerve ligation model (PSNL)

Mice were anesthetized intraperitoneally (i.p.) with sodium thiopental (40 mg.kg⁻¹, 10 ml.kg⁻¹, supplemented as necessary). A partial ligation of the right sciatic nerve was performed by tying the distal 1/3 to 1/2 of the dorsal portion of the sciatic nerve, according

to the procedure described in mice by Malmberg and Basbaum (1998). The left sciatic nerve was dissected and exposed without ligation. The wound was closed and covered with iodine solution. The operated mice received guanosine (30, 60 or 120 mg·kg⁻¹, i.p.) or vehicle (0.1 mM NaOH, 10 ml·kg⁻¹, i.p.) 14 days after surgery and 30 minutes before the Plantar Test (designed to evaluate thermal hyperalgesia). The mechanical hypernociceptive responses were recorded immediately before (0) and after (1, 2, 4, 6, 8 and 24 h) treatment.

2.4. CFA-induced inflammation and mechanical hyperalgesia in the mouse paw

Mice were injected with 20 µl of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (Mycobacterium tuberculosis; Sigma, St. Louis, MO. USA) subcutaneously in the plantar surface of the right hindpaw (i.pl.) (Ferreira et al., 2001). The dose of CFA produces significant hindpaw swelling and hypernociception. To assess the effects of acute treatment of the guanosine against CFA-induced inflammatory pain, animals received guanosine (30, 60 and 120 mg·kg⁻¹, i.p.) or vehicle, 30 minutes before CFA intraplantar injection. Development of mechanical hypernociception was evaluated at 0 (basal), 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h after treatment to verify the time-course effect of guanosine in inhibiting the hypernociceptive responses (Bortalanza et al., 2002).

2.5. Carrageenan-induced inflammation and mechanical hyperalgesia in the mouse paw

For the induction of inflammatory pain, mice received an i.pl. injection of 50 µl of carrageenan (300 mg/paw) under the surface of the right hindpaw (Da Silva et al., 2012). To assess the systemic effect of drug treatment, mice received guanosine (30, 60 or 120 mg·kg⁻¹, i.p.) or vehicle, 30 minutes before carrageenan injection. The development of mechanical hyperalgesia was evaluated at 0 (basal), 1, 2, 4, 6 and 8 h after guanosine treatment.

2.6. Behavioral pain-related parameters

2.6.1. Plantar Test (Thermal Hyperalgesia)

Thermal hyperalgesia was evaluated by the paw withdrawal test (Hargreaves et al., 1988). Operated animals were maintained in the animal facility for at least 2 weeks before the experiments, with food and water ad libitum. On the day of the experiment, animals were placed in transparent plastic chambers on an elevated glass floor of the testing apparatus (7370 Plantar Test, Ugo Basile, Varese, Italy) and allowed to acclimate to their surroundings for 20 minutes. After acclimation, a radiant heat source (50-W halogen reflector bulb with intensity controlled by a constant voltage source) was aimed at the plantar surface of 1 of the hind paws through the glass floor. A photoelectric cell automatically turns the heat source off when the reflected light beam is interrupted (ie, when the animal withdraws the paw) and records the paw withdrawal latency at the nearest 0.1 second. A time limit of 30 seconds was used to prevent tissue damage. Both paws were tested at random, and a 1-minute interval between consecutive stimulations of the same hind paw was used. Testing was performed 5 times on each side, and the latencies to each side were averaged. Average values were used for statistical analysis. A score was computed by subtracting the average latency of the sham-operated side (control side) from the average latency of the ligated side (experimental side). Negative difference scores indicated a lower threshold on the ligated side. Only animals displaying negative scores < 2 standard deviations were considered neuropathic and were included in the tests. Although there is strong evidence that the experimental neuropathy produces allodynia, heat-induced hyperalgesia is considered the most accurate method to evaluate neuropathy in this context (Bennett and Xie, 1988 and Hargreaves et al, 1988). Consequently, in the present study, thermal hyperalgesia was considered as the main parameter to evaluate neuropathic pain.

2.6.2. Measurement of mechanical allodynia

For the evaluation of mechanical allodynia, mice were placed individually in clear Plexiglas boxes (9 X 7 X 11 cm) on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the right hindpaw. The withdrawal response frequency was measured following 10 applications (duration of 1 s each) of 0.6 g von Frey hair (VFH, Stoelting, Chicago, IL, USA) (Bortalanza et al., 2002). Stimuli were delivered from below to the plantar surface of the right hindpaw. Animals were acclimatized for 30 min before behavioral testing and mechanical allodynia was evaluated at several time points. The frequency of withdrawal was determined before all experiments.

2.7. Cerebrospinal fluid (CSF) sampling

A separated group of mice was treated with i.t. injection of vehicle (30 mN NaOH) or guanosine (up to 120 mg.kg⁻¹). After 5 min, mice were anesthetized with sodium thiopental (60 mg.kg⁻¹, 10 ml.kg⁻¹, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus, where the CSF was drawn (10 - 20 ml per mouse) by direct puncture of the *cisterna magna* with an insulin syringe (27 gauge x ½ in length), with the help of a magnifying glass. All samples were centrifuged at 10,000 g in an Eppendorf centrifuge during 5 min to obtain cell-free supernatants and stored in separate tubes in -80°C.

2.8. High-performance liquid chromatography (HPLC) procedure

HPLC was performed with CSF cell-free supernatants aliquots for determination of purines concentration, according to Domanski et al. (2006). CSF concentrations of the following purines were determined: adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine, guanosine triphosphate (GTP), guanosine diphosphate (GDP), guanosine monophosphate (GMP), guanosine, inosine monophosphate (IMP), inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid. Analyses were

performed with Shimadzu Class-VP chromatography system consisting of a quaternary gradient pump with vacuum degassing and piston desalting modules, Shimadzu SIL-10AF auto injector valve with 50 μ l loop, and an UV detector. Separations were achieved on a Supelco C18 250 mm x 4.6 mm, 5 mm particle size column. The mobile phase flowed at a rate of 1.2 ml/min and the column temperature was 24 °C. Buffer composition remained unchanged (A: 150 mmol/l phosphate buffer, pH 6.0, containing 150 mmol/l potassium chloride; B: 15% acetonitrile in buffer A). The gradient profile was modified to the following content of buffer B in the mobile phase: 0% at 0.00 min, 2% at 0.05 min, 7% at 2.45 min, 50% at 10.00 min, 100% at 11.00 min, and 0% at 12.40 min. Samples of 10 ml were injected into the injection valve loop. Absorbance was read at 254 nm. CSF concentrations of purines are expressed as mean \pm SEM in mM.

2.9. Statistical analysis

Numerical variables were given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were submitted to Shapiro-Wilk test for normality evaluation. One-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis tests were used for analysis between groups at each time-point for parametric and nonparametric continuous data, respectively. When differences were found, Bonferroni's multiple comparison test or Mann Whitney's test with correction for multiple comparisons were applied. For longitudinal analyses, we used two-way ANOVA. Correlation analyses were performed using Pearson's or Spearman's rank sum correlation. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using STATA 12.0.

3. Results

3.1. Effects of guanosine against thermal and mechanical hyperalgesia induced by PSNL (neuropathic pain)

To evaluate the effect caused by guanosine on the neuropathic pain, we performed a chronic sciatic nerve constriction in mice. This injury produced marked allodynia and hyperalgesia on the ipsilateral side two weeks after the nerve injury procedure compared with sham animals (data not shown). The acute systemic treatment with guanosine (30, 60, or 120 mg.kg⁻¹) dose-dependently reduced thermal hyperalgesia on the ipsilateral side of the sciatic nerve constriction injury 30 minutes after drug administration ($P < 0.05$, Fig. 1). Administration of 0.1 mM NaOH (vehicle) did not affect nociception as compared with control animals (data not shown).

Pretreatment with guanosine induced a marked and long-lasting inhibition of response frequency to the von Frey hair application (mechanical hyperalgesia) in the PSNL model up to 8 hours following treatment (Fig. 2).

3.2. Effects of guanosine against CFA-induced mechanical hyperalgesia

The intraplantar injection of CFA induced a marked and long-lasting enhancement of response frequency to the von Frey hair application and decreased the latency to paw withdrawal during a thermal stimulus in comparison to non-injured mice (Fig. 3). The intraperitoneally injection pretreatment with 30, 60, or 120 mg.kg⁻¹ of guanosine did not affect mechanical hyperalgesia induced by CFA (Fig. 3).

3.3. Effects of guanosine against carrageenan-induced mechanical hyperalgesia

To investigate the role of guanosine in an inflammatory model of pain, we subjected mice to a model of acute inflammatory pain induced by a single i.pl. injection of

carrageenan (300 mg/paw) in the mice paw. A rapid induction of mechanical hyperalgesia was observed in the carrageenan treated animals when compared with the control group. As observed in Fig. 4, a single intraperitoneal injection of guanosine (up to 120 mg.kg⁻¹) did not affect mechanical hyperalgesia induced by carrageenan.

3.4. Effects of guanosine on CSF levels of purines

As evidenced in the table 1, systemic administration of guanosine (60 or 120 mg.kg⁻¹) produced a significant increase in guanosine CSF levels. Intraperitoneal administration of guanosine 60 or 120 mg.kg⁻¹ produced an increase of 56% and 68% in guanosine CSF levels, respectively. Guanosine 30 mg.kg⁻¹ produced an increase of 26% in guanosine CSF levels, but it was not statistically significant ($P = 0.09$). Moreover, guanosine did not significantly affect inosine, xanthine, hypoxanthine, uric acid, adenosine, ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP and IMP CSF levels (Table 1).

4. Discussion

In this study we have reported consistent antihyperalgesic effects of the guanosine against neuropathic pain in a mouse model. However, guanosine did not affect inflammatory pain in mice. Therefore, the present findings might represent different profiles in the regulation of purines receptors expression. Notably, our results show that guanosine did not induce obvious behavioral disturbances, altered coordination or locomotion, consistent with previous data (Vinadé *et al.*, 2003).

Adenosine-derived purines have been considered important targets for the development of new drugs for pain management, as the nucleoside adenosine and its analogues induce antinociceptive effects following both systemic and central administration (Sawynok and Liu, 2003). Considering that guanosine and adenosine closely interact in

modulating several CNS functions (Dobolyi *et al.*, 2000), we proposed that guanosine might well play a role in pain transmission. Recently, we demonstrated that central and systemic administration of some guanine-based purines produced consistent antinociceptive effects in several animal pain models (Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2016). We also demonstrated that GMP-induced antinociception was prevented by the 5'-nucleotidase inhibitor AOPCP, suggesting that its effects result from conversion to guanosine. In the present study, the role of systemic administration of guanosine on nociception was further investigated against neuropathic and inflammatory pain models in mice.

Adenine- and guanine-based purines share some metabolism steps (i.e. nucleoside transporters and ecto-nucleotidases), and, consequently, may respond similarly in certain conditions (Ciccarelli *et al.*, 1999; 2001). Previous studies have suggested involvement of the adenosine system in the effects of guanosine, as guanosine stimulated the release of adenosine in cultured astrocytes and both are released under excitotoxic conditions (Ciccarelli *et al.*, 1999). In contrast, some other studies indicate that the guanosine-induced enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells was not affected by adenosine receptor antagonists (Gysbers and Rathbone, 1996), nor were the effects of guanosine on glutamate uptake (Frizzo *et al.*, 2001), seizures (Lara *et al.*, 2001), learning and memory (Roesler *et al.*, 2000; Vinadé *et al.*, 2004).

There is data supporting the existence of specific receptor-like binding sites for guanosine on membrane preparations from rat brain (Traversa *et al.*, 2002; 2003). If so, it is arguable that guanosine through its specific binding site, could promote its extracellular effects by activating intracellular cAMP-dependent and independent pathways (Tomaselli *et al.*, 2005). Additionally, guanosine could act as an alternative source of energy for neural

cells after metabolism, as previously demonstrated in spinal cord cultures (Jurkowitz *et al.*, 1998; Litsky *et al.*, 1999). However, intracellular mechanisms underlying guanosine antinociceptive effects remain to be investigated.

Previous data showed that intracerebroventricular (Schmidt *et al.*, 2008), spinal (Schmidt *et al.*, 2009) and systemic administration of guanosine (Schmidt *et al.*, 2010) failed to increase cerebrospinal fluid adenine-based purines levels. In the present study, we demonstrated that the systemic administration of guanosine 60 or 120 mg.kg⁻¹ caused a significant increase in the CSF levels of guanosine. This finding may be related to analgesic effect against neuropathic pain. Intraperitoneal administration of guanosine did not significantly affect CSF levels of other adenine- and guanine-based purines.

It is well known that activation of A₁ adenosine receptors, widely distributed in superficial layers of the dorsal spinal cord and afferent terminals of nociceptors, causes antinociception following nerve injury and inflammation, and decreases C fiber-driven responses in dorsal horn neurons (Reeve and Dickenson, 1995; Schulte *et al.*, 2003). However, the role of A_{2A} adenosine receptors, present on spinal presynaptic terminals of sensory afferents, for pain processing is less clear. Recent studies have demonstrated that A_{2A} adenosine receptors may also be involved in the modulation of pain transmission (Poon and Sawynok, 1998; Yoon *et al.*, 2005). However, controversy remains about the role of A_{2A} adenosine receptors on pain transmission, as other studies found opposing effects (Ledent *et al.*, 1997; Bastia *et al.*, 2002; Zahn *et al.*, 2007). Further studies about the actual role of A_{2A} adenosine receptors on pain transmission, and the molecular mechanisms involved on guanosine-induced antinociception (i.e. direct or indirect activation of adenosine receptors and/or guanosine specific receptors) are needed to

elucidate these issues. Schmidt et al., 2010 demonstrated that guanosine-induced analgesia involves adenosine receptors. More recently, we demonstrated that antinociceptive effects induced by spinal administration of guanine seems to be mediated by A₁ receptors (De Oliveira et al., 1016).

In summary, this study demonstrates consistent antinociceptive effects of systemic guanosine against neuropathic pain in mice. This analgesic effect was not replicated in inflammatory pain models. Because guanosine is an endogenous compound apparently well tolerated and orally active, it could eventually be developed as a drug useful for managing neuropathic pain. Ongoing experiments on the antinociceptive effects of guanosine and the mechanisms underlying these effects may provide additional data on the potential of guanosine as a new analgesic strategy.

References

1. Bastia E, Varani K, Monopoli A, Bertorelli R (2002). Effects of A₁ and A_{2A} adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. *Neurosci Lett* 328: 241–244.
2. Bennett G.J., Xie Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
3. Bortalanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 25, 203–208.
4. Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.

5. Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli F et al. (2001). Involvement of astrocytes in purine- mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci* 19: 395–414.
6. Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'Alimonte I, Ballerini P, Caciagli F et al. (1999). Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93–98.
7. Da Silva K.A.B.S., Manjavachi M.N., Paszcuk A.F., Pivatto M., Viegas C.Jr., Bolzani V.S., Calixto J.B., 2012. Plant derived alkaloid ()-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology* 62(2):967-77.
8. De Oliveira E.D., Schallenberger C., Böhmer A.E., Hansel G., Fagundes A.C., Milman M., Silva M.D.P., Osés J.P., Porciúncula L.O., Portela L.V., Elisabetsky E., Souza D.O., 9. Schmidt A.P., 2016. Mechanisms involved in the antinociception induced by spinal administration of inosine or guanine in mice. *Eur J Pharmacology* 772:71-82.
10. Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, Nyitrai G, Kekesi KA, Juhasz G (2000). Sustained depolarisation induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem Int* 37: 71–79.
11. Domanski L, Sulikowski T, Safranow K, Pawlik A, Olszewska M, Chlubek D *et al.* (2006). Effect of trimetazidine on the nucleotide profile in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharm Sci* 27: 320–327.
12. Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41, 1006–1012.
13. Fredholm B.B., 1997. Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol.* 28:345-350.

14. Frizzo MES, Lara DR, Dahm KCS, Prokopiuk AS, Swanson R, Souza DO (2001). Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12: 879–881.
15. Gebicke-Haerter P.J., Christoffel F., Timmer J., Northoff H., Berger M., Van Calker D., 1996. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int.* 29:37-42.
16. Gysbers JW, Rathbone MP (1996). Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. *Neurosci Lett* 220: 175–178.
17. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
18. Jurkowitz MS, Litsky ML, Browning MJ, Hohl CM (1998). Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. *J Neurochem* 71: 535–548.
19. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579.
20. Lara DR, Schmidt AP, Frizzo MES, Burgos JS, Ramirez G, Souza DO (2001). Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res* 912: 176–180.
21. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ et al. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388: 674–678.

22. Litsky ML, Hohl CM, Lucas JH, Jurkowitz MS (1999). Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during hypoxia. *Brain Res* 821: 426–432.
23. Malmberg A.B., Basbaum A.I., 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76(1-2):215-24.
- Poon A, Sawynok J (1998). Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. *Pain* 74: 235–245.
25. Reeve AJ, Dickenson AH (1995). The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 116: 2221–2228.
26. Roesler R, Vianna MR, Lara DR, Izquierdo I, Schmidt AP, Souza DO (2000). Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport* 11: 2537–2540.
27. Sawynok, J., Liu, X.J., 2003. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 69, 313–340.
28. Schmidt A.P., Böhmer A.E., Schallenberger C., Antunes C., Tavares R.G., Wofchuk S.T., Elisabethsky E. and Souza D.O., 2010. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. *British Journal of Pharmacology.* 159: 1247–1263
29. Schmidt A.P., Böhmer A.E., Schallenberger C., Antunes C., Pereira M.S., Leke R., Wofchuk S.T., Elisabethsky E., Souza D.O., 2009. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by guanosine in mice. *Eur J Pharmacol* 613:46-53.
30. Schmidt A.P., Böhmer A.E., Leke R., Schallenberger C., Antunes C., Pereira M.S., Wofchuk S.T., Elisabethsky E., Souza D.O., 2008 Antinociceptive effects of

intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: Evidences for the mechanism of action. *Brain Res* 1234:50-58.

31. Schmidt A.P., Lara D.R., Souza D.O., 2007. Proposal of a guanine- based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 116:401-416.

32. Schulte G, Robertson B, Fredholm BB, DeLander GE, Shortland P, Molander C (2003). Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience* 121: 907–916.

33. Souza D.O., Ramirez G., 1991. Effects of guanine nucleotides in kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum and cerebellum. *J Mol Neurosci* 3: 39-46.

34. Tomaselli B, Podhraski V, Heftberger V, Bock G, Baier-Bitterlich G (2005). Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 activation. *Neurochem Int* 46: 513–521.

35. Traversa U, Bombi G, Di Iorio P, Ciccarelli R, Werstiuk ES, Rathbone MP (2002). Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br J Pharmacol* 135: 969–976.

36. Vinadé ER, Izquierdo I, Lara DR, Schmidt AP, Souza DO (2004). Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiol Learn Mem* 81: 137–143.

37. Vinadé ER, Schmidt AP, Frizzo MES, Izquierdo I, Elizabetsky E, Souza DO (2003). Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res* 977: 97–102.

38. Yoon MH, Bae HB, Choi JI (2005). Antinociception of intrathecal adenosine receptor

subtype agonists in rat formalin test. *Anesth Analg* 101: 1417–1421.

39. Zahn PK, Straub H, Wenk M, Pogatzki-Zahn E (2007). Adenosine A1 but not A2a receptor agonist reduces hyperalgesia caused by a surgical incision in rats. *Anesthesiology* 107: 797–806.

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

Legends:

Figure 1: Effects of acute intraperitoneal administration of guanosine (30, 60, or 120 mg.kg⁻¹) or vehicle (0.1 mM NaOH) on thermal hyperalgesia induced by partial sciatic nerve injury in mice (plantar test). Animals were submitted to a chronic constriction injury model (PSNL). Symbols represent mean difference scores [i.e., latency to right hindpaw withdrawn (experimental side) – latency to left hindpaw withdrawn (control side), in seconds] and vertical bars represent SEM. Zero time represents the baseline before treatments. N = 12 – 14 animals per group. * = $P < 0.05$, comparing all treatment groups with vehicle; Kruskal-Wallis followed by Mann Whitney's test with correction for multiple comparisons.

Figure 2: Effects of intraperitoneal administration of guanosine (30, 60, or 120 mg.kg⁻¹) or vehicle (0.1 mM NaOH) on mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury in mice (von Frey test). Animals were submitted to a chronic constriction injury model (PSNL). Symbols represent response frequency to tactile stimuli and vertical bars represent SEM. Basal represents time before treatments. N = 12 – 14 animals per group. * = $P < 0.05$ (guanosine 120 mg.kg⁻¹ compared with vehicle); # = $P < 0.05$ (guanosine 60 or 120 mg.kg⁻¹

compared with vehicle); one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Figure 3: Effects of intraperitoneal administration of guanosine (30, 60, or 120 mg.kg⁻¹) or vehicle (0.1 mM NaOH) on mechanical allodynia induced by CFA injection in mice (von Frey test). Animals received an intraplantar injection of 20 µl of Complete Freund's Adjuvant (CFA) under the surface of the right hindpaw (i.pl.). Symbols represent response frequency to tactile stimuli and vertical bars represent SEM. Basal represents time before treatments. N = 12 – 14 animals per group. No statistically significant difference was detected among groups; one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Figure 4: Effects of intraperitoneal administration of guanosine (30, 60, or 120 mg.kg⁻¹) or vehicle (0.1 mM NaOH) on mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury in mice (von Frey test). Animals received an intraplantar injection of 50 µl of carrageenan (300 mg/paw) under the surface of the right hindpaw. Symbols represent response frequency to tactile stimuli and vertical bars represent SEM. Basal represents time before treatments. N = 12 – 14 animals per group. No statistically significant difference was detected among groups; one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Table 1: Effects of the intraperitoneal administration of vehicle (0.1 mN NaOH) or guanosine (30, 60 or 120 mg/kg⁻¹) on CSF purines concentration. N = 10 animals per group.

Data are mean \pm SEM. * = $P < 0.05$, # = $P < 0.001$, as compared with vehicle; one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Figure 1

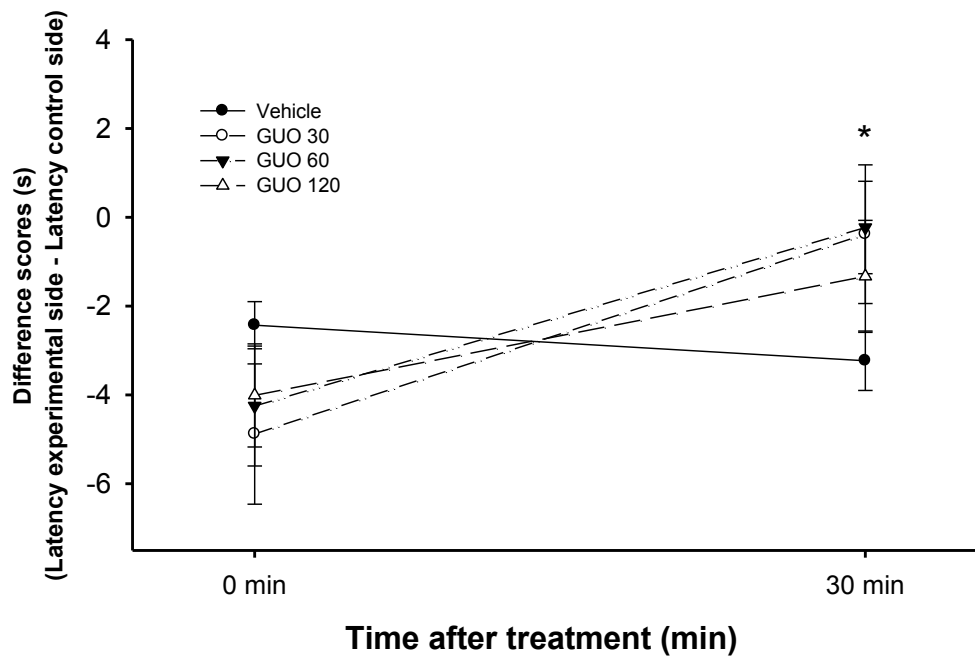


Figure 2

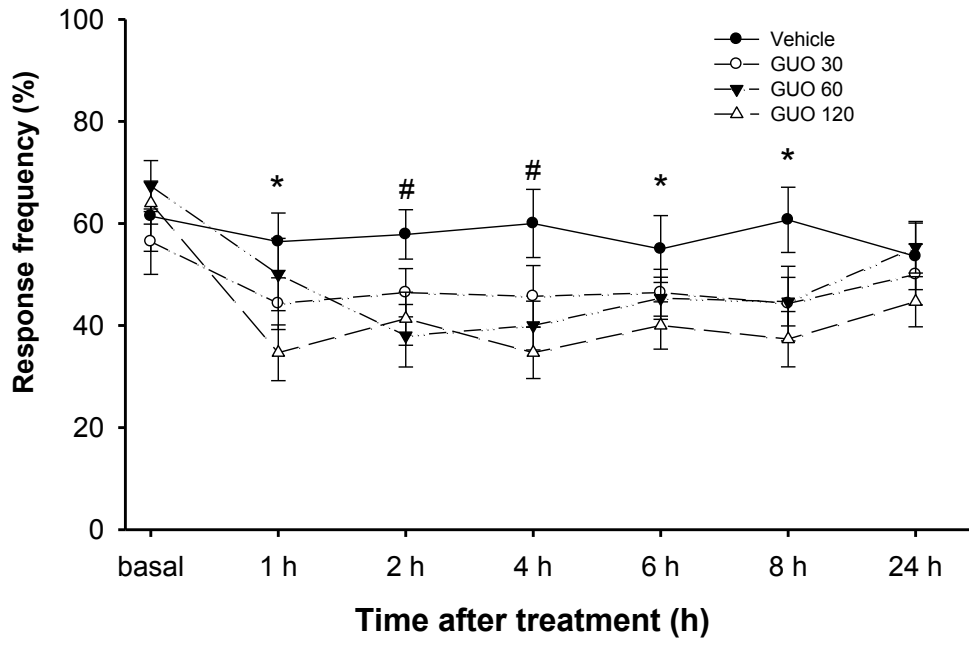


Figure 3

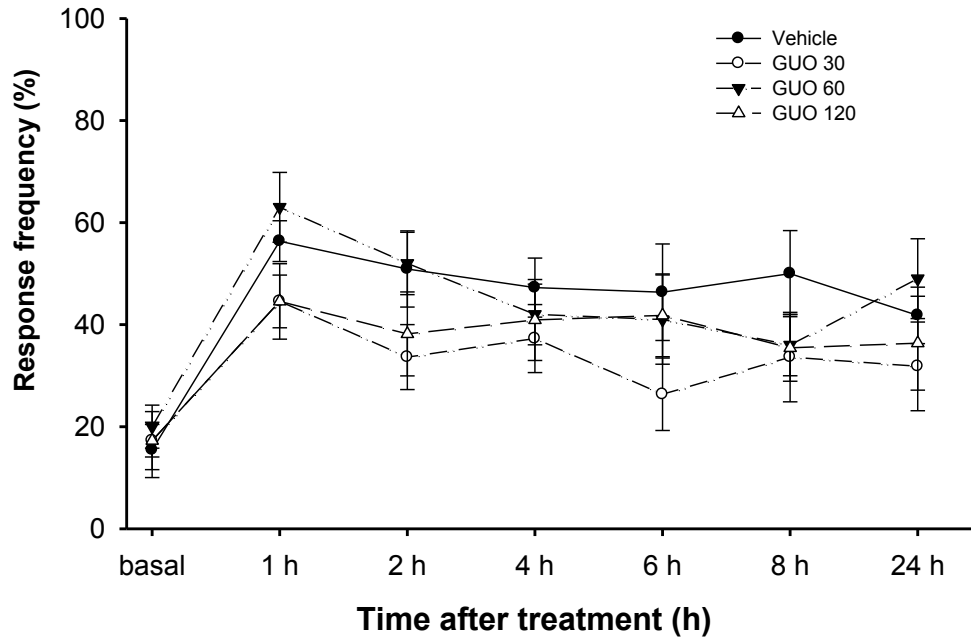


Figure 4

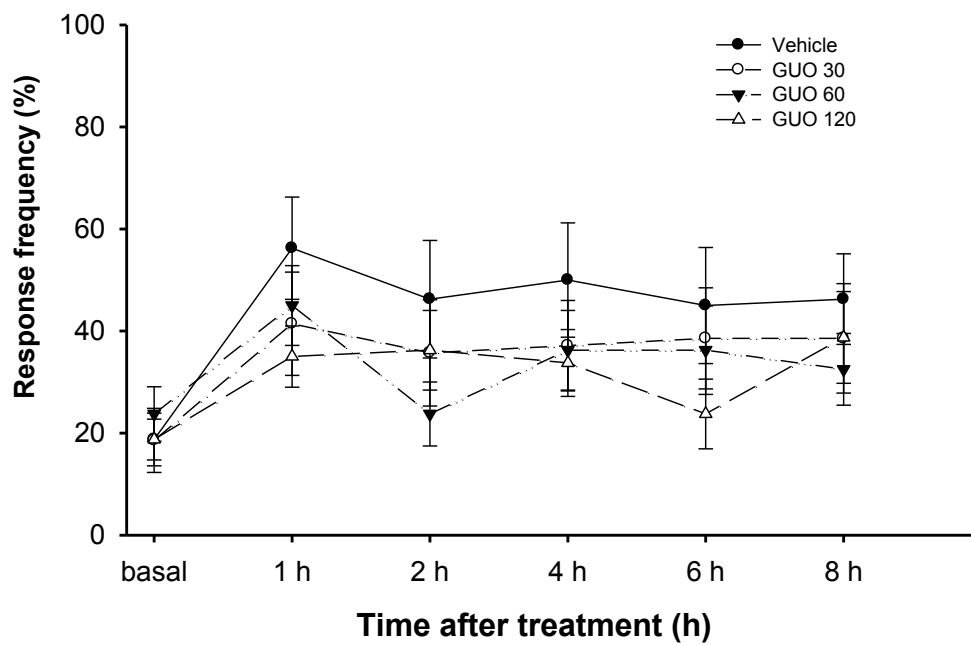


Table 1 – Effects of i.p. vehicle (0.1 mN NaOH) or guanosine (30, 60 or 120 mg/kg⁻¹) on CSF purines concentration.

| Treatment | Guanosine (mg/kg ⁻¹ , i.p.) | | | |
|--------------------------------|--|--------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0.1 mN NaOH | 30 | 60 | 120 |
| CSF purine concentration (mM): | | | | |
| ATP | 0.04 (0.03) | 0.05 (0.02) | 0.05 (0.02) | 0.14 (0.04) |
| ADP | 0.48 (0.18) | 0.66 (0.11) | 0.56 (0.12) | 0.79 (0.18) |
| AMP | 1.07 (0.24) | 0.51 (0.08) | 0.40 (0.09) | 0.66 (0.23) |
| Adenosine | 0.61 (0.03) | 0.48 (0.05) | 0.42 (0.06) | 0.35 (0.09) |
| GTP | 1.14 (0.03) | 0.99 (0.11) | 0.85 (0.14) | 0.81 (0.12) |
| GDP | 0.40 (0.07) | 0.41 (0.06) | 0.34 (0.08) | 0.37 (0.09) |
| GMP | 0.32 (0.29) | 0.35 (0.16) | 0.47 (0.21) | 0.91 (0.28) |
| Guanosine | 0.57 (0.12) | 0.72 (0.18)* | 0.89 (0.13) [#] | 0.96 (0.08) [#] |
| IMP | 1.55 (0.11) | 1.52 (0.17) | 1.29 (0.18) | 0.99 (0.15) |
| Inosine | 1.66 (0.15) | 1.28 (0.13) | 1.24 (0.14) | 1.97 (0.34) |
| Hypoxanthine | 4.96 (1.1) | 2.16 (0.36) | 2.28 (0.61) | 4.40 (1.21) |
| Xanthine | 4.89 (0.31) | 4.87 (0.44) | 4.54 (0.58) | 4.51 (0.85) |
| Uric acid | 5.24 (0.65) | 3.70 (0.43) | 3.58 (0.49) | 4.92 (0.87) |

II.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM MODELOS HUMANOS

II.2.a. Clinical effects of allopurinol on perioperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy.

Clinical effects of allopurinol on perioperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy.

Enderson D. de Oliveira¹, Gisele Hansel¹, Aécio C. Fagundes¹, Renata O. Pedrini², Aline Valdameri², Jean P. Oses³, Denise Bandeira⁴, Elaine A. Félix², Florentino F. Mendes⁵, Lisiane O. Porciúncula¹, Elaine Elisabetsky⁶, Luís V. Portela¹, Diogo R. Lara⁷, Diogo O. Souza¹, André P. Schmidt^{1,2,3}(✉).

¹Department of Biochemistry, Institute of Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Department of Anesthesia and Perioperative Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde e Hospital Universitário São Francisco de Paula, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. ⁴Psychology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul ⁴Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵Division of Anesthesia, Department of Surgery, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁶Department of Pharmacology, Institute of Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁷Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

(✉) André P. Schmidt

Avenida Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

Zip code: 90035-003

Porto Alegre - RS - Brazil

Phone: (55-51) 33165557 / 33165558

Fax: (55-51) 33165540 / 33165535

E-mail: aschmidt@ufrgs.br

Running title: Allopurinol-induced analgesia in humans.

Summary:

Background and purpose: Allopurinol is a potent inhibitor of the enzyme xanthine oxidase used primarily in the treatment of hyperuricemia and gout. It is well known that purines exert multiple effects on pain transmission. We hypothesized that the inhibition of xanthine oxidase by allopurinol, thereby reducing purine degradation, could be a valid strategy to enhance purinergic activity and treat pain in humans. The aim of this study was to compare the analgesic efficacy of preanesthetic allopurinol versus placebo on pain levels and anxiety after surgery in patients undergoing total abdominal hysterectomy.

Experimental approach: This randomized, double-blinded, placebo-controlled study included 54 patients, ASA physical status I-II, undergoing abdominal hysterectomy. Patients were randomly assigned to receive either oral allopurinol 300 mg (n = 27) or placebo (n = 27) the night before and 1 h before surgery. The patients were submitted to evaluation of pain sensitivity and anxiety before the treatment, for 24 hours postoperatively, 30 and 90 days after surgery. The anesthetic technique was standardized as subarachnoid block with use of hyperbaric bupivacaine, fentanyl and morphine associated with intravenous sedation with propofol. Cerebrospinal fluid was collected at the time of the spinal anesthesia in order to perform the measurement of the central levels of allopurinol and purines.

Key results: Preoperative administration of allopurinol was effective in reducing postoperative pain 2 hours after surgery. Preoperative administration of allopurinol caused a reduction of approximately 50% in pain levels measured by the visual analog pain scale and numerical pain scale after surgery ($P < 0.05$). There was a significant increase in the

cerebrospinal fluid levels of xanthine before surgery ($P < 0.01$) with no difference observed in levels of other purines.

Conclusions and implications: The purinergic system is a potential target for new drugs to treat acute or chronic pain. This study showed benefit of the use of allopurinol as a preanesthetic medication since it was related to a significant reduction on pain scores 2 hours after surgery. Allopurinol-induced analgesia may be related to adenosine accumulation in the CNS. New prospective studies are warranted to investigate allopurinol and more selective purine derivatives in the management of acute or chronic painful conditions.

Keywords: allopurinol; purines; pain; adenosine; guanosine; xanthine oxidase; anxiety; analgesia; anesthesia.

Introduction

The purinergic system involves adenosine and ATP as major endogenous effectors, acting on P1 and P2 receptors, respectively [Ralevic and Burnstock, 1998]. It is well known that adenosine and its analogs exert multiple effects on pain transmission at peripheral and central sites [Sawynok and Liu, 2003]. Adenosine regulates pain transmission in the spinal cord and periphery and induces antinociceptive effects in several pain paradigms [McGaraughty and Jarvis, 2005]. Antinociceptive effects of adenosine may be related to the inhibition of intrinsic neurons by an increase in K^+ conductance and presynaptic inhibition of sensory nerve terminals, decreasing the release of substance P and glutamate [Sollevi, 1997].

Caffeine and theophylline are the classic P_1 adenosine antagonists current used in humans, but adenosine agonists for human use are still lacking. Allopurinol, or 1,5-dihydro-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one, is a structural analogue of hypoxanthine and a potent inhibitor of the enzyme xanthine oxidase that catalyzes the transformation of hypoxanthine to xanthine and uric acid, reducing both uric acid formation and purine degradation [Day et al., 2007; Pacher et al., 2006]. Allopurinol is used primarily in the treatment of hyperuricemia and gout [Rundles, 1992]. Besides its hypouricemic effects, allopurinol has been studied for several other indications including treatment of seizures, psychiatric disorders, ischemia-reperfusion injury, protozoal diseases, and as a measure of liver impairment [Day et al., 1994; Van Waeg et al., 1988; Garcia Garcia et al., 1990; Das et al., 1987; Akhondzadeh et al., 2005]. Both healthy and hyperuricemic patients present reduction of uric acid levels by allopurinol, probably leading to accumulation of purines, including the neuromodulator adenosine, which may explain its beneficial anticonvulsant and antipsychotic effects [Tada et al., 1991; Wada et al., 1992; Zagnoni et al., 1994; Lara et

al., 2000; 2003; Machado-Vieira et al., 2001]. Of note, positive effects of allopurinol in refractory epilepsy [Tada et al., 1991], aggressive behavior [Lara et al., 2000; 2003], mania [Machado-Vieira et al., 2001], and schizophrenia [Brunstein et al., 2005; Lara et al., 2001] have been suggested to be secondary to its inhibitory effect on purine degradation, enhancing adenosinergic activity, despite the lack of direct data to support this hypothesis. Notably, previous studies have shown that allopurinol produces dose-dependent antinociceptive effects against several chemical and thermal pain models in rodents [Schmidt et al., 2009; Essawy and Elbaz, 2013].

We hypothesized that the inhibition of xanthine oxidase by allopurinol, thereby reducing purine degradation, could be a valid strategy to enhance purinergic activity and cause analgesic and anxiolytic effects, which is in line with the anticonvulsant and neuropsychiatric effects observed with allopurinol treatment. Given the pivotal role of pain and anxiety as a stress factor in the postoperative period and based on the considerations above, the aims of the present study were to evaluate the influence of allopurinol as a premedication on postoperative pain and anxiety in women undergoing abdominal hysterectomy. We also compared pre- and postanesthetic sedation, hemodynamic status, adverse events during surgery and on emergence, and consumption of anesthetics.

Methods

Ethics, study design and population

A prospective, randomized, clinical trial of adult patients was performed in a tertiary care hospital in South Brazil. The protocol was evaluated and approved by the Institution's Research and Ethics Committee. Participants received a written and oral explanation of the study and signed an informed consent form.

After power analysis (confidence interval of 95% and power of 90%), a total of sixty-two female patients were considered eligible and subsequently enrolled into the study, with ASA status I–II, and ages ranging from 18 to 65 years old, being excluded the illiterate or who do not understand Portuguese language, those with history of psychiatric or neurological symptoms, those with contra-indications for regional anesthesia, who refused to participate of the study or who had already participated in other studies. In total, fifty-four patients satisfactorily completed the study (27 in the allopurinol group and 27 in the placebo group). Eight patients were excluded, four from the allopurinol group and four from the placebo group. In two cases, surgery was cancelled. In two patients, regional anesthesia was not applied. One patient was excluded after receiving benzodiazepines as a sedative agent during surgery. In three patients, a different anesthetic or surgical procedure was performed.

Anesthetic management

After admission to the operating room, they were monitored using pulse oximetry, non-invasive arterial pressure monitor, 5-lead electrocardiogram, and continuous ST segment analysis in a multiparametric monitor (Siemens monitor SC 9000 Infinity XL, Germany). Peripheral venous puncture was obtained in the upper limb with a 14 or 16G catheter. The anesthetic procedure was standardized, following the administration of intravenous fentanyl (50 to 100 μg), all patients received a combined spinal injection of hyperbaric bupivacaine 0.5% (15 to 20 mg), fentanyl 20 μg and morphine 100 μg , at the level of L_3/L_4 . A continuous infusion of propofol (0.05 to $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) was administered to maintain sedation during surgery. Intra-operative variables, including the length of surgery, blood loss, anesthetic and

surgical complications were noted. At the end of surgery, propofol sedation was stopped and the patient eventually discharged to the postanesthesia care unit (PACU).

Outcome and study interventions

The main outcome measure used in this study was postoperative pain as assessed by pain scores. Randomization was performed according to a computer-generated random list. Patients were allocated in a double-blind manner, using random numbers, to receive either oral allopurinol 300 mg or placebo the night before surgery (22.00 h) and 1 h prior to the start of spinal anesthesia. No other preoperative medication was given. Blinding and randomization were undertaken by one investigator not involved in patient evaluation. Other individuals involved in the patients' care were unaware of which treatment group the patient was in.

Assessment of outcome

Patients enrolled were asked to report any pain in four self-assessment instruments – a verbal scale (VPS), a visual analogue scale (VAS), a numerical scale (NPS) and the McGill questionnaire. In the first one, the reported pain was graded from 1 to 4, according to intensity: (1) none, (2) slight, (3) moderate, or (4) severe. The Visual Analogue Scale (VAS) is widely used as a measure of self-reported pain assessment. The scale consists of a 100-mm line that pictorially represents a continuum between two extremes: no pain (score of 0) and extreme pain (score of 100). The use of the VAS was explained to the patient the night before surgery. In order to stratify the data of VAS, cutoff points were established from percentiles 25, 50 and 75 of the measures, corresponding to 0.1, 1.8 and 6.9 cm. Based on these cutoff points, the clinical significance of the values and the methodological

strategy used by Collins et al., 1997, absence of pain corresponded to the range from zero to percentile 25 (0.1 cm); mild pain corresponded to the range from the first percentile to the median (0.2 to 1.8 cm); moderate pain corresponded to the range from the median to percentile 75 (1.9 to 6.9 cm), and intense pain corresponded to the scores above the second percentile (7.0 to 10 cm). For the numerical scale, patients were asked to report their pain in numbers ranging from zero (no pain) to 10 (extreme pain). Finally, The McGill Questionnaire [Melzack R, 1975], adapted to Brazilian Portuguese [Pimenta and Teixeira, 1997], was used to measure the multidimensional pain experience (sensory, affective and evaluative dimensions).

The measurement of anxiety levels was performed through the State-Trait Anxiety Inventory for Adults (STAI), adapted to Brazilian Portuguese [Biaggio AM, 1980], during the pre- and postoperative periods. The questionnaire contains two separate 20-item, self-report rating scales for measuring trait- and state-anxiety. Patients responded on a three or four-point scale. Total scores for situational and baseline questions separately range from 20 to 60 or 80, with higher scores denoting higher levels of anxiety. In the postoperative period the application of the STAI was restricted to items referring to the state of anxiety. According to previous findings [Spielberger et al., 1973], the mean of anxiety scale scores was used to determine the cutoff point, so that individuals with scores above the average were classified as the high anxiety group and those with scores equal to or below the average as the low anxiety group.

In the preoperative period, each patient was submitted to the application of pain and anxiety scales before the surgical procedure. This preoperative stage allowed patients to get used to the pain and anxiety scales application technique. During this period the patient answered the anxiety scale questions and the structured questionnaire to obtain data about

demographic characteristics and chronic diseases. In order to minimize a possible influence of the word “pain” upon anxiety scores, the pain and anxiety scales were applied in different pseudo-random sequences.

Before evaluation, patients were randomized for premedication in two groups: group 1- Allopurinol 300 mg p.o. the night before surgery (22.00 h) and 1 h prior to the procedure; 2- Placebo p.o. the night before surgery (22.00 h) and 1 h prior to the procedure. Patients were admitted in operative room and evaluated for sedation status.

In order to apply the pain and anxiety scales in the postoperative period, patient had to be fully conscious and oriented as to time and space (two points in the consciousness item of the Aldrete and Kroulik’s scale). All patients enrolled were asked to report any pain in the postoperative period. Intravenous analgesia was administered according to the self-assessment scales of pain used in this study. Non-opioid analgesics were prescribed for slight to moderate pain, and opioid analgesics for intense pain. The analgesic schedule followed the routine of the PACU.

We also evaluated hemodynamic parameters during and after anesthesia (heart rate, arterial pressure, end tidal CO₂, pulse oximetry), levels of postoperative sedation, consumption of anesthetics and analgesics, adverse effects on emergence or in the PACU (hypoxemia, bradycardia, nausea, vomiting, hypothermia, urinary retention, shivering or hallucination). The extent of the surgical procedure, length of anesthesia and surgery, analgesic block, doses of opioids and recovery time were also recorded.

Cerebrospinal fluid (CSF) sampling

Patients scheduled for elective abdominal hysterectomy received a spinal anesthesia technique. All the CSF was collected by experienced anesthesiologists. The first 0.5 ml of CSF aspirated was discarded to reduce contamination. The CSF samples were inspected visually and discarded if blood contamination was present. A total of 0.5 ml of CSF was collected from the patients after successful subarachnoid puncture and before the intrathecal injection of anesthetics or analgesics. All samples were centrifuged at 10,000 g in an Eppendorf centrifuge during 5 min to obtain cell-free supernatants, stored at -70 °C within 30 min of collection and not thawed until laboratory evaluations.

HPLC procedure: High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with CSF cell-free supernatants aliquots for determination of purines concentration, according to Domanski et al., 2006, CSF concentrations of the following purines were determined: adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine, guanosine triphosphate (GTP), guanosine diphosphate (GDP), guanosine monophosphate (GMP), guanosine, inosine monophosphate (IMP), inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid. Analyses were performed with Shimadzu Class-VP chromatography system consisting of a quaternary gradient pump with vacuum degassing and piston desalting modules, Shimadzu SIL-10AF auto injector valve with 50 µL loop, and an UV detector. Separations were achieved on a Supelco C18 250 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size column. The mobile phase flowed at a rate of 1.2 mL/min and the column temperature was 24 °C. Buffer composition remained unchanged (A: 150 mmol/L phosphate buffer, pH 6.0, containing 150 mmol/L potassium chloride; B: 15% acetonitrile in buffer A). The gradient profile was modified to the following content of

buffer B in the mobile phase: 0% at 0.00 min, 2% at 0.05 min, 7% at 2.45 min, 50% at 10.00 min, 100% at 11.00 min, and 0% at 12.40 min. Samples of 10 μ L were injected into the injection valve loop. Absorbance was read at 254 nm. CSF concentrations of purines are expressed as mean \pm SEM in μ M.

Statistical analysis

A power analysis was performed using postoperative pain as the primary outcome measure. The sample size was calculated so that a mean difference of 30 mm (VAS) between the groups would permit a type 1 error probability of $\alpha = 0.05$ (two-tailed test) with reduced pain scores in the intervention group (allopurinol), and a null hypothesis of $\beta = 0.10$. This indicated that 20 patients would have to be included in each group. A higher number of patients were included to allow more adequate control of the potential confounding effect of variables.

Data were stored in Excel software and analyzed by STATA 12.0 or GraphPad InStat. Numerical variables were given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Non-parametric data were expressed as median and interquartile ranges (25% and 75%). Data were submitted to Shapiro-Wilk test for normality evaluation. Statistical analysis between groups was performed using unpaired student *t* test for parametric data. Non-parametric data were analyzed by using two-sample Wilcoxon rank-sum test. Differences in proportions between studied groups and postoperative state-anxiety and pain scores were tested by means of Pearson's X^2 test with Yates continuity correction in univariate analysis (or by Fisher's exact test when the number of expected observations was five or less in at least one cell). Correlation analyses were performed using Pearson's or Spearman's rank

sum correlation. To compare the two experimental groups (allopurinol and placebo) in terms of pain changes, multivariate analysis of variance for repeated measures was used, with the treatment group as the grouping factor, time as the repeated measure and pre-operative state and trait-anxiety as covariates. $P < 0.05$ was considered for statistically significant differences.

Results:

The patient details are summarized in Table 1. The average age of patients was 48.5 years (SD \pm 12). There was no difference in demographic characteristics between groups. Taken together, the preoperative measurements of anxiety and pain scores before surgery show no statistically significant difference between groups. Additionally, there was also no difference in preoperative levels of sedation between groups (data not shown).

The pre- and postanesthesia measurements of anxiety levels after surgery show no statistically significant difference between groups (Table 2). Recovery time (data not shown) and time for discharge from PACU (Table 1) were not statistically different between groups. Although we did not find a difference in anxiety levels between groups, preoperative administration of allopurinol was related to lower pain scores than placebo 2h after surgery in both verbal, numerical, visual and McGill pain scales ($P < 0.05$) as shown in Table 3. Additionally, patients that received premedication with allopurinol requested lower doses of opioids postoperatively. The mean consumption of morphine in the first 2h after surgery was 3.4(\pm 0.7) mg in the placebo group as compared to 1.8(\pm 0.4) mg in the allopurinol group ($P = 0.04$). Notably, there were no differences between groups on perioperative adverse events, intraoperative consumption of anesthetics, perioperative hemodynamic parameters, incidence of nausea or vomiting, and levels of postoperative

sedation (data not shown).

Table 4 shows that the CSF concentration of uric acid was significantly reduced immediately before surgery and after treatment with two p.o. doses of allopurinol 300 mg. Additionally, we observed a significant increase in xanthine levels following allopurinol treatment as compared to placebo. Conversely, oral administration of allopurinol did not affect CSF levels of ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, IMP hypoxanthine, guanosine, adenosine, and inosine. Of note, allopurinol was not detected in the CSF of patients in both groups.

Discussion and conclusions:

In this study, oral administration of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol before surgery was associated with a significant reduction in pain scores 2h after total abdominal hysterectomy in women. This study also demonstrated that two doses of allopurinol (300 mg) in the last 12 h before surgery caused a significant increase in CSF levels of xanthine but decreased CSF concentration of uric acid. However, no differences were found between groups in anxiety scores after surgery.

The population sample studied was homogenous as the preoperative characteristics (gender, age, weight, preoperative anxiety, and pain status) of the patients were quite similar. As high levels of preoperative state- or trait-anxiety may be a risk factor for postoperative state-anxiety and higher pain levels [Caumo et al., 2002; Schmidt et al., 2007b], it is essential to have a homogenous population regarding preoperative anxiety scores to prevent potential confounding bias. Previous studies reported that a perioperative anxiety is strongly affected by the state- and trait-anxiety [Caumo et al., 2002]. In this

study, allopurinol did not significantly affect postoperative state-anxiety. A methodological issue regarding the tools used to measure anxiety in this study should be pointed out. Despite the fact that STAI is widely used [Spielberger et al., 1973] and validated [Biaggio AM, 1980] for evaluating the level of anxiety in different situations and the response to anxiolytic drugs, to date there is no gold standard to measure anxiety in adults. It is possible that STAI is not able to accurately detect postoperative anxiolytic effects of allopurinol. Therefore, the actual effects of premedication with allopurinol on anxiety levels after surgery may be further clarified with new tools in the future.

Adenine-based purines have been considered important targets for the development of new drugs for pain management, since the nucleoside adenosine and its analogs have demonstrated antinociceptive effects following both systemic and central administration [Sawynok and Liu, 2003]. Considering that adenine- and guanine-based purines closely interact in modulating several CNS functions [Dobolyi et al., 2000], we have recently demonstrated that some guanine-based purines, especially the nucleoside guanosine, produced consistent antinociceptive effects in several animal pain models [Schmidt et al., 2010]. Although adenine- or guanine-based purines have been related to some antinociceptive effects in both animals and humans [Schmidt et al., 2007a], it is relatively early to propose the use of most purine derivatives for clinical research and practice. Therefore, an interesting approach to investigate the role of purines clinically is the investigation of purine derivatives already used in humans such as the xanthine-oxidase inhibitor allopurinol.

Although allopurinol has been traditionally used in the treatment of gout and its related symptoms, there were only few reports investigating the effects of allopurinol *per se*

on pain scores [Pinelli et al., 1991; Daskalopoulou et al., 2005; Inkster et al., 2007; Hacimuftuoglu et al., 2006]. More recently, we and others demonstrated that allopurinol produced antinociceptive effects in several thermal and chemical pain models in rodents [Schmidt et al., 2009; Essawy and Elbaz, 2013]. The rationale to administer allopurinol for pain is derived from evidence in basic and clinical research on the purinergic system. Purines and their analogs have been considered important targets for the development of new drugs for pain management, since the nucleoside adenosine and its analogs present antinociceptive effects at spinal, supraspinal and peripheral sites [Sawynok, 1998; Sawynok and Liu, 2003]. Endogenous adenosine can be released in the CNS and peripheral tissues, and the regulation of its levels by various pharmacological agents can alter pain processing through activation of adenosine A₁ receptors on neurons, and perhaps other receptors on adjacent structures [Sawynok and Liu, 2003]. Additional effects on inflammatory cells at peripheral sites [Fredholm et al., 1997] and on glia in the central nervous system (CNS) [Ogata and Schubert, 1996; Gebicke-Haerter et al., 1996] mediated by adenosine P1 receptors have also been reported, potentially producing indirect effects on pain transmission. Therefore, allopurinol, by inhibiting xanthine oxidase and production of uric acid, may produce accumulation of other purines (for instance adenosine and other nucleosides and nucleotides), which may account for its analgesic properties.

The basic mechanism of action of allopurinol and its metabolite oxypurinol is inhibition of xanthine oxidase (they bind strongly to the reduced form of xanthine oxidase and inhibit the enzyme). This leads to a decrease in the systemic concentration of uric acid and an increase in the concentration of the precursors, hypoxanthine and xanthine [Day et al., 2007]. In addition, hypoxanthine can be converted to inosine, IMP and consequently, to adenosine and guanosine [Day et al., 2007]. Thus, the primary effect of both allopurinol

and oxypurinol is inhibition of uric acid production, and the overall result is the inhibition of the metabolism of xanthine and hypoxanthine leading to greater salvage of these purines by their conversion to inosine, adenosine and guanosine. These findings, both in CNS and periphery, have been extensively demonstrated after systemic administration of allopurinol in several studies in animals and humans [Kim et al., 1987a,b; Ceballos et al., 1994; Marro et al., 2006; Schmidt et al., 2009]. Accordingly, in this study, we demonstrated an important increase in the CSF concentrations of xanthine (approximately 40%), and a significant reduction in the CSF levels of uric acid (approximately 11%). In fact, a remarkable suppression of CSF uric acid levels after allopurinol treatment has also been observed elsewhere [Kim et al., 1987a; Enrico et al., 1997; Akdemir et al., 2001]. Altogether, these findings indicate that CSF adenosine and/or other purines accumulation might play a role in the antinociceptive action of allopurinol.

In regard to the mechanism of action of allopurinol, previous data indicated that the activation of the opioid naloxone-sensitive pathway is unlikely to be involved in the antinociception caused by allopurinol, since naloxone had no effect against allopurinol-induced analgesia [Schmidt et al., 2009; Essawy and Elbaz, 2013]. However, adenosine-receptor antagonists caffeine and DPCPX prevented allopurinol-induced antinociception, indicating that A₁ adenosine-receptor and adenosine may be involved in these effects [Schmidt et al., 2009; Essawy and Elbaz, 2013]. Importantly, there is no evidence that allopurinol present any direct agonist or antagonist effect on adenosinergic receptors [Day et al., 2007].

Although previous findings indicate a role for adenosine in allopurinol-induced antinociception [Schmidt et al., 2009; Essawy and Elbaz, 2013], we cannot rule out the influence of other purines. This study also demonstrated a significant increase in the CSF

concentration of xanthine. Our group and others [Cunha, 2005; Dobolyi et al., 2000; Oses et al., 2004, 2007] have demonstrated that the nucleosides guanosine and adenosine closely interact in the CNS. Additionally, we have proposed a specific guanine-based purinergic system with relevant physiological and pathological implications to the CNS, in addition to the well-characterized adenine-based purinergic system [Schmidt et al., 2007a]. Of note, we have demonstrated that guanosine, as well as adenosine, may modulate pain transmission [Schmidt et al., 2010]. Therefore, it is not possible to exclude at this time that other purines may also influence allopurinol-induced antinociception.

Allopurinol was developed and has been extensively used as an inhibitor of the enzyme xanthine oxidase [Day et al., 2007]. Xanthine oxidase is a highly versatile flavoprotein enzyme that catalyzes the oxidative hydroxylation of purine substrates and generates reactive oxygen species (ROS) [Borges et al., 2002]. ROS have been proposed to contribute to and/or maintain conditions of chronic pain [Kim et al., 2006]. Some data have indicated that ROS may also modulate acute pain transmission [Hacimuftuoglu, 2006]. Notably, there is overwhelming acceptance that xanthine oxidase activity is significantly increased in various pathological states, including some pain states [Khalil and Khodr, 2001]. Therefore, the inhibition of this enzymatic pathway may be beneficial for treating pain [Lee et al., 2007]. Additionally, the administration of allopurinol has been shown to decrease tissue injury following ischemia/reperfusion in a variety of in vitro and in vivo models [Garcia Garcia et al., 1990; Reilly et al., 1991]. Inkster et al. [2007] showed that allopurinol treatment had marked beneficial effects on nerve and vascular function in diabetic rats. That same study also demonstrated that allopurinol attenuated diabetes-induced tactile allodynia, thermal and mechanical hyperalgesia. Therefore, it is tempting to propose that the reduction on xanthine oxidase activity and consequently on aspects of

reactive oxygen species might play a role in the postoperative analgesia induced by allopurinol.

Importantly, there were no differences between groups in the incidence of adverse events during the procedure, on emergence from anesthesia and after surgery in PACU. Additionally, no adverse effects over hemodynamic parameters were observed perioperatively. These findings confirm the well-known safety profile of allopurinol and points to a safe administration in the perioperative setting as a premedication in adult patients.

In summary, this study has demonstrated that premedication with allopurinol is associated with analgesic effects immediately after surgery. Allopurinol-induced analgesia may be related to a CNS accumulation of endogenous purines such as adenosine, inosine or guanosine. Although it is early to propose the use of adenine- or guanine-based purines for clinical research, an interesting approach to investigate their role clinically is the investigation of purine derivatives already used in humans such as allopurinol or more selective xanthine-oxidase inhibitors. Additionally, allopurinol is an old and extensively used compound and seems to be well tolerated with no obvious CNS toxic effects until high doses. Therefore, this drug and other more selective xanthine-oxidase inhibitors may be useful for treat acute and chronic pain in humans. New clinical trials are still warranted to determine if allopurinol is effective in reducing pain scores in other clinical settings. These studies should include larger samples and longer follow-up to better determine the impact of premedication with purine derivatives on pivotal postoperative outcomes such as pain and anxiety.

References:

- Akdemir H, Aşik Z, Paşaoğlu H, Karaküçük I, Oktem IS, Koç RK (2001). The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. *Neurosurg Rev* 24: 131-135.
- Akhondzadeh S, Safarcherati A, Amini H (2005). Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 253-259.
- Biaggio AMB. Desenvolvimento da forma em português do Inventário de Ansiedade Traco-Estado de Spielberger. *Arq Bras Psicol* 1980; 32: 106–118.
- Borges F, Fernandes E, Roleira F (2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 9: 195-217.
- Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR (2005). A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 66: 213-219.
- Caumo W, Hidalgo MP, Schmidt AP, Iwamoto CW, Adamatti LC, Bergmann J, Ferreira MB (2002) Effect of pre-operative anxiolysis on postoperative pain response in patients undergoing total abdominal hysterectomy. *Anaesthesia* 57(8): 740-746.
- Ceballos G, Tuttle JB, Rubio R (1994). Differential distribution of purine metabolizing enzymes between glia and neurons. *J Neurochem* 62: 1144-1153.
- Collins SL, Moore RA, McQuay HJ. The visual analogue pain intensity scale: what is moderate pain in millimetres? *Pain* 1997; 72: 95–97.
- Cunha RA (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: from A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1: 111-134.

Das DK, Engelman RM, Clement R, Otani H, Prasad MR, Rao PS (1987). Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger. A novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 314-319.

Daskalopoulou SS, Tzovaras V, Mikhailidis DP, Elisaf M (2005). Effect on serum uric acid levels of drugs prescribed for indications other than treating hyperuricaemia. *Curr Pharm Des* 11: 4161-4175.

Day R, Birkett DJ, Hicks M, Miners JO, Graham GG, Brooks PM (1994). Allopurinol: new uses. *Drugs* 48: 339-44.

Day RO, Graham GG, Hicks M, McLachlan AJ, Stocker SL, Williams KM (2007). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol and oxypurinol. *Clin Pharmacokinet* 46: 623-644.

Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, Nyitrai G, Kekesi KA, Juhasz G (2000). Sustained depolarisation induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem Int* 37: 71-79.

Domanski L, Sulikowski T, Safranow K, Pawlik A, Olszewska M, Chlubek D, et al. (2006). Effect of trimetazidine on the nucleotide profile in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharm Sci* 27 320-327.

Enrico P, Esposito G, Mura MA, Migheli R, Serra PA, Desole MS, et al. (1997). Effects of allopurinol on striatal dopamine, ascorbate and uric acid during an acute morphine challenge: ex vivo and in vivo studies. *Pharmacol Res* 35(6): 577-585.

Essawy SS, Elbaz AA (2013). Role of adenosine receptors in the anti-nociceptive effects of allopurinol in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17(14): 1857-63.

Fredholm BB (1997). Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol* 28: 345-350.

Garcia Garcia J, Martin Rollan C, Refoyo Enrinquez MA, Holgado Madruga M, Marino Hernandez E, Marcias Nuñez JF, et al. (1990). Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition. *J Surg Res* 48: 144-146.

Gebicke-Haerter PJ, Christoffel F, Timmer J, Northoff H, Berger M, Van Calker D (1996). Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int* 29: 37-42.

Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens RL Jr (2006). Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res* 173: 211-216.

Inkster ME, Cotter MA, Cameron NE (2007). Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 561: 63-71.

Khalil Z, Khodr B (2001). A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radic Biol Med* 31: 430-439.

Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou J-L, Lee I, Chung K, et al. (2006). Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 122: 53-62.

Kim P, Yaksh TL, Burnett PC, Blum MR, Sundt TM Jr (1987a). Cerebrospinal fluid levels of uric acid in dogs and the effect of allopurinol. *Brain Res* 402: 87-92.

Kim P, Yaksh TL, Romero SD, Sundt TM Jr (1987b). Production of uric acid in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in dogs: investigation of the possible role of xanthine oxidase in chronic vasospasm. *Neurosurgery* 21: 39-44.

Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO (2000). Allopurinol for refractory aggression and self-inflicted behaviour. *J Psychopharmacol* 14: 81-83.

Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO (2001). Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 16: 235-237.

Lara DR, Cruz MR, Xavier F, Souza DO, Moriguchi EH (2003). Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int Clin Psychopharmacol* 18: 53-55.

Lee I, Kim HK, Kim JH, Chung K, Chung JM (2007). The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133: 9-17.

Machado-Vieira R, Lara DR, Souza DO, Kapczinski F (2001). Therapeutic efficacy of allopurinol in mania associated with hyperuricemia. *J Clin Psychopharmacol* 21: 621-622.

Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2006). Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 1073-1074: 444-450.

McGaraughty S, Jarvis MF (2005) Antinociceptive properties of a non-nucleotide P2X3/P2X2/3 receptor antagonist. *Drug News Perspect* 18(8): 501-507.

Melzack R (1975). The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain* 1: 277-299.

Ogata T, Schubert P (1996). Programmed cell death in rat microglia is controlled by extracellular adenosine. *Neurosci Lett* 218: 91-94.

Oses JP, Leke R, Portela LV, Lara DR, Schmidt AP, Casali EA, et al. (2004). Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol. *Brain Res Bull* 64: 237-242.

Oses JP, Viola GG, de Paula Cognato G, Júnior VH, Hansel G, Böhmer AE, et al. (2007). Pentylentetrazol kindling alters adenine and guanine nucleotide catabolism in rat hippocampal slices and cerebrospinal fluid. *Epilepsy Res* 75: 104-111.

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 58: 87-114.

Pimenta CAM, Teixeira MJ (1997). Questionário de dor de McGill: proposta de adaptação para a língua portuguesa. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 47: 177-186.

Pinelli A, Trivulzio S, Malvezzi L, Zecca L (1991). Potentiation of the analgesic effects of tryptophan by allopurinol in rats. *Arzneimittelforschung* 41: 809-811.

Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.

Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161: 488-503.

Rundles RW (1982). The development of allopurinol. *Arch Intern Med* 145: 89-94.

Sawynok J (1998). Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* 347: 1-11.

Sawynok J, Liu XJ (2003). Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 69: 313-340.

Schmidt AP, Böhmer AE, Antunes C, Schallenberger C, Porciúncula LO, Elisabetsky E, Lara DR, Souza DO (2009) Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 156(1): 163-72.

Schmidt AP, Böhmer AE, Schallenberger C, Antunes C, Tavares RG, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO (2010). Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. *Br J Pharmacol* 159(6): 1247-1263.

Schmidt AP, Lara DR, Souza DO (2007a). Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 116: 401-416.

Schmidt AP, Valinetti EA, Bandeira D, Bertacchi MF, Simões CM, Auler JO Jr. (2007b). Effects of preanesthetic administration of midazolam, clonidine, or dexmedetomidine on postoperative pain and anxiety in children. *Paediatr Anaesth* 17(7): 667-674.

Sollevi A (1997). Adenosine for pain control. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 110: 135-136.

Spielberger CD, Wadsworth AP, Auerbach SM et al. Emotional reactions to surgery. *J Consult Clin Psychol* 1973; 40: 33–38.

Tada H, Morooka K, Arimoto K, Matsuo T (1991). Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. *Epilepsia* 32: 279-283.

Van Waeg G, Loof L, Groth T, Niklasson F (1988). Allopurinol kinetics in humans as a means to assess liver function: evaluation of allopurinol loading test. *Scand J Clin Lab Med* 48: 45-57.

Wada Y, Hasegawa H, Nakamura M, Yamaguchi N (1992). Anticonvulsant effect of allopurinol on hippocampal-kindled seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 899-901.

Zagnoni PG, Bianchi A, Zolo P, Canger R, Cornaggia C, D'Alessandro P, et al. (1994).

Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia* 35: 107-112.

Acknowledgments:

This research was supported by the Brazilian research agencies FINEP, CNPq, CAPES, FAPERGS, UFRGS and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection (INCTEN/CNPq).

Table 1: Demographic data

| Characteristics | Groups (treatment) | | <i>P</i> |
|--------------------------------------|--------------------|-------------|----------|
| | Placebo | Allopurinol | |
| Age (years) | 49.9(1.7) | 50.6(1.7) | 0.76 |
| Weight (kg) | 66.8(2.2) | 70.3(2.7) | 0.35 |
| BMI (kg/m ²) | 27(1.2) | 28.5(1) | 0.34 |
| Hypertension (n - %) | 9(33) | 12(44) | 0.40 |
| Diabetes type 2 (n - %) | 3(11) | 1(4) | 0.30 |
| Active Smoking (n - %) | 4(15) | 6(22) | 0.73 |
| ASA status (n - %) | | | |
| I | 6(22) | 3(11) | |
| II | 21(78) | 24(89) | 0.27 |
| Duration of surgery (min) | 145(7.2) | 149(6.9) | 0.71 |
| Time to discharge from PACU (min) | 210(13) | 240(15) | 0.25 |
| Hospitalization after surgery (days) | 3.1(0.2) | 3.4(0.2) | 0.23 |

Data are shown as mean (\pm SEM) or absolute values (percentiles). $P < 0.05$ was considered statistically significant; Student *t* test for parametric data; Wilcoxon rank-sum test for non-parametric data; Pearson's X^2 test or Fisher's exact test for categorical data (n = 27 per group). BMI: Body mass index.

Table 2: Comparison of main outcomes between groups – anxiety scores

| Time point | Groups (treatment – STAI scores) | | |
|-------------------|----------------------------------|-------------|----------|
| | Placebo | Allopurinol | <i>P</i> |
| Baseline (trait) | 37.9 (2.5) | 39.8 (2.4) | 0.61 |
| Baseline (state) | 38.1 (1.7) | 37.6 (1.6) | 0.85 |
| 2h after surgery | 38.0 (1.5) | 37.8 (1.7) | 0.93 |
| 6h after surgery | 36.0 (1.4) | 36.1 (1.3) | 0.99 |
| 12h after surgery | 34.1 (1.5) | 34.3 (0.9) | 0.87 |
| 24h after surgery | 34.8 (1.5) | 34.0 (0.7) | 0.72 |

Data are shown as mean (\pm SEM). $P < 0.05$ was considered statistically significant, Student *t* test for parametric data, Wilcoxon rank-sum test for non-parametric data; (n = 27 per group). STAI: State-trait anxiety inventory.

Table 3: Comparison of main outcomes between groups – pain scores

| Pain scale | Groups (treatment) | | | | | |
|----------------------------|--------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| | | Placebo | | | Allopurinol | |
| | Baseline | 2 h | 6 h | Baseline | 2 h | 6 h |
| VPS – n (%) | | | | | | |
| No pain | 21(78) | 4(15)* | 9(33) | 22(81) | 8(30)* | 14(52) |
| Mild pain | 6(22) | 8(30)* | 10(37) | 5(23) | 14(52)* | 8(30) |
| Moderate pain | 0(0) | 12(44)* | 6(22) | 0(0) | 5(18)* | 5(18) |
| Severe pain | 0(0) | 3(11)* | 2(8) | 0(0) | 0(0)* | 0(0) |
| VAS – mean (\pm SEM) | 0.95(0.33) | 4.3(0.63)* | 2.5(0.59) | 1.1(0.29) | 2.4(0.43)* | 2.24(0.5) |
| NPS – mean (\pm SEM) | 0.62(0.32) | 4.84(0.62)* | 3.1(0.6) | 0.5(0.25) | 2.8(0.46)* | 2.1(0.47) |
| McGill – mean (\pm SEM) | 4.25(2.1) | 18.8(2.7)* | 12.2(2.7) | 5.0(2.4) | 14.6(2.9)* | 11.6(2.7) |

Data are shown as mean (\pm SEM) or absolute values (percentiles). $P < 0.05$ was considered statistically significant, Student t test for parametric data, Wilcoxon rank-sum test for non-parametric data, X^2 test for categorical data; (n = 27 per group). * $P < 0.05$. VPS: Verbal pain scale; VAS: Visual-analogue pain scale; NPS: Numerical pain scale; McGill: Modified McGill pain scale.

Table 4: Effects of p.o. allopurinol (600 mg) or placebo on CSF purines concentration.

| CSF purines concentration (μM) | Groups (treatment) | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| | Placebo | Allopurinol |
| GTP | ND | ND |
| GDP | ND | ND |
| GMP | ND | ND |
| IMP | 0.007 (0.004) | 0.009 (0.006) |
| ATP | ND | ND |
| ADP | 0.15 (0.02) | 0.18 (0.02) |
| AMP | 0.45 (0.27) | 0.39 (0.22) |
| Inosine | 0.8 (0.09) | 0.77 (0.1) |
| Guanosine | 0.004 (0.001) | 0.006 (0.004) |
| Adenosine | 0.43 (0.07) | 0.29 (0.04) |
| Hypoxanthine | 4.05 (0.22) | 4.5 (0.34) |
| Xanthine | 3.08 (0.2) [#] | 4.3 (0.23) [#] |
| Uric acid | 18.1 (1.83)* | 16.1 (1.36)* |

Data are shown as mean (\pm SEM). $P < 0.05$ was considered statistically significant, Student t test for parametric data, Wilcoxon rank-sum test for non-parametric data; * $P < 0.05$; [#] $P < 0.01$. (n = 27 patients per group). GTP: guanosine-triphosphate; GDP: guanosine-diphosphate; GMP: guanosine-monophosphate; IMP: inosine-monophosphate; ATP: adenosine-triphosphate; ADP: adenosine-diphosphate; AMP: adenosine-monophosphate; ND: non-detected.

PARTE III

Onde os resultados são discutidos e as perspectivas são traçadas.

III.1. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

III.1.a. Efeitos antinociceptivos da inosina, da guanina e da guanosina

Nos capítulos II.1.a., II.1.b., podemos observar diversos resultados da investigação das purinas, em especial a inosina e a guanina, além de seu derivado a guanosina, em diversos modelos de dor em camundongos. A administração intratecal (i.t.) de inosina e guanina demonstrou efeitos antinociceptivos e dose dependente em diversos modelos térmicos e químicos de dor no primeiro estudo, efeitos revertidos através da administração de antagonistas dos receptores adenosinérgicos A_1 . Estes dados corroboram com um estudo recente que demonstrou que a inosina apresenta efeitos antinociceptivos quando administrada por diferentes vias e de forma aguda ou crônica, efeitos mediados, pelo menos em parte, por receptores adenosinérgicos e pelo bloqueio da via proteína cinase C [Nascimento et al., 2010]. A seguir, no segundo estudo, observamos o efeito antinociceptivo da administração sistêmica de guanosina em modelo de dor neuropática, um modelo de constrição crônica do nervo ciático, complementando os resultados anteriores de Schmidt et al., 2008 e 2010a, que havia demonstrado seu efeito em modelos térmicos e químicos de dor em roedores. Além disso, a administração sistêmica de guanosina promoveu um aumento significativo de sua concentração no líquido cefalorraquidiano. Entretanto, a guanosina não apresentou efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória.

O nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina são considerados os principais efetores endógenos do sistema purinérgico [Burnstock, 2007]. Além de diversas funções biológicas previamente estabelecidas, esses derivados da adenina desempenham papel

fisiológico relevante nos mecanismos endógenos de transmissão e modulação da dor no sistema nervoso central e periférico [Sawynok and Liu, 2003]. O nucleotídeo ATP estimula terminações nervosas periféricas, amplificando a resposta dolorosa. Em nível central, o ATP, via receptores P2X, está intimamente associado aos processos de geração e transmissão da dor aguda, inflamatória, neuropática e visceral [Burnstock, 2007]. O nucleosídeo adenosina e seus análogos, via receptores P1, apresentam significativos efeitos antinociceptivos em diversos modelos de dor. A regulação da dor via adenosina endógena e seus receptores ocorre na periferia e principalmente em nível central (medula espinhal) [McGaraughty and Jarvis, 2005].

O nucleosídeo adenosina pode ser convertido a inosina através da ação da enzima adenosina deaminase. Inosina é uma purina endógena que apresenta efeitos anti-inflamatórios demonstrados através de diversos estudos prévios, inibindo citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos ativados e sendo eficaz no tratamento de lesão pulmonar inflamatória, modelos inflamatórios e de choque endotóxico [Haskó et al., 2000; Garcia Soriano et al., 2001; Gomez and Sitkovsky, 2003]. Apesar de muitos estudos demonstrarem inequivocamente e de forma amplamente reproduzível os efeitos antinociceptivos da adenosina e seus análogos, apenas evidências modestas e recentes investigaram e demonstraram efeitos antinociceptivos do nucleosídeo inosina [Nascimento et al., 2010].

A investigação do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo da inosina e da guanina administrada via i.t., no capítulo II.1.a, foi observado através da atuação nos receptores adenosinérgicos, no modelo de dor de injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato. A administração de antagonistas e agonistas dos receptores adenosinérgicos, cafeína não

seletivo, DPCPX antagonista A_1 e SCH58261 antagonista A_{2A} , demonstrou o efeito antinociceptivo pela atuação no receptor A_1 .

Apesar dos derivados da adenina serem os principais representantes da atividade extracelular do sistema purinérgico, os derivados da guanina também tem demonstrado, mais recentemente, efeitos biológicos extracelulares relevantes. Há crescente evidência que os derivados da guanina, mais especificamente a guanosina, agem como moléculas sinalizadoras intercelulares. As células da glia, principalmente os astrócitos, são as principais fontes de purinas como os derivados da guanina [Rathbone et al., 1999]. Estas células expressam receptores purinérgicos envolvidos em processos tróficos e neuroprotetores [Neary et al., 1996; Ciccarelli et al., 2001]. Entretanto, é bem estabelecido que os derivados da guanina (GTP e guanosina) não são ligantes de receptores adenosinérgicos [Muller e Scior, 1993], sugerindo que estas substâncias podem possuir receptores específicos na membrana celular.

Recentemente, demonstramos que os derivados da guanina, especialmente a guanosina, apresentam efeitos antinociceptivos em diversos modelos de dor em ratos e camundongos. Inicialmente, demonstramos que doses anticonvulsivantes de guanosina e do nucleotídeo GMP, administrados por via i.c.v., foram antinociceptivos em quatro modelos de dor aguda em camundongos, incluindo dois modelos térmicos (“tail-flick” e “hot-plate” ou placa quente) e dois modelos químicos, com injeção de substâncias irritantes na pata do animal [Schmidt et al., 2008]. Neste estudo inicial, a administração de AOPCP, um inibidor da enzima 5'-nucleotidase e conseqüentemente da conversão de GMP em guanosina, reverteu os efeitos antinociceptivos do GMP no modelo da capsaicina, sugerindo, de forma semelhante a outros estudos [Frizzo et al., 2003; Soares

et al., 2004; Saute et al., 2006], que os efeitos do GMP sobre a dor estão condicionados a sua conversão até guanósina ou, até mesmo a conversão a outros metabólitos como a guanina. Estes dados corroboram resultados obtidos com doses anticonvulsivantes, onde a conversão até guanósina ou seus metabólitos parece ser responsável pelos efeitos observados [Schmidt et al., 2008]. Posteriormente, diversos estudos investigaram a guanósina em diversos modelos de dor e através de diferentes vias de administração, como a via intratecal (i.t.), a via intraperitoneal (i.p.) e a via oral (p.o.). Novamente, os efeitos antinociceptivos da guanósina, por diferentes vias de administração, foram replicados na maior parte dos modelos testados. A administração de guanósina diretamente no SNC, através das vias i.c.v. e i.t., apresentou eficácia antinociceptiva em todos os modelos testados [Schmidt et al., 2008, 2009b,c, 2010a,c].

Os modelos incluídos nesta tese para investigação da inosina e da guanina *in vivo* são modelos tradicionais com embasamento relativamente bem estabelecido [Le Bars et al., 2001]. Os modelos apresentados (excluindo o modelo de dor neuropática do capítulo II.1.b.) são baseados em estímulos térmicos e químicos que induzem dor aguda em animais. Apesar desses modelos estarem relacionados à transmissão de dor aguda de curta duração, algumas diferenças importantes são encontradas. Os modelos térmicos “tail-flick” e da placa quente são semelhantes, mas o primeiro está mais relacionado a um reflexo espinhal, praticamente sem controle de estruturas superiores, enquanto que a placa quente trata-se de modelo mais robusto e complexo, com ativação de estruturas supra-espinhais, produzindo dois componentes comportamentais (lambida da pata e pulos), considerados como respostas de estruturas mais centrais [Le Bars et al., 2001].

A injeção intraplantar (i.pl.) de substâncias algogênicas (capsaicina e glutamato) produz geralmente respostas comportamentais semelhantes e representa um estímulo de maior duração do que os estímulos térmicos (dor tônica versus dor fásica nos estímulos térmicos) [Le Bars et al., 2001]. Entretanto, a injeção i.pl. de glutamato produz resposta nociceptiva e edema fortemente mediados por receptores não-NMDA [Beirith et al., 2002], enquanto que o teste da capsaicina envolve um mecanismo mais complexo, predominantemente mediado pela liberação de aminoácidos excitatórios na medula, ativação de receptores para taquicinininas e receptores NMDA [Sakurada et al., 1993]. Por fim, a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético causa uma resposta comportamental caracterizada por constrições repetidas do abdômen após a injeção da substância algogênica. Esta resposta é dor de origem peritoneo-visceral e, apesar de apresentar baixa especificidade, é um modelo muito sensível e preditivo para testar novas moléculas ou analgésicos cujas propriedades farmacodinâmicas ainda são pouco conhecidas como os fármacos estudados na presente tese [Le Bars et al., 2001].

Considerando os resultados expostos acima, podemos inferir que a guanina e a inosina, de forma similar aos nucleosídeos adenosina e guanosina, são moléculas endógenas com propriedades antinociceptivas. De fato, diversos estudos recentes têm demonstrado que a administração de guanosina causa aumento significativo dos níveis teciduais de guanina na medula espinhal e este efeito pode estar relacionado com sua capacidade neuroprotetora e trófica [Jiang et al., 2003;2007;2008]. Com os efeitos comportamentais documentados, partimos agora para potenciais explicações para estes resultados. É possível que a guanina e a inosina compartilhem mecanismos de ação semelhantes no que diz respeito aos seus efeitos antinociceptivos. As principais hipóteses

de acordo com os eventos demonstrados na presente tese incluem: estímulo à produção e liberação de fatores tróficos neurais (efeitos previamente demonstrados com o nucleosídeo guanósina), ativação do sistema adenosinérgico endógeno (direta ou indiretamente) e/ou modulação da atividade glutamatérgica.

As purinas apresentam importantes propriedades tróficas sobre células do SNC e SNP [Rathbone et al., 2008]. Em especial, guanósina estimula a síntese e liberação de diversos fatores tróficos de astrócitos, tais como fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico ciliar, neurotrofinas, fator de crescimento de fibroblastos, proteína S100 β , entre outros [Rathbone et al., 1999]. Normalmente, os fatores tróficos desempenham função estimuladora das vias de dor em nível medular, estando envolvidos em diversos mecanismos responsáveis pela manutenção do quadro doloroso [Jongen et al., 2005]. Entretanto, alguns resultados são contraditórios e estudo recente demonstrou que administração intratecal de fatores neurotróficos é capaz de tratar de forma eficiente quadros de dor neuropática [Pezet et al., 2008]. O efeito antinociceptivo demonstrado pela guanósina administrada via intratecal em modelo de dor crônica neuropática, e o aumento de sua concentração no líquido, pode estar relacionado a liberação de fatores tróficos. Entretanto, estudos avaliando uma potencial correlação entre guanósina, fatores tróficos e transmissão da dor ainda necessitam ser realizados.

Quanto ao envolvimento dos derivados da adenina nos efeitos antinociceptivos da guanina e da inosina, os resultados desta tese indicam que os receptores adenosinérgicos estão, pelo menos parcialmente, envolvidos nos efeitos demonstrados. Estudos anteriores foram contraditórios, pois alguns demonstraram que os derivados da guanina induzem efeitos biológicos através da liberação de adenosina [Cicarelli et al., 2001; Rathbone et

al., 1999] e que seus efeitos tróficos são parcialmente inibidos pela adenosina deaminase e antagonistas de receptores adenosinérgicos [Ciccarelli et al., 2000]. Em contrapartida, outros estudos excluem o envolvimento do sistema adenosinérgico sobre os efeitos extracelulares desses fármacos [Gysbers e Rathbone, 1996, Frizzo et al., 2001, Lara et al., 2001, Vinadé et al., 2004; Tasca e Souza, 2000]. Considerando os dados obtidos nos trabalhos desta tese, a influência do sistema adenosinérgico nos efeitos da guanina e da inosina parece ser relevante, pois a administração de um antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos (caféina) e do antagonista seletivo dos receptores adenosinérgicos A₁ (DPCPX) foi capaz de reverter os efeitos antinociceptivos da guanina e da inosina. Resultado similar aos observados na presente dissertação foram obtidos em investigações prévias sobre a guanosina e o análogo purinérgico alopurinol em modelos de dor em camundongos [Schmidt et al., 2009a, 2010a].

Em contrapartida, a administração espinal de uma dose de inosina que acarretou um aumento de até 115x na concentração de inosina no líquido cefalorraquidiano (LCR), não obteve efeitos significativos sobre a concentração de adenosina no SNC. Entretanto, outras limitações nesta abordagem devem ser consideradas. Adenosina é uma molécula sujeita à rápida metabolização [Burnstock, 2007], o que pode explicar a ausência de um aumento líquido deste composto. Além disso, as concentrações de purinas diretamente no tecido cerebral e medular não foram avaliadas e é possível que níveis alterados de adenosina possam ocorrer nestas circunstâncias. O mesmo foi observado com a administração de guanina, onde apenas não foi possível detectar guanina no LCR devido a limitações metodológicas que não permitem a dosagem desta purina através de nossa abordagem metodológica. Nossa metodologia de dosagem de purinas através de HPLC

ainda não está suficientemente acurada para dosagem de guanina, o que limita nossa investigação e permite apenas especulações sobre os potenciais efeitos da guanina na dor e da própria administração do fármaco sobre seus níveis no SNC. Demonstramos ainda que a administração de guanina e inosina promove um aumento significativo nos níveis líquidos de oxipurinas como xantina e ácido úrico, um efeito similar aos observados previamente com a administração do nucleosídeo guanosina. Este efeito provavelmente se deve a degradação enzimática destas substâncias *in vivo*, mas, apesar de improvável, não podemos descartá-la, através da presente abordagem metodológica, como causa dos efeitos antinociceptivos da guanina e da inosina.

Uma das hipóteses importantes para embasar o mecanismo de ação antinociceptiva de purinas como a guanina é a capacidade desta substância em modular a atividade glutamatérgica. Os resultados da presente tese indicam que a administração de guanina atenuou a resposta dolorosa provada por agonistas glutamatérgicos administrados diretamente no SNC de camundongos. A guanina, administrada por via intratecal, atenuou os efeitos nociceptivos da administração intratecal de glutamato e AMPA, mas não de NMDA, cainato e trans-ACPD. Apesar de estudos prévios não demonstrarem os derivados da guanina como antagonistas diretos de receptores glutamatérgicos [Souza e Ramirez, 1991], os presentes dados permitem sugerir que a guanina promove seus efeitos antinociceptivos, pelo menos em parte, por interagir com receptores glutamatérgicos ou então por interagir com seus mecanismos de transdução de sinal. Há crescentes evidências de que o sistema glutamatérgico interage amplamente com outros neuromoduladores e seus receptores com os receptores TRPV1 [Siebel et al., 2004]. A administração intratecal de inosina atenuou de forma significativa a resposta

nociceptiva à injeção intratecal de capsaicina, efeito não demonstrado previamente com guanosina [Schmidt et al., 2009b, 2010a]. Este resultado indica que receptores TRPV1 podem estar envolvidos nos efeitos antinociceptivos da inosina. Além disso, os presentes resultados indicam que essas substâncias provavelmente promovem seus efeitos antinociceptivos em nível medular.

Apesar dos efeitos biológicos demonstrados pelos derivados da guanina, as evidências de receptores específicos para guanosina ou os demais derivados da guanina têm sido discretas, mas alguns estudos indicam potenciais sítios de ligação na membrana celular de células neurais [Vuorinen et al., 1992; Ciccarelli et al., 2001; Traversa et al., 2002; 2003]. Traversa et al. [2002; 2003] demonstraram que há um sítio específico para guanosina em preparação de membranas de cérebro de ratos, provavelmente ligado à proteína G. Para corroborar com estes resultados, alguns estudos já demonstraram que a guanosina é capaz de interagir com diferentes cascatas intracelulares, modulando proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), a via PI3K/Akt/PKB (fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3-K)/Akt/proteína cinase B) e provocando o aumento da disponibilidade de AMPc no interior da célula [Gysbers e Rathbone, 1996; Caciagli et al., 2000; Di Iorio et al., 2004; Pettifer et al., 2004; Tomaselli et al., 2005]. Podemos especular que a guanosina e talvez outros derivados purinérgicos sejam capazes de promover tais eventos através de receptores específicos na membrana celular.

Podemos ainda especular que a guanina e a inosina, principalmente se compartilharem algum mecanismo de ação conjunto, podem promover seus efeitos neuroprotetores através de mecanismos receptor-independente. Os estudos de Jurkowitz et al. [1998] e Litsky et al. [1999] demonstraram que os efeitos protetores de inosina e

guanosina em culturas de células da medula espinhal eram revertidos pela administração de um inibidor de PNP, enzima responsável pela degradação de guanosina até guanina e de inosina até hipoxantina [Schmidt et al., 2007]. A hipótese principal concedida por estes estudos é a de que guanosina e inosina, ao serem metabolizadas, liberam um grupo ribose de sua composição. Esta ribose é convertida em intermediários da via glicolítica e culmina com a liberação de ATP necessário para a manutenção da integridade celular. Portanto, substâncias como a guanosina, a guanina e a inosina poderiam servir como uma fonte de energia adicional para células neurais que apresentam algum grau de sofrimento. Estudos mais recentes demonstraram que os nucleosídeos purinérgicos são capazes de estimular a bomba Na/K ATPase e aumentam a sobrevivência de ratos submetidos a modelo de choque hipovolêmico [Darlington e Gann, 2005]. Estes efeitos não foram revertidos por antagonistas adenosinérgicos, mas sim por inibidores da captação de nucleosídeos, sugerindo que este efeito se deve à ação intracelular da guanosina. Portanto, podemos inferir que a guanina e a inosina podem exercer seus efeitos citoprotetores por participar ativamente do metabolismo energético celular quando em concentrações supra-fisiológicas. Entretanto, mesmo que este mecanismo seja viável, é bastante difícil determinar até que ponto apresenta qualquer influência sobre seus efeitos antinociceptivos.

A adenosina e seus análogos têm sido relacionados a efeitos adversos como sedação, disfunção motora, entre outros [Sawynok e Liu, 2003]. Portanto, caso a guanina e a inosina apresentem efeitos semelhantes isto poderia contribuir para mascarar os efeitos antinociceptivos apresentados. Considerando estes fatores, avaliamos a função motora dos animais durante o tratamento proposto. Considerando os dados provenientes

do modelo de placa perfurada (“hole board”), do rotarod e das caixas de locomoção, não observamos efeitos significativos da guanina e da inosina administrados por via intratecal, demonstrando um baixo potencial de toxicidade dos fármacos estudados e excluindo alterações motoras significativas e sua influência sobre os efeitos antinociceptivos.

Considerando os dados expostos acima, podemos concluir que o nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação dos fármacos estudados é bastante limitado. Talvez a melhor opção no momento seja pensar nessas substâncias como moléculas capazes de interagir com múltiplos mecanismos celulares dependentes ou não de receptores específicos. Novos estudos devem surgir caracterizando os possíveis receptores para as purinas derivadas da guanina ou, pelo menos, elucidando os mensageiros secundários envolvidos nos efeitos observados.

III.1.b. Efeitos antinociceptivos do alopurinol: o papel do sistema purinérgico

Como a utilização de agonistas do sistema purinérgico como adenosina e guanosina ainda é possibilidade relativamente distante, uma abordagem que tem sido utilizada para investigar o potencial deste sistema na prática clínica é a administração de derivados do sistema purinérgico como o alopurinol [Schmidt et al., 2007]. Fármacos como o alopurinol apresentam grande experiência de uso e perfil de segurança no tratamento de outras doenças como gota e apresentam documentada capacidade em modular de forma indireta (através da regulação dos níveis de purinas) a atividade do sistema purinérgico [Marro et al., 2006].

No capítulo II.2.a. apresentamos uma investigação do efeito analgésico e ansiolítico do alopurinol em pacientes submetidas a histerectomia abdominal. Os resultados demonstram efeito analgésico significativo 2h após o procedimento cirúrgico. Estes dados corroboram a existência de efeitos antinociceptivos agudos do alopurinol, já demonstrados em parte anteriormente, mas nunca efetivamente estudados [Pinelli et al., 1991; Daskalopoulou et al., 2005; Inkster et al., 2007; Hacimuftuoglu et al., 2006].

O mecanismo de ação básico do alopurinol é o de inibir a enzima xantina oxidase ligando-se de forma intensa à forma reduzida desta enzima. Este evento leva a uma redução da formação de ácido úrico a partir de seus precursores xantina e hipoxantina [Day et al., 2007]. Consequentemente, acúmulo de adenosina, guanosina e inosina podem ser observados [Marro et al., 2006]. Neste estudo, observamos o aumento significativo de xantina, assim como uma diminuição de ácido úrico, no líquido cefalorraquidiano das pacientes, efeito esperado para a administração de um inibidor da enzima xantina oxidase.

Ainda no que diz respeito aos níveis liquóricos de purinas, Schmidt et al., 2010a, demonstraram que pode haver uma correlação entre alterações nas concentrações liquóricas de purinas e quadros algicos agudos e crônicos em humanos. Sucintamente, demonstrou-se que pacientes portadores de quadros dolorosos crônicos de origem predominantemente somática apresentaram níveis elevados de IMP, inosina, guanosina e ácido úrico. Surpreendentemente, os níveis destas purinas estavam significativamente correlacionados com a intensidade da dor, demonstrando que tais substâncias podem fazer parte dos mecanismos de indução ou manutenção da dor e/ou podem compor parte dos mecanismos endógenos de resposta contra a dor.

Apesar de ser ainda precoce a utilização de derivados da guanina e da adenina em estudos clínicos no tratamento da dor ou de doenças do SNC, uma abordagem interessante e viável é a utilização de derivados de purinas como o alopurinol. O alopurinol já possui diversas evidências que demonstram sua eficácia no tratamento de esquizofrenia, comportamento agressivo, quadros psicóticos e epilepsia [Tada et al., 1991; Wada et al., 1992; Zagnoni et al., 1994; Lara et al., 2000; 2003; Machado-Vieira et al., 2001; Akhondzadeh et al., 2005; Brunstein et al., 2005]. Schmidt et al 2009d, demonstraram efeito antinociceptivo induzido por alopurinol em diversos modelos de dor em animais, efeito esse relacionado com o receptor adenosinérgico A₁. Considerando a capacidade das purinas derivadas da guanina e da adenina em modular a dor e os efeitos significativos do alopurinol sobre níveis de purinas no SNC, é relevante propor esta estratégia de tratamento em diversos quadros clínicos, tais como: dor aguda e/ou crônica, doenças psiquiátricas e doenças neurodegenerativas.

III.2. Considerações finais

A presente tese apresentou alguns resultados experimentais obtidos das investigações do potencial efeito antinociceptivo dos derivados purinérgicos guanina, inosina e guanosina em diversos modelos animais de dor, bem como apresentou também algumas abordagens farmacológicas e neuroquímicas para auxiliar no entendimento do mecanismo de ação responsável pelos efeitos destas substâncias no SNC. Além disso, demonstrou efeito analgésico pós-operatório do alopurinol, algo não utilizado na prática clínica.

Durante a formulação desta tese, podemos observar que houve uma evolução no conhecimento sobre potenciais benefícios e funções para os derivados da guanina e da adenina. Uma nova utilização e um novo papel biológico para essas substâncias foi proposto e isto certamente foi a maior contribuição do presente trabalho. Os resultados farmacológicos indicam que a guanina e a inosina, administrados por via intratecal, são antinociceptivos em camundongos. A investigação farmacológica também demonstrou que essas purinas provavelmente exercem suas funções antinociceptivas por modular vias glutamatérgicas e receptores adenosinérgicos.

Por fim, podemos observar que esta tese acrescentou conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos desencadeados por um sistema relativamente novo de neurotransmissão: o sistema purinérgico. Os resultados da presente tese indicam uma futura utilização deste sistema como alvo para desenvolvimentos de novos fármacos analgésicos.

III.3. PERSPECTIVAS

Durante a realização desta tese, tivemos a oportunidade de trabalhar com diversos modelos de dor aguda e crônica nesta instituição, o que permitirá importantes interações com outros pesquisadores no sentido de investigar novas propostas terapêuticas. Neste contexto, podemos afirmar que estabelecemos uma linha de pesquisa na área de dor e sistema purinérgico nesta instituição e investigações futuras dos mecanismos purinérgicos da transmissão dolorosa devem ser realizados.

III.4. REFERÊNCIAS

Akhondzadeh S, Safarcherati A, Amini H. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:253-259.

Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol* 2008, no prelo.

Barnstable CJ, Wei JE, Han MH. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int* 2004;45:875-884.

Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 2002;924:219-228.

Binns BC, Huang Y, Goettl VM, Hackshaw KV, Stephens Jr RL. Glutamate uptake is attenuated in spinal deep dorsal and ventral horn in the rat spinal nerve ligation model. *Brain Res* 2005; 1041:38-47.

Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett* 2008;437(3):199-202.

Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17(5):592-604.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348:125-131.

Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997;39:353-391.

Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR. A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2005;66:213-219.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007;87:659-797.

Caciagli F, Di Iorio P, Giuliani P, Middlemiss MP, Rathbone MP. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Develop Res* 2000;50:32.

Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52:77-92.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. Disruption of the P2X7 purinoreceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 2005;114:386-96.

Ciccarelli R, Di Iorio P, D'Alimonte I, Giuliani P, Florio T, Caciagli F. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 2000;29:202-211.

Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone M., D'Onofrio M, Caciagli F. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Devl Neurosci* 2001; 19:395-414.

Coggeshall RE, Carlton SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 1997;24(1):28-66.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.

Darlington DN, Gann DS. Purine nucleosides stimulate Na/K ATPase, and prolong survival in hemorrhagic shock. *J Trauma* 2005;58(5):1055-60.

Daskalopoulou SS, Tzovaras V, Mikhailidis DP, Elisaf M. Effect on serum uric acid levels of drugs prescribed for indications other than treating hyperuricaemia. *Curr Pharm Des* 2005;11:4161-4175.

Day RO, Graham GG, Hicks M, McLachlan AJ, Stocker SL, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol and oxypurinol. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:623-644.

Delander GE, Schött E, Brodin E, Fredholm BB. Temporal changes in spinal cord expression of mRNA for substance P, dynorphin and enkephalin in a model of chronic pain. *Acta Physiol Scand* 1997;161(4):509-16.

Di Iorio P, Ballerini P, Traversa U, Nicoletti F, D'Alimonte I, Kleywegt S. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004;46:356-368.

D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 2008;101(1):8-16.

Fitzgerald M. The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(7):507-20.

Frizzo MES, Lara DR, Dahm KCS, Prokopiuk AS, Swanson R, Souza DO. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 2001;12:879-881.

Frizzo MES, Soares FA, Dall'Onder LP, Lara DR, Swanson RA, Souza DO. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Res* 2003;972:84-89.

Fürst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999;48(2):129-41.

Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 2010;7:482-93.

Garcia Soriano F, Liaudet L, Marton A, Haskó G, Batista Lorigados C, Deitch EA, Szabó C. Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care Med* 2001;29:703-8.

Gardoni F, Di Luca M. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* 2006;545(1):2-10.

Gold MS. Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain* 2000; 84:117-120.

Gomez G, Sitkovsky MV. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood* 2003;102:4472-8.

Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I. Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 2010;16:519-31.

Gysbers JW, Rathbone MP. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. *Neurosci Lett* 1996;220:175-178.

Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens RL Jr. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res* 2006;173:211-216.

Haskó G, Kuhel DG, Németh ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):1013-9.

Hill RG. Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist* 2001;7(4):282-92.

Hill RG, Oliver KR. Neuropeptide and kinin antagonists. *Handb Exp Pharmacol* 2007;177:181-216.

Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 2006; 4(3):197-206.

Inkster ME, Cotter MA, Cameron NE. Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2007 561: 63-71.

Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:17179-17184.

Jiang S, Khan MI, Lu Y, Wang J, Buttigieg J, Werstiuk ES, Ciccarelli R, Caciagli F, Rathbone MP. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport* 2003;14:2463-2467.

Jiang S, Ballerini P, D'Alimonte I, Nargi E, Jiang C, Huang X, Rathbone MP, Bendjelloul F. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal* 2007;3:411-421.

Jiang S, Fischione G, Guiliani P, Romano S, Caciagli F, Diiorio P. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008;27:673-680.

Jongen JL, Haasdijk ED, Sabel-Goedknecht H, van der Burg J, Vecht ChJ, Holstege JC. Intrathecal injection of GDNF and BDNF induces immediate early gene expression in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol* 2005;194(1):255-66.

Julius D, Basbaum AL. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001 13;413(6852):203-10.

Jurkowitz MS, Litsky ML, Browning MJ, Hohl CM. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. *J Neurochem* 1998;71:535-548.

Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO. Allopurinol for refractory aggression and self-inflicted behaviour. *J Psychopharmacol* 2000;14:81-83.

Lara DR, Cruz MR, Xavier F, Souza DO, Moriguchi EH. Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int Clin Psychopharmacol* 2003;18:53-55.

Lara DR, Schmidt AP, Frizzo MES, Burgos JS, Ramirez G, Souza DO. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res* 2001;912:176-180.

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

Litsky ML, Hohl CM, Lucas JH, Jurkowitz MS. Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during hypoxia. *Brain Res* 1999;821:426-32.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999;353(9164):1607-9.

Machado-Vieira R, Lara DR, Souza DO, Kapczinski F. Therapeutic efficacy of allopurinol in mania associated with hyperuricemia. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:621-622.

Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 2006;1073-1074:444-450.

McGaraughty, S., Jarvis, M.F., 2005. Antinociceptive properties of a non-nucleotide P2X3/P2X2/3 receptor antagonist. *Drug News Perspect.* 18, 501-507.

McLennan H, Liu J. The action of six antagonists of the excitatory amino acids on neurones of the rat spinal cord. *Exp Brain Res* 1982;45(1-2):151-6.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150(699):971-9.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57(1):1-164.

Nampiarampil DE. Prevalence of chronic pain after traumatic brain injury: a systematic review. *JAMA* 2008;300(6):711-9.

Nascimento FP, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF, Macedo SJ Jr, Lima DA, Almeida RC, Ostroski RM, Rodrigues AL, Santos AR. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:590-8.

Neary JT, Zhu Q, Kang Y, Dash PK. Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. *Neuroreport* 1996;7(18):2893-6.

Neugebauer V. Glutamate receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2007;177:217-49.

Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Romero M, Sundberg C, Charles AC, Jasmin L. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist* 2009;15:450-63.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581-618.

Pettifer KM, Kleywegt S, Bau CJ, Ramsbottom JD, Vertes E, Ciccarelli R. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. *Neuroreport* 2004;15:833-836.

Pezet S, Marchand F, D'Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, Dickenson AH, Williams RJ, McMahon SB. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. *J Neurosci* 2008;28:4261-4270.

Pinelli A, Trivulzio S, Malvezzi L, Zecca L. Potentiation of the analgesic effects of tryptophan by allopurinol in rats. *Arzneimittelforschung* 1991;41:809-811.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-492.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 1999;59:663-690.

Rathbone M, Pilutti L, Caciagli F, Jiang S. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008;27(6):666-72.

Rocha APC, Kraychete DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Rev Bras Anesthesiol* 2007; 57:94-105.

Sakurada T, Katsumata K, Yogo H, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. Antinociception induced by CP 96345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the formalin and capsaicin tests. *Neurosci Lett* 1993;151:142-145.

Saute JA, da Silveira LE, Soares FA, Martini LH, Souza DO, Ganzella M. Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Neurobiol Learn Mem* 2006;85:206-212.

Sawynok J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;317:1-11.

Sawynok J, Reid A, Liu XJ. Acute paw oedema induced by local injection of adenosine A(1), A(2) and A(3) receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 1999;386:253-261.

Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 2003;69:313-340.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007;(177):3-28.

Schmidt AP, Lara DR, Souza DO. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 2007; 116:401-416.

Schmidt AP, Böhmer AE, Leke R, Schallenberger C, Antunes C, Pereira MS, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. *Brain Res* 2008;1234:50-8.

Schmidt AP, Böhmer AE, Schallenberger C, Antunes C, Pereira MS, Leke R, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by guanosine in mice. *Eur J Pharmacol* 2009b;613:46-53.

Schmidt AP, Tort AB, Silveira PP, Böhmer AE, Hansel G, Knorr L, Schallenberger C, Dalmaz C, Elisabetsky E, Crestana RH, Lara DR, Souza DO. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. *Pharmacol Biochem Behav* 2009c;91:549-53.

Schmidt AP, Böhmer AE, Antunes C, Schallenberger C, Porciúncula LO, Elisabetsky E, Lara DR, Souza DO. Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A₁ adenosine receptors. *British Journal of Pharmacology* 2009d. 156, 163–172.

Schmidt AP, Böhmer AE, Schallenberger C, Antunes C, Tavares RG, Wofchuk ST, Elisabetsky E Souza DO. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. *British Journal of Pharmacology* 2010a. 159: 1247–1263.

Schmidt AP, Böhmer AE, Soares FA, Posso IP, Machado SB, Mendes FF, Portela LV, Souza DO. Changes in purines concentration in the cerebrospinal fluid of patients experiencing pain: a case-control study. *Neurosciense Letters* 2010b. 474(2):69-73.

Schmidt AP, Paniz L, Schallenberger C, Böhmer AE, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Portela LV, Souza DO. Guanosine prevents thermal hyperalgesia in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J Pain* 2010c;11:131-41.

Siebel JS, Beirith A, Calixto JB. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyron in mice. *Brain Res* 2004;1003(1-2):61-7.

Soares FA, Schmidt AP, Farina M, Frizzo ME, Tavares RG, Portela LV, Lara DR, Souza DO. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res* 2004;1005:182-186.

Souza DO, Ramirez G. Effects of guanine nucleotides on KA binding and on adenylate cyclase activity in optic tectum and cerebellum of chicken. *J Mol Neurosci* 1991;3:39-46.

Stucky CL, Gold MS, Zhang X. Mechanisms of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(21):11845-6.

Sweitzer S, De Leo J. Propentofylline: glial modulation, neuroprotection, and alleviation of chronic pain. *Handb Exp Pharmacol* 2011;200:235-50.

Tada H, Morooka K, Arimoto K, Matsuo T. Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. *Epilepsia* 1991;32:279-283.

Tasca CI, Souza DO. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cyclic AMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. *Neurochem Res* 2000;25(2):181-8.

Tomaselli B, Podhraski V, Heftberger V, Bock G, Baier-Bitterlich G. Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 activation. *Neurochem Int* 2005;46:513-521.

Traversa U, Bombi G, Camaioni E, Macchiarulo A, Costantino G, Palmieri C, Caciagli F, Pellicciari R. Rat brain guanosine binding site. Biological studies and pseudo-receptor construction. *Bioorg Med Chem* 2003;11:5417-5425.

Traversa U, Bombi G, Di Iorio P, Ciccarelli R, Werstiuk ES, Rathbone MP. Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br J Pharmacol* 2002;135:969-976.

Tunks ER, Crook J, Weir R. Epidemiology of chronic pain with psychological comorbidity: prevalence, risk, course, and prognosis. *Can J Psychiatry* 2008;53(4):224-34.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003;424:778-783.

Vuorinen P, Pörsti I, Metsä-Ketelä T, Manninen V, Vapaatalo H, Laustiola KE. Endothelium-dependent and -independent effects of exogenous ATP, adenosine, GTP and guanosine on vascular tone and cyclic nucleotide accumulation of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1992;105(2):279-84.

Vinadé ER, Izquierdo I, Lara DR, Schmidt AP, Souza DO. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiol Learn Mem* 2004;81:137-143.

Wada Y, Hasegawa H, Nakamura M, Yamaguchi N. Anticonvulsant effect of allopurinol on hippocampal-kindled seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;42:899-901.

Wiech K, Kiefer RT, Töpfner S, Preissl H, Braun C, Unertl K, Flor H, Birbaumer N. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. *Anesth Analg* 2004;98(2):408-13.

Willis WD. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 933:142-156.

Wood JN. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. *Gut* 2004;53 Suppl 2:ii9-12.

Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-d-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1999; 44:293-299.

Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci* 2006;101(2):107-17.

Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG, Zhang X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8360-8365.

Zagnoni PG, Bianchi A, Zolo P, Canger R, Cornaggia C, D'Alessandro P. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia* 1994;35:107-112.

Zhang X, Bao L. The development and modulation of nociceptive circuitry. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16(4):460-6.

Zhuo M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:14.

Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1-3):23-37.