

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de mestrado

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de 4-fenilselenil-7-cloroquinolina em camundongos

Márcia Juciele da Rocha

Pelotas, 2016

Márcia Juciele da Rocha

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de 4-fenilselenil-7-cloroquinolina em camundongos

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

Orientadora: Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Cristiane Luchese

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R672e Rocha, Márcia Juciele da

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de 4-fenilselenil-7-cloroquinolina em camundongos / Márcia Juciele da Rocha ; Ethel Antunes Wilhelm, orientadora ; Cristiane Luchese, coorientadora. — Pelotas, 2016.

73 f. : il.

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

1. Dor. 2. Nocicepção. 3. Inflamação. 4. Quinolina. 5. Selênio. I. Wilhelm, Ethel Antunes, orient. II. Luchese, Cristiane, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

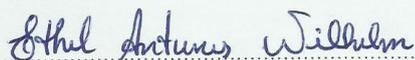
Márcia Juciele da Rocha

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de 4-fenilselenil-7-cloroquinolina em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 02/08/2016

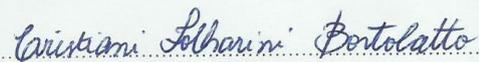
Banca examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Prof.^a. Dr.^a. Márcia F. Mesko
Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Prof.^a. Dr.^a. Cristiani F. Bortolatto
Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

**Dedico este trabalho ao meu namorado, a minha
irmã, aos meus pais e ao meu grupo de pesquisa
- Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia
(GPN).**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção e a Universidade Federal de Pelotas pela possibilidade de realizar o mestrado.

A minha orientadora Ethel A. Wilhelm, pelos ensinamentos científicos, pelos princípios passados e pela oportunidade de aprendizado. Agradeço também pelo exemplo de determinação e por ter aberto os caminhos da ciência para mim. Agradeço também a minha coorientadora Cristiane Luchese, pelo apoio e aprendizado e por ter participado dessa trajetória.

Ao grupo de pesquisa LASOL, por sintetizar o composto para a realização desse trabalho. Também ao Biotério Central por disponibilizar animais para a execução do trabalho. A CAPES pelos recursos financeiros cedidos. Muito obrigada.

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por todas as bênçãos que me proporcionaram, por serem meu amparo e força nas horas de desânimo e, também por me guiarem com carinho nos momentos de alegria. Agradeço por permitirem que este sonho pudesse se concretizar e pelas oportunidades que sempre colocam em meu caminho. Obrigada pela presença constante em minha vida!

Aos meus pais, José e Lenir, por serem pessoas maravilhosas, amorosas, companheiras, por sempre me apoiarem mesmo que isso signifique ficarmos meses sem nos vermos. A vocês por serem minha força, meus heróis e ídolos, por abrirem mão de seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, a quem devo minha vida e cada conquista adquirida. Amo vocês.

A minha maninha Ana Paula, por ser mais que uma irmã, por ser uma amiga e companheira. Obrigada pelas longas conversas de compartilhamento de vivência, me mostrando que a vida sempre é bela para quem sorri. Obrigada por irradiar essa alegria imensa em seu coração, por ser meu exemplo de vida.

Ao meu namorado Douglas, pelo apoio, amor, incentivo e compreensão, essenciais para a realização desse trabalho. Obrigada por sempre acreditar em mim. Obrigada por sempre me incentivar e continuar trabalhando em busca de meus sonhos. Sem você eu não conseguiria ter chegado até aqui.

A minha prima Juliana e amigas Jordana e Paloma, que mesmo estando longe ou perto sempre torceram por mim. Obrigada pelo apoio, amizade, paciência, carinho e por tornarem meus dias mais divertidos. Vocês são anjos sem asas na minha vida. A todos aqueles cujos nomes não estão aqui citados, mas que muito ajudaram pelo simples fato de serem meus amigos, e terem tornados meus dias mais leves.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) que contribuíram para meu crescimento e que sem a colaboração de todos não seria possível realizar este trabalho. Agradeço também pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação pela amizade e ensinamento compartilhados.

“A vida é maravilhosa se não tem medo dela”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

ROCHA, Márcia Juciele da. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de 4-fenilselenil-7-cloroquinolina em camundongos**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de condições clínicas dolorosas e inflamatórias continua a ser de grande interesse, visto que, a dor é uma das condições mais prevalentes, dispendiosas e incapacitantes na atualidade. Diversos estudos têm demonstrado que compostos quinolínicos e compostos orgânicos de selênio apresentam ações antinociceptivas e anti-inflamatórias em modelos animais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do composto 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-PSQ), uma quinolina contendo selênio, em camundongos *Swiss* machos adultos. O potencial antinociceptivo do composto foi avaliado nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina. A curva de tempo-resposta do 4-PSQ foi avaliada no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A atividade anti-endematogênica foi avaliada no edema de pata induzido por formalina, bem como, no edema de orelha induzido por óleo de cróton. Paralelamente, determinou-se a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e parâmetros de estresse oxidativo na orelha de camundongos expostos ao óleo de cróton. Avaliou-se a toxicidade aguda e as atividades exploratórias e locomotoras dos animais expostos ao 4-PSQ. O 4-PSQ (0,1 – 25 mg/kg), o meloxicam (25 mg/kg, droga de referência) ou o veículo foram administrados por via oral (p.o.) 30 minutos antes da realização dos testes de ácido acético, formalina, chapa quente e campo aberto. O 4-PSQ reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, bem como causou um aumento do tempo de latência no teste da chapa quente. Além disso, a administração do 4-PSQ inibiu ambas as fases neurogênica e inflamatória, e reduziu o edema de pata induzido pela formalina. As atividades locomotoras e exploratórias não foram alteradas no teste do campo aberto pelo tratamento. Na curva tempo-resposta, o 4-PSQ (25 mg/kg; p.o) inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético a partir de 30 minutos após sua administração perdurando seu efeito em até 4 horas. Uma vez que os processos nociceptivos e inflamatórios estão correlacionados, e a inflamação desencadeia a produção de espécies reativas, as propriedades anti-inflamatória e antioxidante do 4-PSQ foram investigadas. Assim, foi observado que o 4-PSQ reduziu a formação de edema, diminuiu a atividade da MPO e atenuou os níveis de espécies reativas induzidas pelo óleo de cróton na orelha dos camundongos. O composto também protegeu parcialmente contra a redução dos níveis de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) induzidos pelo óleo de cróton. O 4-PSQ apresentou efeitos semelhantes ao meloxicam nos testes avaliados. Além disso, a administração do composto nos camundongos não causou toxicidade aguda hepática e renal. A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o 4-PSQ exerce ação antinociceptiva e anti-inflamatória aguda em camundongos. Dessa forma, o 4-PSQ pode representar uma alternativa promissora no desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas para a dor e a inflamação.

Palavras-chave: dor; nocicepção; inflamação; quinolina; selênio; modelos experimentais.

ABSTRACT

ROCHA, Márcia Juciele da. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice.** 2016. 73 p. Dissertation (master's degree in biochemistry and bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospeção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The development of new drugs for the treatment of painful and inflammatory clinical conditions remains of great interest, since pain is one of the most prevalent conditions, costly and disabling. Studies in the literature have shown that quinoline and organoselenium compounds have pharmacological properties against nociception and inflammation in animal models. Thus, the objective of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory actions of the 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ), a quinoline containing selenium, in male adult Swiss mice. The antinociceptive potential of the compound was evaluated in writhing induced by acetic acid, hot plate and formalin tests. The time-response curve of the 4-PSQ was evaluated in writhing induced by acetic acid test. The antiedematogenic activity was evaluated in formalin-induced paw edema as well as in ear edema induced by croton oil. In parallel, it was determined the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and oxidative stress parameters in the ear of mice exposed to croton oil. It was evaluated the acute toxicity and the exploratory and locomotor activities of animals exposed to 4-PSQ. 4-PSQ (0.1 – 25 mg/kg), meloxicam (25 mg/kg, a reference drug) or vehicle were administered orally (p.o.) 30 minutes before acetic acid, formalin, hot-plate and open-field tests. 4-PSQ reduced the number of writhes induced by acetic acid, and caused an increase in latency time on the hot plate test. Furthermore, the administration of 4-PSQ inhibited both neurogenic and inflammatory phases and reduced the paw edema induced by formalin. Locomotor and exploratory activities in the open field test were not altered by treatments. The antinociceptive effect in inhibiting acetic acid-induced abdominal writhing of 4-PSQ started at 0.5 h and remained significant up to 4 h after administration. Since, nociceptive and inflammatory processes are interrelated and inflammation triggers the production of reactive species, anti-inflammatory and antioxidant properties of compound were investigated. Thus, 4-PSQ reduced edema formation, decreased the MPO activity and attenuated the reactive species levels induced by croton oil in the mice ear. The compound also partially protect against reduction of 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) levels induced by croton oil. 4-PSQ presented similar results for meloxicam in evaluated tests. Moreover, administration of the compound in mice did not cause acute hepatic and renal toxicities. From this result, it could be suggested that 4-PSQ exerts antinociceptive and anti-inflammatory acute actions in mice. Thus, 4-PSQ may represent a promising alternative for the development of future therapeutic strategies for pain and inflammation.

Keywords: pain; nociception; inflammation; quinoline; selenium; experimental models.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1	Nocicepção	23
Figura 2	Principais características das fibras aferentes primárias do tipo A e C	25
Figura 3	Projeções das fibras aferentes primárias e localização dos interneurônios nas lâminas do corno dorsal na medula espinhal	28
Figura 4	Percepção da dor pelo córtex cerebral através da transmissão do estímulo nociceptivo pelas vias ascendentes	31
Figura 5	Representação do sistema modulatório descendente da dor	33
Figura 6	Estrutura química da quinolina	42
Figura 7	Estrutura química do composto 4-((2-ciclobutil-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pirazin-1-il)metil)-7,8-difluorquinolin-2(1 <i>H</i>)-ona	43
Figura 8	a) Estrutura química do composto N ₁ -(2-aminoetil)-N ₂ -(7-trifluorometil)quinolin-4-il)etano-1,2-diamina (7-CF ₃ -MAQ); b) Estrutura química do composto N,N-(difenil)-4-ureido-5,7-dicloro-2-carboxi-quinolina (DCUKA)	44
Figura 9	Estrutura química de 7-cloroquinolina-1,2,3-triazol carboxamida	44
Figura 10	Estrutura química do composto <i>p</i> -cloro-selenoesteroide	46
Figura 11	Estrutura química de compostos orgânicos de Se derivados do ácido salicílico	47
Figura 12	a) Estrutura química do composto bis (4-metilbenzoil) disseleneto; b) Estrutura química do composto Se-fenil tiazolidina-4-carboxilato	47
Figura 13	Estrutura química dos compostos 3-fenil-4- (feniltio) isoquinolina, 1; 3-fenil-4-(fenilseleno) isoquinolina, 2; 3-fenil-4-(fenilteluro) isoquinolina, 3	48
Figura 14	Estrutura química do composto 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-PSQ)	49

Artigo Científico

Figura 1	Chemical structure of 4-PSQ	52
Figura 2	Time-response curve for 4-PSQ (25 mg/kg) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice	54
Figura 3	Effect of a single oral administration of 4-PSQ on MPO activity induced by croton oil in ears of mice	54

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

Tabela 1	Effects of 4-PSQ on nociceptive and inflammatory tests in mice .	53
Tabela 2	Effects of 4-PSQ on oxidative stress parameters in ear of mice exposed to croton oil	54
Tabela 3	Effect of 4-PSQ on open-field test in mice	55
Tabela 4	Effect of a single oral administration of 4-PSQ (25 mg/kg) on biochemical parameters in mice	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-PSQ	4-fenilselenil-7-cloroquinolina
ABTS	2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
ASIC	Canal iônico sensível ao pH
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
COX	Cicloxygenase
COX-1	Cicloxygenase-1
COX-2	Cicloxygenase-2
DCF	Dichlorofluorescein
DCHF-DA	2'7-dichlorofluorescein diacetate
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERCs	Espécies reativas de carbono
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas
ERSs	Espécies reativas de enxofre
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Reduced glutathione
HCN	Canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização
HTM	Nociceptor de alto limiar
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LTM	Nociceptor de baixo limiar
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPSH	Non-protein thiols
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
p.o.	Per oral
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
RVM	Medula rostroventromedial
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TMEM16	Proteína transmembranar 16
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRP	Receptor de potencial transitório

LISTA DE SÍMBOLOS

$<$	Menor
$>$	Maior
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual
μ	Micro
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
κ	Kappa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	DOR E NOCICEPÇÃO	20
3.2	VIAS DA NOCICEPÇÃO	22
3.2.1	TRANSDUÇÃO	23
3.2.1.1	CANAIS QUE CONTROLAM A EXCITABILIDADE DOS NOCICEPTORES	26
3.2.2	TRANSMISSÃO	27
3.2.3	PERCEPÇÃO	30
3.2.4	MODULAÇÃO	32
3.3	PROCESSO INFLAMATÓRIO	35
3.3.1	ESTRESSE OXIDATIVO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO	37
3.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA A DOR E INFLAMAÇÃO	39
3.4.1	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE QUINOLINAS E SEUS DERIVADOS	42
3.4.2	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO SELÊNIO E SEUS DERIADOS	44
3.4.3	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE DERIVADOS QUINOLÍNICOS CONTENDO SELÊNIO ..	48
4	ARTIGO CIENTÍFICO	50
5	CONCLUSÃO	58
	PERSPECTIVAS	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A dor é a sensação corporal que alerta o organismo sobre uma ameaça iminente de dano tecidual, sendo essencial para a sobrevivência e o bem-estar. A dor é considerada um fenômeno multifatorial e complexo envolvendo diferentes componentes, como o sensorial, capaz de distinguir a intensidade, localização e a duração da dor; o cognitivo, denotando atenção a dor e o afetivo-emocional provocando reação emocional à dor (BILEVICIUS; KOLESAR; KORNELSEN, 2016). Além disso, a dor pode se apresentar em diferentes intensidades (leve, moderada ou grave), formas (pontadas, ardente ou massante) e durações (transitória, aguda ou crônica), também pode ser superficial ou profunda, localizada ou difusa (VASILEIOU et al., 2009).

O componente sensorial da dor é denominado de nocicepção e inclui a detecção e localização de um estímulo potencialmente danoso. Dessa forma, a nocicepção é o processo pelo qual os estímulos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamados nociceptores (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). O corpo humano tem inúmeros nociceptores dispostos sobre a superfície (pele), em tecidos mais profundos (músculos, ossos, tendões) e em órgãos internos responsáveis pelo envio de qualquer sinal nocivo para o sistema nervoso central (SNC) (FABBRO e CRESCENTINI, 2014).

A nocicepção é mediada pela função de numerosos mensageiros moleculares intracelulares e extracelulares envolvidos na transdução do sinal nociceptivo do sistema nervoso periférico (SNP) para o SNC. Quando os nociceptores são ativados por estímulos nocivos, vários mediadores (como aminoácidos excitatórios, prótons ou citocinas) atuam sobre receptores específicos ativando cascatas de transdução do sinal. Após a transdução, esse sinal é enviado à medula espinhal para ser codificado e transmitido ao SNC para que ocorra a percepção e a modulação da dor (BRIDGESTOCK e RAE, 2013; GARLAND, 2012).

Embora a dor seja processada no sistema nervoso, o sistema imunológico também contribui para a transdução do estímulo nociceptivo através da liberação de mediadores inflamatórios que interagem com os nociceptores. Assim, a inflamação é

uma resposta imune complexa que ocorre em reação a qualquer tipo de lesão corporal, como por exemplo, ferida, infecção e queimadura visando suprimir o estímulo nocivo e promover a regeneração tecidual. Em resposta ao dano tecidual, as células residentes no tecido são ativadas, ocorre a quimiotaxia de leucócitos e a liberação de uma diversidade de mediadores inflamatórios no espaço extracelular desencadeando o processo inflamatório (LINLEY et al., 2010; REN e DUBER, 2010).

Quando os leucócitos são recrutados para o local da inflamação liberam diversas enzimas, espécies reativas (ERs) e mediadores químicos no intuito de eliminar o agente agressor. Porém, as ERs liberadas pelos fagócitos, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem induzir a inflamação através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) ativando diversas citocinas pró-inflamatórias. Isso demonstra que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no processo inflamatório (BISWAS, 2016; VERRI et al., 2012).

Dessa forma, é plausível afirmar que a dor é sujeita a vários níveis de controles bioquímicos que envolvem uma variedade de células e mediadores solúveis (REICHLING; GREEN, LEVINE, 2013). Devido a essa diversidade de fatores que contribuem para o processo doloroso, vários fármacos podem ser utilizados para o tratamento da dor, sendo os mais utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os opióides. Esses fármacos apresentam diferentes graus de eficácia para os diferentes estados da dor, porém ao mesmo tempo apresentam efeitos adversos que limitam a sua utilização (ATKINSON et al., 2013; YAKSH e WALLACE, 2011). Por isso, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da dor tem sido o foco de muitos esforços e significativos investimentos (YAKSH et al., 2015).

Na procura de compostos eficazes no tratamento da dor com baixos efeitos colaterais, os compostos quinolínicos têm chamado a atenção, uma vez que estudos revelaram propriedades farmacológicas relevantes para o tratamento da inflamação e da nocicepção em diferentes modelos animais (EL-FEKI; THABET; UBEID, 2014; MARELLA et al., 2013; WILHELM et al., 2014). Paralelamente as quinolinas, os compostos orgânicos de selênio (Se) também se destacam por suas propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias, sendo o foco de muitas pesquisas ao longo dos anos (JESSE et al., 2009; LUCHESE et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2003; SARI et al., 2016; SAVEGNAGO et al., 2006).

Entretanto, poucos estudos relatam a atividade farmacológica de compostos quinolínicos contendo Se em suas estruturas. Recentemente, um estudo demonstrou que derivados quinolínicos contendo Se apresentaram atividade inibitória da monoamina oxidase B (MAO-B) cerebral em testes *in vitro* (SAMPAIO et al., 2016). Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-PSQ) apresenta atividade antioxidante em baixas concentrações nos testes de redução de ferro, oxidação do ácido linoleico e peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio (SAVEGNAGO et al., 2013).

Considerando que: (i) a ação antioxidante é um fator contribuinte para as atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas (SARI et al., 2016), (ii) que nenhum trabalho estudou essas três propriedades relacionadas à derivados quinolínicos contendo Se, e (iii) que a toxicidade é um fator limitante dos fármacos convencionais, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 4-PSQ em diferentes modelos nociceptivos químicos e térmicos e investigar a contribuição da atividade antioxidante nestas ações e além disso, descartar qualquer toxicidade aguda hepática e renal do composto em camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 4-PSQ em camundongos, bem como sua possível toxicidade aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a curva dose-resposta e a curva tempo-resposta da ação antinociceptiva do 4-PSQ em camundongos;
- Avaliar a contribuição de mecanismos centrais nos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do 4-PSQ em camundongos;
- Investigar o efeito anti-edematogênico do 4-PSQ em modelos de inflamação em camundongos;
- Analisar o efeito do 4-PSQ na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO);
- Estudar o possível envolvimento da ação antioxidante do composto no efeito anti-inflamatório;
- Analisar o efeito do 4-PSQ sobre as atividades locomotora e exploratória;
- Verificar se o 4-PSQ causa sinais de toxicidade aguda renal e hepática;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é um fenômeno complexo, biopsicossocial que surge a partir da influência mútua de diversos sistemas neuroanatômicos e neuroquímicos, envolvendo vários processos cognitivos e afetivos. Assim, a dor foi postulada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (GARLAND, 2012). Porém, a dor é um dos sistemas responsáveis pela manutenção da homeostasia corporal, pois ela é um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que está ameaçando o bem-estar e a integridade física do organismo (JULIUS e BASBAUM, 2001).

A dor forma um sistema complexo, dinâmico, sensorial, cognitivo e comportamental que evoluiu para detectar, integrar e ordenar uma resposta protetora a entrada de estímulos nocivos (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). Por essa razão, a dor abrange pelo menos três componentes principais: (i) o componente sensorial, caracterizado pela intensidade, localização e duração da dor; (ii) o componente cognitivo, que denota atenção e avaliação ao processo doloroso; e (iii) o componente afetivo-emocional, que codifica o caráter perturbador de dor relacionando-o com emoção, excitação e comportamento de defesa (BILEVICIUS; KOLESAR; KORNELSEN, 2016; SENKOWSKI; HÖFLE; ENGEL, 2014).

O componente sensorial da dor é denominado de nocicepção e envolve o SNP e diversas estruturas cerebrais. Essas estruturas cerebrais transmitem e codificam informações nociceptivas, geram, ampliam ou reduzem a sensação dolorosa influenciando na resposta nociceptiva (VEINANTE; YALCIN; BARROT, 2013). Assim, quando estímulos nocivos afetam o corpo a partir de fontes externas ou internas, são transduzidos e transmitidos pelas vias neurais através do SNP para o SNC (GARLAND, 2012).

Normalmente, a nocicepção e a percepção da dor ocorrem com pressões e temperaturas extremas suficientes para lesionar o tecido ou também podem ser

desencadeadas por moléculas tóxicas e mediadores inflamatórios. Estes estímulos de alto limiar são detectados por neurônios sensoriais periféricos especializados, conhecidos como nociceptores. Dessa forma, eles são capazes de codificar estímulos térmicos, químicos e mecânicos em diferentes intensidades (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Porém, essas terminações nervosas são heterogêneas podendo ser classificadas de acordo com a capacidade de transduzir os estímulos nocivos. Dessa forma, os nociceptores polimodais (fibras C) respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos e os nociceptores mecanosensitivos (fibras A δ) são capazes de responder somente a estímulos mecânicos e térmicos (BRIDGESTOCK e RAE, 2013).

Vários mecanismos podem desencadear a dor, incluindo a nocicepção, inflamação, danos nos nervos, sensibilização periférica, interrupções fenotípicas, sensibilização central, excitabilidade ectópica e reorganização estrutural. Dessa forma, por envolver os mais diferentes mecanismos neurológicos, a dor pode ser distinguida em diferentes tipos, tais como, (i) dor nociceptiva, (ii) dor inflamatória, (iii) dor neuropática e (iv) dor funcional (VASILEIOU et al., 2009).

A dor nociceptiva surge como consequência de uma lesão que ativa os nociceptores nos tecidos periféricos podendo ser gerada pelo frio, calor, estímulo mecânico intenso ou químicos irritantes. A dor inflamatória está associada com um quadro inflamatório, podendo ocorrer após cirurgia ou traumas, bem como em pacientes com doenças inflamatórias, como por exemplo, artrite reumatóide. Esse tipo de dor também pode ser incluído na categoria de dor nociceptiva, apesar do sistema nociceptivo ser alterado pela inflamação crônica (MILLAN, 1999; VASILEIOU et al., 2009).

A dor neuropática implica na patologia do sistema somatossensorial, ocasionada devido a uma disfunção ou dano a um nervo ou grupo de nervos. Pode resultar tanto de lesões no SNP (dor neuropática periférica, tal como em pacientes com diabetes, neuralgia pós-herpética, etc) ou a partir de lesões no SNC (como em pacientes com lesões na medula espinhal em decorrência de diversas doenças, tais como esclerose múltipla ou acidente vascular cerebral) (BOUHASSIRA e ATTAL, 2016). Por último, a dor funcional caracterizada por processos de hipersensibilidade a um estímulo doloroso ocasionado pela resposta ou função anormal do sistema nervoso, aumentando assim, a sensibilidade do sistema sensorial. Esta categoria

inclui condições tais como a fibromialgia e síndrome do intestino irritável (VASILEIOU et al., 2009).

Além disso, a dor pode ser classificada do ponto de vista temporal, sendo dividida em dor transitória, aguda ou crônica. A dor transitória é a dor transmitida pelos nociceptores periféricos e não está relacionada a um estímulo nocivo ou lesão significativa e, neste caso, desempenha função protetora contra possíveis danos teciduais ao organismo. Em contrapartida, a dor aguda é uma resposta fisiológica normal a um estímulo nocivo, é de curta duração, geralmente persiste apenas no período de duração do dano tecidual. A dor crônica, por sua vez, permanece mesmo após o processo de recuperação da lesão tecidual ou doença ter desaparecido e caracteriza-se também pela incapacidade do organismo em restabelecer suas funções fisiológicas (LOTSCH e GEISLINGER, 2001; MILLAN, 1999).

3.2 VIAS DA NOCICEPÇÃO

A dor é iniciada através de informações sensoriais transmitidas a partir de um estímulo nocivo, porém essa transmissão pode ser ampliada ou reduzida por perspectivas afetivas, culturais e cognitivas (BRIDGESTOCK e RAE, 2013). Em condições saudáveis, esse processo é adaptável, transitório e tem um papel protetor. A dor é iniciada por eventos que ocorrem na pele, ou em tecidos profundos, tais como os músculos, os ossos, ou vísceras estimulando as terminações nervosas dos neurônios periféricos, através da ativação de receptores específicos ou canais iônicos (BRADESI, 2010).

Portanto, a nocicepção consiste nos processos de transdução, transmissão, percepção e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo. A transdução é o processo de conversão de estímulos nocivos em potenciais de ação pelos nociceptores. O processo de transmissão refere-se à transferência da informação nociceptiva através da medula espinhal ao tronco cerebral e ao tálamo. A percepção da dor ocorre ao mesmo tempo em que ocorre a integração do sinal ao nível do córtex cerebral. Este processo envolve, em seguida, várias regiões corticais, denominadas matriz da dor, que influenciam todos os componentes da sensação de dor. Por fim, a modulação que é o mecanismo pelo qual a transmissão sináptica dos sinais dolorosos é reduzida ou amplificada. Todos os processos da nocicepção estão ilustrados na Figura 1 (BRIDGESTOCK e RAE, 2013; MERTENS et al., 2015).

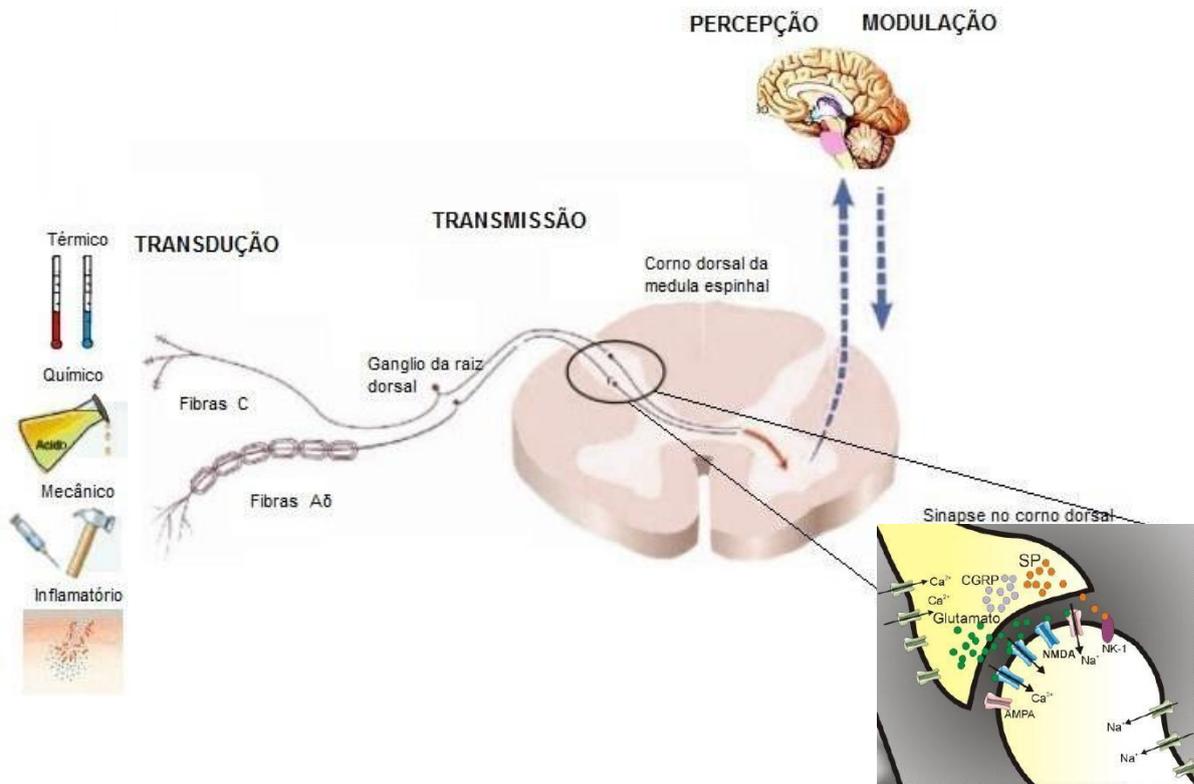


Figura 1: Nocicepção. Transdução: conversão dos estímulos nocivos térmicos, mecânicos, químicos ou inflamatórios pelas fibras A δ e/ou fibras C. Transmissão: envio da informação nociceptiva do SNP para o SNC. Percepção: ativação dos centros corticais permitindo a percepção da dor. Modulação: mecanismo pelo qual o estímulo nociceptivo pode ser aumentado ou diminuído (Adaptado de AZEVEDO, 2012, p. 36; BALBINOT, 2010, p.17).

Além disso, para que ocorra o processo de percepção da dor, três componentes do sistema nervoso precisam estar envolvidos: (i) as vias aferentes, que começam no SNP, passam pela coluna vertebral no corno dorsal e, em seguida, seguem para os centros mais elevados do SNC; (ii) os centros localizados no tronco cerebral, mesencéfalo, diencéfalo e córtex cerebral; e (iii) as vias eferentes que descem dos centros superiores a medula espinhal (MERTENS et al., 2015).

3.2.1 TRANSDUÇÃO

A nocicepção é mediada por receptores especializados, denominados de nociceptores, também conhecidos como fibras aferentes primárias, capazes de detectar qualquer sinal de alarme e responder rapidamente a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos suficientes para causar danos nos tecidos, ou responder a estímulos não nocivos, como tato e vibrações leves (STEEDS, 2013). Esses nociceptores têm uma morfologia única, chamada pseudo-unipolar, em que ambos os terminais centrais e periféricos provêm de uma haste axonal comum, reduzindo

assim o risco de fracasso na condução do estímulo nocivo. Ou seja, os corpos celulares desses neurônios estão presentes no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal separando-se em duas partes. Essa separação promove o envio de um axônio para a periferia inervando a pele e o outro axônio é destinado a realizar sinapses nos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal ou no subnúcleo caudal trigeminal. Pelo motivo deles apresentarem terminais centrais e periféricos, eles podem enviar e receber mensagens de ambas as extremidades (DJOUHRI, 2016).

As fibras aferentes primárias apresentam peculiaridades podendo variar de 0,5 a 20 μm de diâmetro e conduzir impulsos elétricos com velocidade de 0,5 a 120 m/s. Além disso, as fibras com maior diâmetro conduzem as informações a uma velocidade mais rápida que as de menor diâmetro. Elas podem ser divididas em duas categorias principais: fibras tipo A ($A\alpha$, $A\beta$ e $A\delta$), de médio a grande diâmetro e mielinizadas e as fibras do tipo C, de pequeno diâmetro e amielinizadas (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; SMITH e LEWIN, 2009).

Ao constatar que as fibras apresentam características distintas, pode-se dizer que a transmissão da dor também pode ocorrer de maneiras diferentes, podendo ser transmitida rápida ou lentamente pelas fibras $A\delta$ e C. As fibras $A\delta$ detectam e transmitem a dor rapidamente numa velocidade de 6 a 30 m/s uma vez que apresentam diâmetro médio (2-5 μm) e são levemente mielinizadas. Essas fibras estão envolvidas na dor aguda e podem responder tanto a estímulos térmicos como mecânicos. As fibras C também conduzem o estímulo nociceptivo, porém mais lentamente (velocidade de 0,5-2 m/s) por serem amielinizadas e de pequeno diâmetro (<2 μm). Além disso, elas respondem a uma grande variedade de estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos, são responsáveis pela sensação de prurido e pela dor crônica. Por outro lado, as fibras $A\alpha$ e $A\beta$ respondem a estímulos não dolorosos, como vibração, pressão e leve toque. São as fibras com maior diâmetro ($A\alpha$: 13-20 μm e $A\beta$: 6-12 μm), mielinizadas e com alta velocidade de condução (30-70 m/s) (Figura 2) (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; BRIDGESTOCK e RAE, 2013; LI et al., 2011; STEEDS, 2013).

A transdução da dor exige estímulos nociceptivos adequados que promovem a despolarização de membrana gerando um potencial de ação com amplitude e duração suficiente para desencadear uma resposta nociceptiva (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). Assim, esses estímulos ativam as fibras $A\delta$ resultando

em uma experiência subjetiva de dor forte, como um formigamento. Entretanto, se a força do estímulo aumentar, as fibras C são recrutadas, e o indivíduo experimenta uma dor intensa, ardente que continua mesmo após o término do estímulo. Esse processo de ativação das fibras ocorre em duas fases diferentes: a primeira fase conhecida como “primeira dor” ou “dor rápida”, inicia-se logo após o estímulo doloroso sendo mediada pelas fibras A δ ; e a segunda fase, conhecida como “segunda dor” ou “dor lenta”, onde o estímulo doloroso é transmitido mais lentamente pelas fibras C. Além disso, a “segunda dor” é uma experiência dolorosa mais desagradável ocorrendo uma sensação de queimação que torna mais difícil a identificação exata do local da lesão (GARLAND, 2012).

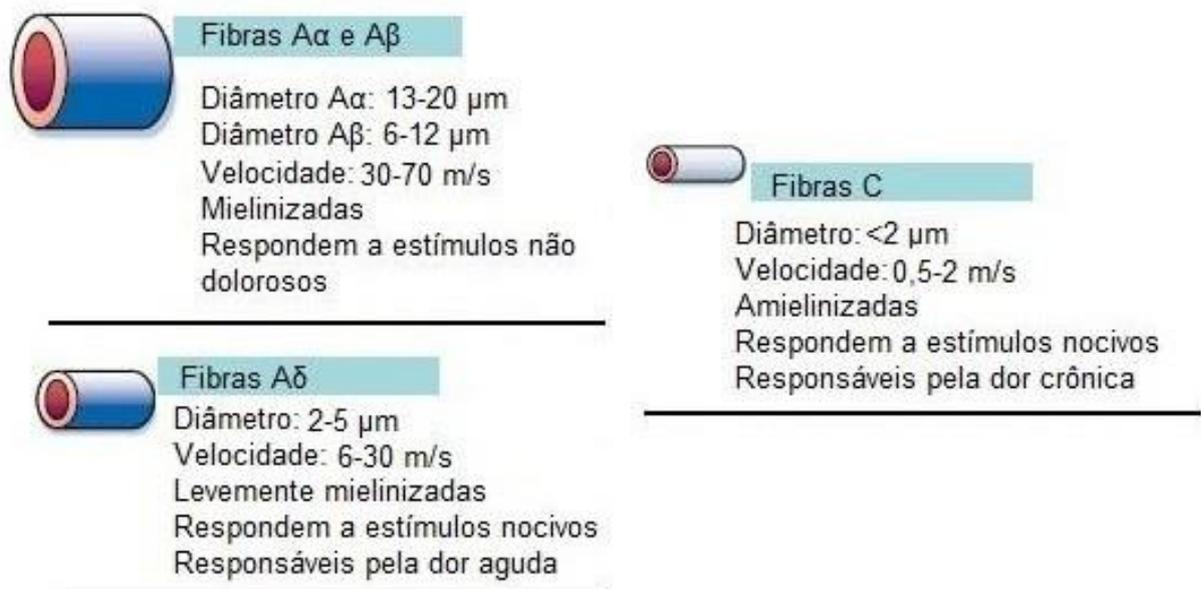


Figura 2: Principais características das fibras aferentes primárias do tipo A e C (Adaptado de JULIUS e BASBAUM, 2001, p. 204).

As fibras A δ podem ser divididas em duas classes principais. As fibras Tipo I ou nociceptores de alto limiar (HTM) que respondem a todos os tipos de estímulos mecânicos e químicos, mas respondem somente a estímulos térmicos > 50 °C. As fibras Tipo II ou nociceptores de baixo limiar (LTM) têm um limiar térmico menor em relação aos HTMs (~ 43 °C), mas um limiar mais elevado para estímulos mecânicos. Os LTMs são menos comuns e apresentam uma condutância mais lenta em relação aos HTMs (DJOUHRI, 2016). As fibras aferentes C também apresentam populações distintas, as chamadas populações peptidérgicas e não-pepidérgicas. Ambas as populações podem ser diferenciadas de acordo com a expressão diferencial de

canais iônicos que conferem sensibilidade diferente ao calor, frio, ácido ou a uma série de irritantes químicos (BASBAUM et al., 2009).

3.2.1.1 CANAIS QUE CONTROLAM A EXCITABILIDADE DOS NOCICEPTORES

Normalmente, a nocicepção é mediada por uma série de substâncias que ativam e sensibilizam os nociceptores envolvidos na transdução de sinais. Nos últimos anos, os canais iônicos, tais como receptores de potencial transitório (TRP, sigla em inglês - *transient receptor potential*), canais de adenosina trifosfato (ATP), canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC, sigla em inglês - *acid-sensing ion channel*), os canais iônicos dependentes de voltagem, canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN, sigla em inglês - *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*), proteína transmembranar 16 (TMEM16, sigla em inglês - *Transmembrane protein 16*), receptores serotoninérgicos 5-HT₃, entre outros foram identificados como receptores chaves na sinalização da dor (BENARROCH, 2015; DAI, 2016).

Os TRPs têm recebido bastante atenção, principalmente os TRPV1-4, TRPA1 e TRPM8, por atuarem como transdutores para estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Os TRPV1 também são conhecidos como receptores polimodais, pois podem ser ativados, não só pela capsaicina (substância presente na pimenta), mas também pelo calor nocivo (≥ 43 °C), pH baixo e vários outros agentes exógenos (canfora, toxina de aranha) e endógenos (metabólitos de ácido araquidônico, poliaminas). Os receptores TRPA1 também funcionam como receptores polimodais, uma vez que podem ser ativados por estímulos químicos exógenos (óleo de mostarda, alho) ou endógenos (H₂O₂, aldeídos *p*-insaturados), térmicos (sensíveis ao frio ≤ 18 °C), mecânicos e osmóticos. Os canais TRPV2, TRPV3 e TRPV4 são ativados por estímulos térmicos, porém com sensibilidade térmica diferente, sendo ativados a temperaturas ≥ 52 °C, ≥ 34 °C e ≥ 27 °C, respectivamente. Por outro lado, os receptores TRPM8 são definidos como sensores de temperatura fria (≤ 25 °C), mas podem ser ativados por compostos de arrefecimento, como o mentol (DAI, 2016; JULIUS, 2013).

Quando o estímulo nocivo é gerado por uma força mecânica, química ou térmica, também ocorre a ativação dos canais purinérgicos. A sinalização purinérgica mediada por ATP age na transmissão nociceptiva através dos receptores ionotrópicos P₂X e metabotrópicos P₂Y. Os receptores ionotrópicos são permeáveis

ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} estando envolvidos na transdução mecânica da dor somática ou visceral e podem ser expressos em neurônios do gânglio dorsal da medula espinhal e nas fibras C. Em contrapartida, os receptores metabotrópicos são expressos em todos os nociceptores e podem interagir com os TRPV1, promovendo uma resposta ao calor e aos prótons (BURNSTOCK, 2013).

Outros receptores presentes ao longo dos nociceptores são os canais iônicos dependentes de voltagem. Esses canais são proteínas transmembranares que desempenham papéis importantes na sinalização elétrica das células, responsáveis pela condução do impulso elétrico. A atividade desses canais é regulada pelo potencial de membrana de uma célula e quando esses canais são abertos permitem o movimento de íons ao longo do gradiente eletroquímico da membrana celular. Dependendo dos íons conduzidos, esses canais podem ser classificados como: (i) canais de Na^+ dependentes de voltagem, os principais determinantes da excitabilidade dos nociceptores; (ii) canais de K^+ dependentes de voltagem, que reduzem a excitabilidade dos nociceptores e regulam o potencial de repouso da membrana celular; e (iii) canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, que exercem papel na transdução sensorial através do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular em resposta à despolarização promovendo a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade neuronal (BENARROCH, 2015; JACUS et al., 2012; RUIZ e KRAUS, 2015).

Por conseguinte, os ASICs são canais ativados pelo pH ácido permitindo o influxo de Na^+ que leva a depolarização celular e acúmulo de Ca^{2+} secundário (WEMMIE; TAUGHER; KREPLE, 2013). A família TMEM16, expressa nos nociceptores, promove a despolarização da membrana pelo efluxo de Cl^- à medida que ocorre a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula auxiliando dessa maneira, na excitabilidade das terminações nervosas (OH e JUNG, 2016). Além disso, os canais HCNs o receptor serotoninérgico 5-HT_3 estão envolvidos na excitabilidade dos nociceptores, auxiliando na condução do estímulo nocivo para o corno dorsal da medula espinhal, onde o estímulo poderá ser facilitado ou inibido (CHO et al., 2012; EMERY et al., 2011; GAO et al., 2012).

3.2.2 TRANSMISSÃO

A transmissão refere-se à propagação do potencial de ação nociceptivo ao longo dos neurônios periféricos para a medula espinhal e, em seguida, para o

cérebro. Portanto, o corno dorsal da medula espinhal é o primeiro sítio de transferência sináptica na via nociceptiva e é um local importante para a integração e a modulação dos sinais aferentes periféricos. O corno dorsal contém quatro importantes componentes neuronais para a transmissão da dor: (i) os terminais centrais dos neurônios aferentes primários; (ii) os neurônios de projeção com axônios projetados para o cérebro ou neurônios específicos; (iii) os interneurônios, presentes principalmente no corno dorsal e (iv) os neurônios descendentes (CURY et al., 2011; GUO e HU, 2014; MERTENS et al., 2015).

Os neurônios aferentes primários que se projetam no corno dorsal da medula espinhal realizam sinapses com neurônios de projeção localizados nas lâminas. Por exemplo, as fibras C e fibras A δ projetam-se nas lâminas I (zona marginal) e II (substância gelatinosa), e algumas fibras A δ também terminam na lâmina V, nas quais liberam diferentes neurotransmissores. Por outro lado, as fibras A β , que respondem a estímulos inócuos, estão localizadas nas lâminas III e IV. Além disso, os interneurônios inibitórios e excitatórios responsáveis pela regulação do fluxo de informação nociceptiva estão localizados nas lâminas V e VI (Figura 3) (BRIDGESTOCK e RAE, 2013).

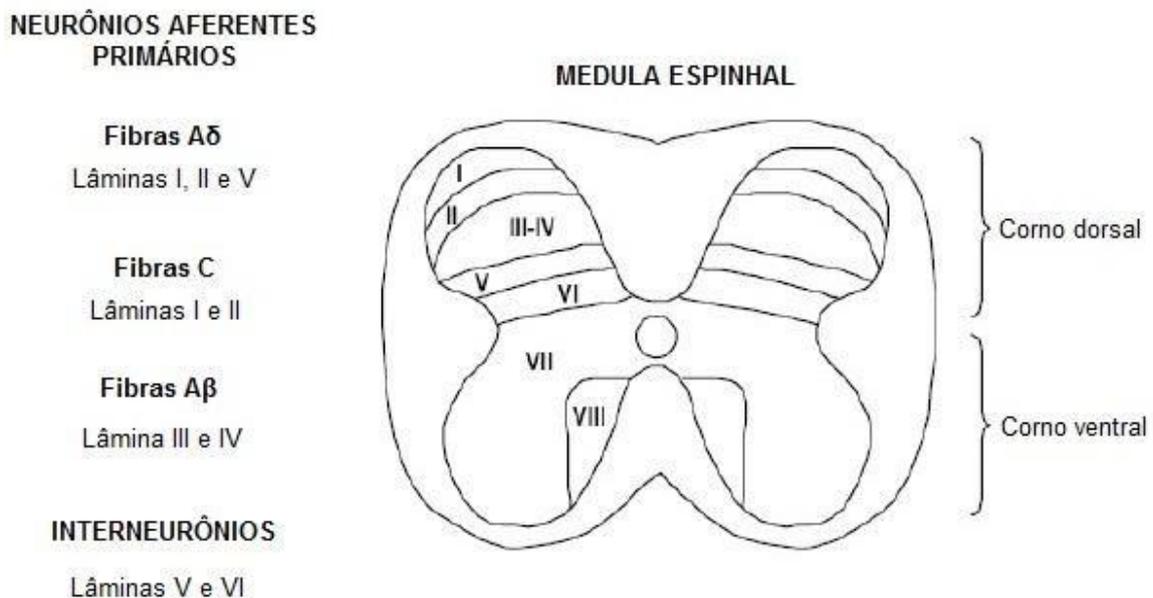


Figura 3: Projeções das fibras aferentes primárias e localização dos interneurônios nas lâminas do corno dorsal na medula espinhal (Adaptado de CRAIG e DOSTROVSKY, 1999, p. 183).

A comunicação nociceptiva entre as fibras aferentes primárias e os neurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal ocorre por meio de

neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) ou inibitórios (ácido γ -aminobutírico – GABA e glicina) e neuropeptídeos (substância P, neurotensina, entre outros). Esses mediadores químicos são armazenados e liberados tanto nas terminações nervosas das fibras aferentes primárias como nos neurônios de segunda ordem no corno dorsal permitindo assim a condução da informação nociceptiva para o SNC (MERTENS et al., 2015).

Surpreendentemente, apesar da importância na transmissão de informações para o cérebro, os neurônios de projeção constituem apenas uma pequena porção dos neurônios espinhais. Uma vez que, somente 5% dos neurônios presentes na lâmina I são os neurônios nociceptivos específicos, assim, a grande maioria de neurônios que estão presentes nessa lâmina e nas lâminas II e III são interneurônios, principalmente os inibitórios. Essa abundância de interneurônios inibitórios na medula sugere fortemente um papel funcional importante de inibição no processamento de informação da dor (GUO e HU, 2014).

Cerca de meio século atrás, Melzack e Wall (1965) propuseram pela primeira vez que os interneurônios inibitórios funcionariam como um “portão” no corno dorsal da medula espinhal, promovendo a modulação do processo nociceptivo. Portanto, o equilíbrio entre as entradas dos impulsos pelas fibras nociceptivas e não-nociceptivas primárias seriam controladas pelos interneurônios inibitórios espinhais determinando o *status* do “portão”. Dessa forma, a resposta do “portão” pode ocorrer de duas maneiras, (i) se a informação nociceptiva atingir um limiar elevado será permitido a transmissão dessa informação via neurônios nociceptivos específicos para o SNC ou (ii) o estímulo nociceptivo poderá ser inibido no “portão” do corno dorsal da medula espinhal pelos interneurônios inibitórios (MELZACK e WALL, 1965; PERL, 2011).

Se o estímulo nocivo for gerado, os neurônios de projeção localizados no corno dorsal transmitem essas informações nociceptivas para as regiões supra-espinhais através do trato espinotalâmico ou pelo trato espinorreticular. Então, por meio de ambas as vias as informações podem ser transportadas para o tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral e serem codificadas promovendo assim a percepção e a modulação da dor (BASBAUM et al., 2009).

Por outro lado, os neurônios sensoriais do gânglio trigeminal localizados na região orofacial, estão envolvidos na transdução de estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos nocivos e sinais não nociceptivos, de forma similar as fibras

localizadas na periferia. Esses sinais são transmitidos através do gânglio trigeminal para o trato espinhal do nervo trigêmeo onde, em seguida realiza sinapse com o subnúcleo caudal. O subnúcleo caudal, com semelhanças funcionais e morfológicas ao corno dorsal da medula espinhal, retransmite esses sinais gerados na região orofacial para o tálamo que os conduzem para os centros corticais superiores envolvidos na percepção da dor (RENTON e EQBUNIWE, 2015).

3.2.3 PERCEPÇÃO

A percepção do estímulo nocivo ocorre por meio da integração do sinal nociceptivo ao nível do córtex cerebral. Esse processo envolve, em seguida, várias regiões corticais, denominadas como “matriz da dor”, que influenciam em todos os componentes sensitivos da dor. Além disso, o tálamo é a área chave para o processamento da informação somatossensorial, uma vez que, a informação da lesão tecidual transmitida da medula espinhal chega primeiramente ao tálamo para posteriormente, ser encaminhada aos centros corticais (BRIDGESTOCK e RAE, 2013; STEEDS, 2013).

Os estímulos dolorosos transmitidos pelas fibras aferentes A δ e C podem ser percebidos em regiões distintas do cérebro. Quando a estimulação está vinculada as fibras C há o envio de informações através do trato paleoespinotalâmico desencadeando a ativação do córtex somatossensorial primário, do córtex cingulado anterior e do córtex insular. Por outro lado, o estímulo transmitido pelas fibras aferentes A δ através do trato neoespinotalâmico ativa somente o córtex somatossensorial primário (Figura 4) (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; GARCIA-LARREA, 2012).

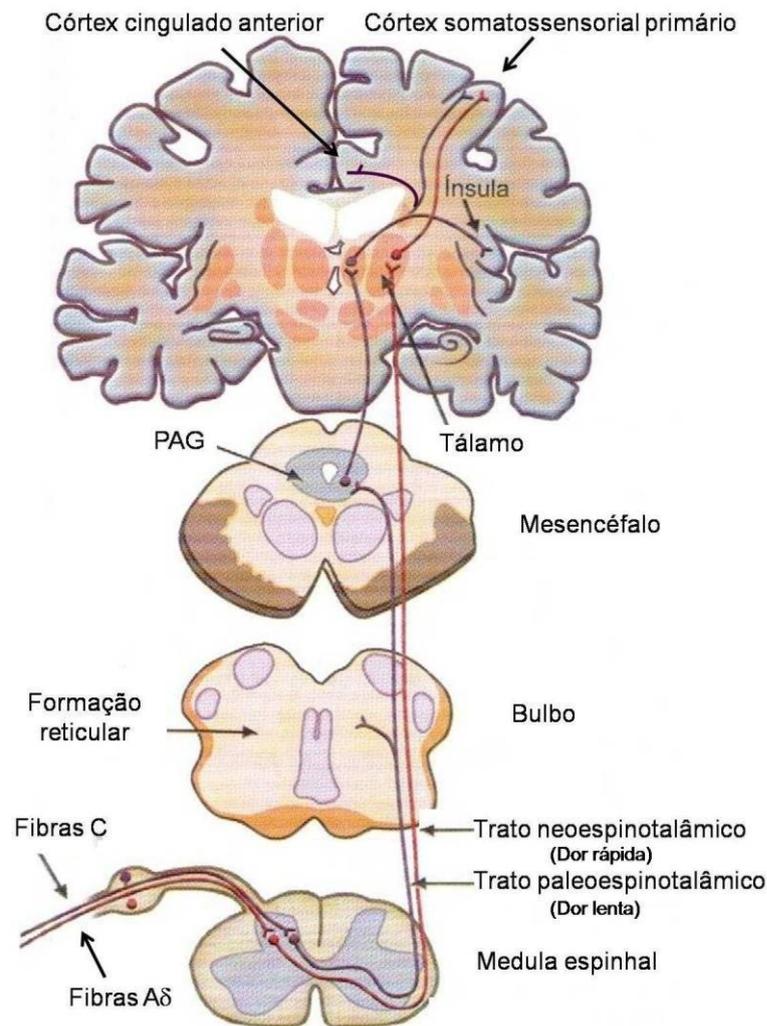


Figura 4: Percepção da dor pelo córtex cerebral através da transmissão do estímulo nociceptivo pelas vias ascendentes. As fibras A δ transmitem as informações nociceptivas através do trato neoespinalâmico para o córtex somatossensorial primário. As fibras C transmitem as informações nociceptivas através do trato paleoespinalâmico para o córtex somatossensorial primário, córtex cingulado anterior e córtex insular. PAG: substância cinzenta periaquedutal (Adaptado de RIOS, 2014, p. 29).

No sistema neoespinalâmico, interconexões entre o tálamo e o córtex somatossensorial são necessárias para adicionar precisão, discernimento e significado à sensação dolorosa. Por outro lado, as projeções paleoespinalâmicas se difundem a partir dos núcleos intralaminares do tálamo para as grandes áreas do córtex insular e córtex cingulado anterior. Estas projeções podem estar relacionadas com a atenção a dor, mudança de humor ou até mesmo com a diminuição da dor. Dessa forma, pode-se observar que a percepção do estímulo doloroso ocorre em regiões distintas do SNC refletindo em respostas sensitivas e emocionais a dor (FABBRO e CRESCENTINI, 2014; MERTENS et al., 2015).

3.2.4 MODULAÇÃO

Outro processo importante da dor a ser considerado é a sua modulação a partir do SNC para o SNP, permitindo que as estruturas cerebrais superiores sinalizem para o corno dorsal da medula espinhal regular o processo nociceptivo. Os mecanismos descendentes promovem a modulação da resposta nociceptiva por exercer suas ações em receptores presentes nas fibras primárias aferentes, bem como em neurônios do corno dorsal, nos interneurônios excitatórios ou inibitórios e neurônios de projeção (BALIKI e APKARIAN, 2015; MILLAN, 1999).

A modulação de caráter inibitório ou excitatório surge a partir de estruturas cerebrais (córtex cerebral, tálamo, hipotálamo) e é retransmitida para o corno dorsal através da medula rostroventromedial (RVM) no bulbo raquidiano. Existem vários núcleos supra-espinhais envolvidos na modulação descendente sendo que os mais conhecidos são a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o *locus coeruleus* (LC) e o núcleo magno da rafe com a formação reticular adjacente – RVM (BALIKI e APKARIAN, 2015).

As vias descendentes envolvidas na modulação da dor se originam no tronco cerebral e projetam-se para as regiões do corno dorsal nas lâminas I, II e IV. A região PAG recebe entrada de diversas áreas do SNC, incluindo o córtex cerebral, tálamo, hipotálamo constituindo o principal local modulatório descendente da dor. Essa região contém uma alta concentração de opióides endógenos e endocanabinóides que induzem a grandes efeitos analgésicos. Por sua vez, o LC e a RVM também participam da modulação nociceptiva sendo as principais fontes de noradrenalina e serotonina, respectivamente. Essas fibras descendentes projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal e realizam sinapses com os neurônios aferentes primários, os neurônios de segunda ordem ou ainda os interneurônios. Assim, a liberação desses neurotransmissores pode exercer ações inibitórias ou excitatórias conforme o subtipo de receptores em que atuam (Figura 5) (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; GARLAND, 2012; MERTENS et al., 2015; VANDERAH, 2007).

Vale ressaltar, que a excitação dos interneurônios inibitórios resulta na inibição da transmissão nociceptiva. O efeito contrário ocorre por meio da inibição descendente dos interneurônios inibitórios facilitando assim a transmissão nociceptiva. Dessa forma, é importante mencionar a complexidade do processo

modulatório da dor, uma vez que, envolve diferentes vias para que a nocicepção possa ser facilitada ou inibida (MILLAN, 2002; WESTLUND, 2006).

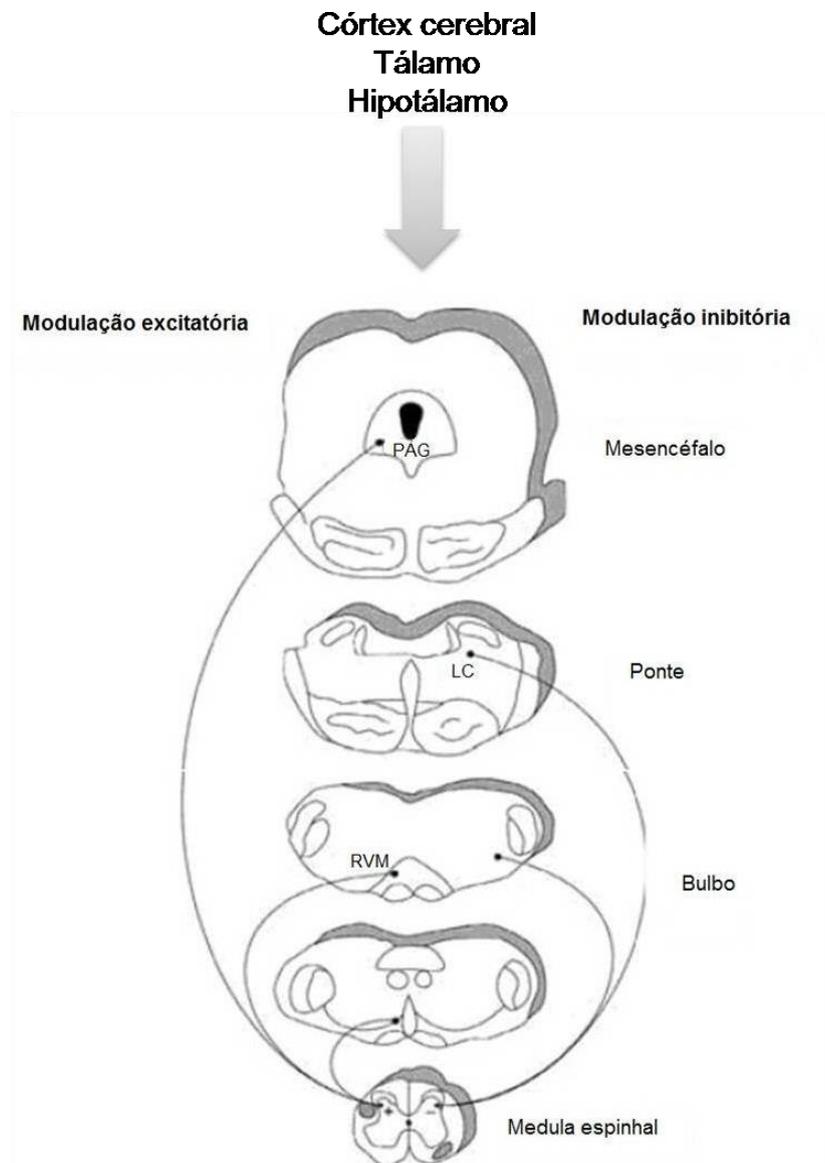


Figura 5: Representação do sistema modulatório descendente da dor. PAG: substância pareaquedutal cinzenta; LC: *lócus coeruleus*; RVM: medula rostroventromedial (Adaptado de WESTLUND, 2006, p.117).

Além do processo modulatório descendente da dor, há também o envolvimento de outras vias como, por exemplo, as fibras A α e A β , sistema gabaérgico, processo de hiperalgesia e o sistema emocional-afetivo que promovem a modulação tanto excitatória ou inibitória da dor. As fibras A α e A β promovem a modulação da dor pela inibição da transmissão sináptica no corno dorsal da medula espinhal, por outro lado, em condições patológicas podem ocorrer alterações

neuroquímicas e anatômicas dessas fibras permitindo que elas conduzam estímulos nociceptivos (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; LOPES, 2003).

O sistema gabaérgico, por sua vez, modula a nocicepção através de dois mecanismos envolvendo os receptores GABA_A. O primeiro mecanismo é conhecido como inibição pré-sináptica, onde o sistema gabaérgico impede a passagem do impulso elétrico nos terminais das fibras aferentes primárias para os neurônios de projeção. Por outro lado, a inibição pós-sináptica (segundo mecanismo) ocorre pela ação dos receptores gabaérgicos sobre os neurônios de projeção, reduzindo sua excitabilidade, controlando assim a saída do impulso nociceptivo para as áreas supra-espinhais (GUO e HU, 2014).

A modulação positiva de um estímulo doloroso pode ocorrer por meio do processo de hiperalgesia, uma vez que é uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso, sendo o resultado da sensibilização periférica e central em resposta a uma lesão tecidual persistente (STEEDS, 2013). A hipersensibilidade periférica leva a ativação de várias vias de sinalização intracelular, aumento da expressão de canais iônicos (TRPV1, TRPA1, ASIC) e aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ nos nociceptores. Como resultado dessa sensibilidade periférica, ocorre um aumento da transmissão sináptica nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal, interneurônios inibitórios responsáveis pela modulação dos impulsos e transmissão do processo doloroso morrem e as células da glia remodelam as sinapses neurais para intensificar a transmissão nociceptiva. Esses neurônios tornam-se mais sensíveis, reagem mais intensamente aos estímulos e as conexões dos neurônios de segunda ordem aumentam no SNC. Em suma, esse processo conduz a sensibilização central a partir da periferia intensificando o processo doloroso (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; CURY et al., 2011; VOSCOPOULOS e LEMA, 2010).

Além disso, a dor pode ser modulada por fatores cognitivos e emocionais, envolvendo vários processos psicológicos, como por exemplo, atenção à sensação dolorosa e a reação emocional, psicofisiológica e comportamental subsequente influenciando na percepção e modulação do estímulo doloroso. A indução da dor eleva significativamente a atividade do sistema nervoso simpático, desencadeando um aumento da ansiedade, da frequência cardíaca e da tensão muscular. As emoções negativas envolvidas com a lesão estão associadas com uma maior

ativação da amígdala, córtex cingulado anterior e córtex insular que processam o lado afetivo-emocional da dor (COWEN et al., 2015; GARLAND, 2012).

Uma característica importante é que o medo da dor está associado com uma hipervigilância, culminando num aumento dos estímulos dolorosos, ou seja, modulando positivamente a dor. Assim, as emoções negativas e o estresse prejudicam o córtex cerebral, reduzindo a capacidade de regulação da dor. Dessa forma, raiva, tristeza, estresse e medo podem resultar na dor aguda ou crônica e, por sua vez, agravar a angústia e o sofrimento (GARLAND, 2012; WIECH; TRACEY, 2009).

Dessa maneira, pode-se levar em consideração que o processo modulatório da dor envolve distintos mecanismos, como o sistema descendente que modula a dor a nível central para periférico, o sistema ascendente que promove a modulação da dor da periferia para o SNC e por último as emoções, que tornam a dor uma característica peculiar para cada ser humano (BALIKI e APKARIAN, 2015; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; COWEN et al., 2015).

3.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A dor é a sensação corporal que fornece informações sobre a ocorrência ou ameaça iminente de uma lesão, numa tentativa de manter a homeostasia. O sistema imune desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de microrganismos patogênicos, por meio de diferentes processos, tais como fagocitose e indução da inflamação. Assim, a inflamação é uma reação de proteção envolvendo as células hospedeiras, os vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores, que se destinam a eliminar a causa inicial da lesão celular, as células necróticas, os tecidos resultantes do insulto inicial para um posterior reparo tecidual (SKELDON e SALEH, 2011; VERMA; SHEIKH; AHMED, 2015).

Qualquer resposta transitória e precoce ao início da lesão, iniciada pela quimiotaxia de leucócitos, como os neutrófilos e monócitos, e por vários mediadores químicos é denominada como inflamação aguda. Sob condições normais, a inflamação aguda é essencial para proteger o organismo de patógenos invasores, assim como a promoção da remodelação e reparo do tecido. Após a eliminação do agente agressor, a inflamação é rapidamente cessada, uma vez que os mediadores inflamatórios são dissipados, os leucócitos têm uma vida curta nos tecidos e os

mediadores anti-inflamatórios são ativados controlando a resposta imune (MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2016).

No entanto, se o processo inflamatório persistir pode progredir para a fase crônica. A inflamação crônica é um processo com duração prolongada (semanas ou meses) em que a inflamação, lesão tecidual e a tentativa de reparo tecidual coexistem em combinações variadas. Essa fase inflamatória não é benéfica para os tecidos causando danos teciduais e dor, uma vez que, os mediadores pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, proteases, neuropeptídeos e fatores de crescimento liberados no local da inflamação são capazes de sensibilizar os nociceptores (LIPNIK-STANGELJ, 2013).

A coexistência de receptores para inúmeras moléculas em ambos os sistemas nervoso e imunológico sugere uma interação funcional entre esses dois sistemas distintos no qual desencadeiam a sensibilização periférica. Os mediadores inflamatórios como prostaglandinas, bradicinina, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação de plaquetas, purinas e seus derivados, prótons, radicais livres, citocinas (interleucinas – IL e fator de necrose tumoral- α – TNF- α) e neutrofinas são liberados durante o processo. É importante destacar que, alguns desses mediadores atuam somente através do sistema imunológico, enquanto outros podem ativar diretamente os nociceptores. Por fim, a participação de células do sistema imunológico residente (mastócitos e macrófagos) e células imunorrelacionadas (queratinócitos e fibroblastos) promovem o recrutamento das células do sistema imune sistêmico auxiliando também na sensibilização periférica (REICHLING; GREEN; LEVINE, 2013; VOSCOPOULOS e LEMA, 2010).

Assim, pode-se dizer que a dor e inflamação caminharam juntas, uma vez que as células do sistema imunológico, células da glia e os neurônios formam uma rede integrada em que a resposta do sistema imune modula a excitabilidade das fibras aferentes primárias (REN e DUBNER, 2010). A interação dos leucócitos, células residentes e mediadores pró-inflamatórios desencadeiam a dor durante o processo inflamatório. Porém, as fibras aferentes também afetam o tecido através da liberação de neuropeptídeos como a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a somatostatina, galactina, entre outros a partir de suas terminações sensoriais. Todo esse processo desencadeia a vasodilatação, extravasamento plasmático, migração e recrutamento de macrófagos e degranulação de mastócitos agravando a lesão tecidual. Esse fenômeno é conhecido como inflamação

neurogênica, na qual os nociceptores contribuem para a formação da inflamação periférica (LEWIS, TURNER, VINK, 2013; VERMA; SHEIKH; AHMED, 2015).

Diferentes mediadores solúveis liberados pelas células do sistema imune se ligam aos receptores presentes nas terminações pré-sinápticas e pós-sinápticas modulando as transmissões excitatórias e inibitórias. As citocinas específicas, além de ajudar na comunicação entre as células do sistema imune, desempenham um papel na sinalização cerebral para produzir alterações comportamentais neuroquímicas, neuroendócrinas, neuroimunes relacionadas com a inflamação. As citocinas tais como, IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α participam ativamente na nocicepção, por exemplo, as IL-6 liberadas durante o processo inflamatório, medeiam a liberação de prostaglandina E₂ pela cicloxigenase-2 (COX-2) a partir de células do SNC. Dessa forma, pode-se dizer que o SNC e o sistema imune estão funcionalmente conectados e integrados (REN e DUBNER, 2010).

3.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta imune complexa que ocorre em resposta a uma lesão corporal buscando suprimir o estímulo nocivo e promover a regeneração dos tecidos (LINLEY et al., 2010). Assim, a inflamação desencadeia uma sensibilidade aumentada aos estímulos dolorosos (hiperalgesia) persistindo até a cicatrização tecidual. No entanto, se o processo inflamatório for prolongado ou desregulado pode provocar danos celulares e teciduais e desencadear doenças crônicas, tais como, hepatite, asma, câncer, artrite reumatóide, entre outras (OYINLOYE; ADENOWO; KAPPO, 2015).

Um componente proeminente da inflamação é a infiltração leucocitária através de células como, neutrófilos, monócitos e linfócitos para o local da lesão. Para isso, há a participação de inúmeras moléculas de adesão e o envolvimento de citocinas. Já no local da inflamação, as células inflamatórias liberam diversas enzimas (proteases neutras, elastase, colagenase, hidrolases ácidas, lipases, etc), ERs (radical ânion superóxido – O₂⁻, ácido hipocloroso - HClO, H₂O₂, etc) e mediadores químicos (componentes do sistema complemento, citocinas, óxido nítrico – ON, etc), induzindo o dano tecidual e o estresse oxidativo (BISWAS, 2016).

Sob condições inflamatórias patológicas pode ocorrer a formação exagerada de ERs, induzindo o estresse oxidativo e lesão tecidual. Porém, à medida que

processos inflamatórios podem induzir o estresse oxidativo, o mesmo também pode levar a inflamação, através da ativação de múltiplas vias. Por exemplo, o H_2O_2 pode induzir a inflamação através da ativação do NF- κ B (BISWAS, 2016). Além disso, o estresse oxidativo desempenha um papel importante na maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e IL-8 agindo sobre as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA) também ativando a expressão do gene pró-inflamatório NF- κ B, culminando no aumento da inflamação (AGUILERA-AGUIRRE et al., 2014; ZHOU et al., 2010). Dessa forma, pode-se observar que a inflamação e o estresse oxidativo estão intimamente relacionados.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de substâncias pró-oxidantes e defesas antioxidantes (MANCINI et al., 2016; PISOSCHI e POP, 2015). As ERs podem ser de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), de enxofre (ERSs) e de carbono (ERCs), sendo as principais, as EROs e ERNs (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). Assim, essas ERs podem oxidar diferentes biomoléculas, como lipídeos, proteínas, DNA, aminoácidos, entre outras podendo levar a morte celular (BILD et al., 2013).

A produção de ERs e radicais livres pode ocorrer através de reações endógenas ou exógenas e não necessariamente desencadeiam o estresse oxidativo. As EROs são geradas constantemente, como parte da respiração celular, durante as etapas intermediárias de redução do oxigênio ao longo da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Além disso, as EROs podem também ser formadas como intermediários necessários durante várias reações enzimáticas. As formas mais encontradas são os $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , radical hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2) (AGARWAL; DURAIRAJANAYAGAM; PLESSIS, 2014; POLJSK; SUPUT; MILISAV, 2013).

Por outro lado, a produção de ERNs pode ocorrer por diferentes formas, sendo que a principal forma envolve o ON. O ON endógeno, biossintetizado através de diferentes vias, é uma molécula de sinalização gasosa envolvida na vasodilatação e neurotransmissão e é liberada por fagócitos em reações do sistema imune. Essa molécula pode reagir com o $O_2^{\cdot-}$, gerando uma espécie de nitrogênio altamente reativa, ou seja, o peroxinitrito ($ONOO^-$). Além do $ONOO^-$, outras ERNs como o dióxido de nitrogênio (NO_2) e trióxido de nitrogênio (N_2O_3) causam danos oxidativos nas biomoléculas, agindo de modo semelhante as EROs (KALUDERCIC e GIORGIO, 2016; PISOSCHI e POP, 2015).

As EROs e ERNs são normalmente geradas pelo metabolismo celular e em concentrações baixas ou moderadas desempenham papéis fisiológicos, incluindo a resposta celular a agentes infecciosos, a sinalização celular, a indução da resposta mitogênica, neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e na regulação imune (GUERRERO e ACOSTA, 2016). Para que o organismo possa manter os níveis de ERs baixos é necessário mecanismos de defesa antioxidante endógeno ou exógeno. As defesas antioxidantes são um conjunto de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que protegem as macromoléculas contra os efeitos potencialmente danosos das ERs (GODIG et al., 2014).

O sistema de defesa antioxidante endógeno inclui enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e compostos não enzimáticos como a glutathione, proteínas (ferritina, transferrina, albumina, entre outras) e sequestrantes de elétrons de baixo peso molecular como o ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico. Essas moléculas estão estritamente envolvidas na proteção celular contra os danos oxidativos, impedindo a ocorrência de ERs através do seu bloqueio ou sua captura. Por outro lado, as defesas antioxidantes exógenas são provenientes principalmente da alimentação. Os antioxidantes como as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), carotenóides e compostos fenólicos são considerados os principais antioxidantes exógenos atuando também como doadores de elétrons capazes de neutralizar as ERs formadas pelo metabolismo celular ou por alguma disfunção patológica, como a inflamação (PISOSCHI e POP, 2015; POLJSAK; SUPUT; MILISAV, 2013).

Como evidenciado, o processo inflamatório está envolvido na formação de ERs como um mecanismo de defesa contra agentes agressores, porém quando há produção exacerbada de ERs desencadeando o estresse oxidativo é necessário que o organismo disponha de um sistema de defesa, ou seja, o sistema de defesa antioxidante. Dessa forma, torna-se interessante a busca de novas terapias anti-inflamatórias com ação antioxidante para evitar danos as estruturas celulares através das ERs (NAVARRO et al., 2013; PINHO-RIBEIRO et al., 2015).

3.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA A DOR E INFLAMAÇÃO

A dor é o principal motivo, atualmente, para que pacientes procurem o serviço de saúde. Dessa forma, identificar o tipo certo de dor (nociceptiva, neuropática,

inflamatória ou funcional) e sua intensidade é necessário para escolher o tratamento farmacológico adequado. Atualmente, há várias famílias de agentes terapêuticos que têm utilidade clínica reconhecida para o tratamento da dor e apresentam diferentes graus de eficácia para seus diferentes estados, porém os efeitos adversos concomitantes muitas vezes limitam a sua utilidade. Entre estes agentes terapêuticos destacam-se os AINEs e os opióides (YAKSH et al., 2015).

Os AINEs estão entre os medicamentos utilizados com maior frequência por prescrição médica ou automedicação. Eles normalmente são indicados para o tratamento da dor devido suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética (BOZIMOWSKI, 2015). O mecanismo de ação dos AINEs para o alívio da dor é a inibição da enzima pró-inflamatória COX, responsável pela biossíntese de prostaglandinas. Como uma classe farmacológica, eles podem ser divididos em AINEs não seletivos (por exemplo, indometacina, ibuprofeno e diclofenaco) que atuam inibindo tanto a enzima COX-1 quanto a COX-2 e os AINEs inibidores seletivos da COX-2 (por exemplo, nimesulida e meloxicam) (MCCARBERG e GIBOFSKY, 2012).

Os AINEs são amplamente utilizados para a redução da dor, no entanto, preocupações surgem no que diz respeito à tolerância e a segurança desta classe farmacológica. Essa classe pode desencadear diversos efeitos colaterais como: problemas cardíacos, problemas gastrointestinais, efeitos colaterais relacionados ao SNC, reações de hipersensibilidade, alterações hematológicas, disfunção renal, entre outros efeitos adversos (DAHANVIAY; MISRA; VARMA, 2013; PHAM et al., 2016).

Atualmente, o tratamento farmacológico para dor aguda grave, dor crônica e oncológica gira em torno de analgésicos opióides. Essas drogas, derivadas do ópio (morfina, codeína e uma ampla variedade de derivados congêneres semi-sintéticos) atuam sobre os diferentes receptores opióides acoplados à proteína G. Todos os receptores opióides, quando ativados, inibem a adenilato ciclase, diminuindo a condutância de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e/ou dos canais de K^+ resultando na diminuição da atividade neural (STEIN, 2013).

Estes medicamentos apresentam efeitos muito eficazes no tratamento da dor, no entanto, eles também possuem vários efeitos secundários perigosos. Um dos principais efeitos colaterais é a dependência física que pode ser induzida pela interrupção abrupta, redução rápida da dose, diminuição do fármaco a nível

sanguíneo e/ou a administração de um antagonista. Um agravante, é que todos os opióides produzem dependência física clinicamente relevante, mesmo quando administrado durante um curto período. Além disso, o uso constante dos opióides causa tolerância através da dessensibilização dos receptores, necessitando assim a ingestão de doses mais elevadas para a obtenção do mesmo efeito. Essa classe pode também causar hiperalgesia, constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (HAYHURST e DURIEUX, 2016; JONES et al., 2016; WARNER, 2012).

No intuito de reduzir o consumo dos opióides para restringir seus efeitos colaterais, tolerância e desenvolvimento de hiperalgesia, há o emprego de medicamentos adjuvantes que envolvem o conceito de seleção e integração de agentes farmacológicos proporcionando um efeito sinérgico no controle da dor sistêmica (BIHEL, 2016). Dentre eles, há o uso de agonistas adrenérgicos α -2, anticonvulsivantes, antidepressivos, corticosteróides, calcitonina, analgésicos tópicos, canabinóides, entre outros (BABOS et al., 2013; BRIDGESTOCK e RAE, 2013).

Cada um dos fármacos adjuvantes apresenta peculiaridades para o tratamento de situações dolorosas. Os antagonistas adrenérgicos α -2 produzem efeitos antinociceptivos na coluna vertebral através da ativação deste receptor acoplado a proteína G_i (KHAN; WALSH; BRITO-DELLAN, 2011). Por outro lado, a calcitonina pode ser utilizada para aliviar a dor associada com a osteoporose e alívio da dor óssea metastática (BABOS et al., 2013). Os bisfosfonatos, em altas doses, são eficazes no tratamento de dor óssea secundária a doença metastática, semelhante à calcitonina (PORTA-SALES et al., 2016).

Os anticonvulsivantes, por sua vez, são utilizados para o tratamento da dor neuropática, uma vez que a epilepsia e a neuropatia compartilham semelhanças em sua fisiopatologia. Este grupo de fármacos atua através do bloqueio de canais de Na^+ ou de Ca^{2+} dependentes de voltagem nas fibras nervosas reduzindo assim, a excitabilidade desses neurônios (BRIDGESTOCK e RAE, 2013). Outra classe de fármacos utilizados para o tratamento da dor neuropática é os antidepressivos impedindo a recaptação de serotonina endógena e da noradrenalina no SNC, aumentando dessa forma a atividade das vias descendentes inibitórias da dor (KREMER et al., 2016). Geralmente, devido aos fatores de alto custo, risco e

inconveniente, agentes adjuvantes são pouco adicionados ao regime de opiáceos, principalmente em situações em que dor está bem controlada (BIHEL, 2016).

Tendo em vista que, os analgésicos disponíveis no mercado apresentam efeitos colaterais relevantes limitando a sua utilização e a terapia adjuvante em determinadas situações torna-se inconveniente ao uso. Dessa forma, torna-se relevante a identificação de novos agentes farmacológicos que reduzem efetivamente a dor causando pouco ou nenhum efeito colateral e com uma posologia baixa continua a ser um desafio importante para os pesquisadores (CAZACU; MOGOSAN; LOGHIN, 2015).

3.4.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE QUINOLINAS E SEUS DERIVADOS

O acervo farmacológico para o tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de fármacos analgésicos que são os AINES e os derivados do ópio, necessitando-se assim a busca de novos compostos com ação analgésica (CAZACU; MOGOSAN; LOGHIN, 2015; YAKSH et al., 2015). Dessa forma, as quinolinas (também conhecidas como 1-aza-naftaleno ou benzo[*b*]piridina) foram introduzidas na pesquisa para o tratamento da dor (GRUPTA e MISHRA, 2016; SANTOS et al., 2015). Essas quinolinas são estruturas químicas aromáticas heterocíclicas contendo nitrogênio na sua estrutura química, são bases terciárias fracas, apresentando fórmula molecular C_9H_7N e peso molecular de 129,16 g/mol (Figura 6) (MARELLA et al., 2013).

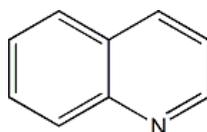


Figura 6: Estrutura química da quinolina.

Os núcleos quinolínicos, descritos primeiramente no ano de 1989 por Fournet e colaboradores, estão presentes em vários produtos naturais, como por exemplo, em alcalóides de Cinchona. Em sua pesquisa Fournet e colaboradores (1989) identificaram núcleos quinolínicos a partir da *Gilipea longiflora*, uma rutácea com propriedades medicinais encontrada na Amazônia boliviana, que se apresentou eficaz no tratamento antimalárico. A partir de sua identificação, as quinolinas começaram a ser produzidas sinteticamente mostrando ser eficazes em diversas

propriedades farmacológicas, como por exemplo, atividade antioxidante, antimalárica, antitumoral, antibacteriana, antidepressiva, neuroprotetora, anti-inflamatória, antinociceptiva, entre outras (CARTA et al., 2015; CHARVATOVA et al., 2015; PATEL et al., 2016; PESARICO et al., 2015; PISSINATE et al., 2016; QIN et al., 2015; WILHELM et al., 2014; YANG et al., 2014).

Dentre essas diferentes propriedades farmacológicas, as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias se destacam, uma vez que diferentes estudos buscam identificar quinolinas com essas propriedades (CAMPOS-BUZZI et al., 2010; GOUDARSHIVANANAVAR et al., 2015). Recentemente, Grupta e Mishra (2016) demonstraram que os derivados quinolínicos apresentam uma significativa atividade anti-inflamatória e antinociceptiva no modelo de inflamação da pata induzida por carragenina e no teste da chapa quente. Por outro lado, diferentes derivados quinolínicos inibidores das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) foram testados em modelos de nocicepção e neuropatia. Dentre eles, o composto 4-((2-ciclobutil-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pirazin-1-il)metil)-7,8-difluorquinolin-2(1*H*)-ona (Figura 7), inibidor da iNOS, destacou-se por apresentar melhores resultados no tratamento contra estímulos nociceptivos agudo e crônico (PAYNE et al., 2010).

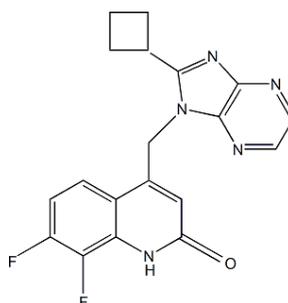


Figura 7: Estrutura química do composto 4-((2-ciclobutil-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pirazin-1-il)metil)-7,8-difluorquinolin-2(1*H*)-ona (PAYNE et al., 2010).

Além das propriedades farmacológicas antinociceptiva e anti-inflamatória Santos e colaboradores (2015) observaram que o composto *N*₁-(2-aminoetil)-*N*₂-(7-trifluorometil)quinolin-4-il)etano-1,2-diamina (7-*CF*₃-MAQ), um derivado de aminoquinolina (Figura 8a), não desencadeou toxicidade hepática, gástrica e renal em roedores. Tabakoff e colaboradores (2016) demonstraram que o composto *N,N*-(difeníl)-4-ureido-5,7-dicloro-2-carboxi-quinolina (DCUKA) (Figura 8b) reduz a inflamação crônica e a dor neuropática, possivelmente por sua ação inibitória ao receptor glutamatérgico NMDA e aos canais de Na⁺ dependentes de voltagem.

Contudo, foi também demonstrado que derivados quinolínicos apresentam ações antinociceptivas e anti-inflamatórias por outros mecanismos, como por exemplo, pelo antagonismo dos receptores vanilóides ou por serem agonistas seletivos dos receptores canabinóides (GOMTSYAN et al., 2005; MANERA et al., 2007).

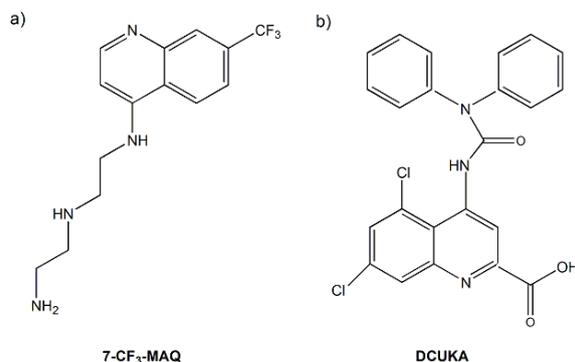


Figura 8: **a)** Estrutura química do composto N₁-(2-aminoetil)-N₂-(7-trifluorometil)quinolin-4-il)etano-1,2-diamina (7-CF₃-MAQ); **b)** Estrutura química do composto N,N-(difenil)-4-ureido-5,7-dicloro-2-carboxi-quinolina (DCUKA) (SANTOS et al., 2015; TABAKOFF et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa relatou que 7-cloroquinolina-1,2,3-triazol carboxamida (Figura 9) apresenta efeito sobre a modulação da dor central e possui propriedade anticonvulsivante, sendo uma estratégia terapêutica para o tratamento de convulsões (WILHELM et al., 2014). Dessa forma, pode-se dizer que os derivados quinolínicos têm propriedades promissoras no tratamento da nocicepção e da inflamação, e diversos estudos continuam sendo realizados no intuito de melhor compreender suas ações farmacológicas.

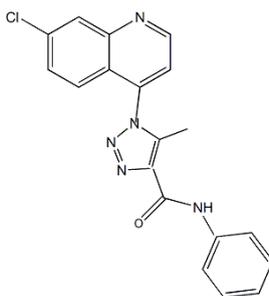


Figura 9: Estrutura química de 7-cloroquinolina-1,2,3-triazol carboxamida (WILHELM et al., 2014).

3.4.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO SELÊNIO E SEUS DERIVADOS

A descoberta do calcogênio Se pelo químico sueco Jöns Jakob Berzelius em 1817 permitiu que estudos pudessem ser realizados para avaliar a influência de suas formas inorgânicas aos organismos vivos (KIELISZEK e BLAZEJAK, 2016). O primeiro estudo, na década de 1930, constatou o potencial tóxico do Se em animais, uma vez que, este calcogênio desencadeou neuropatia em animais de grande porte

(MOXON, 1937). Inesperadamente, em 1957 Schwartz e Folz demonstram o efeito protetor do Se ao organismo, visto que a administração do Se elementar evitou danos necróticos ao fígado de camundongos (SCHWARTZ e FOLZ, 1957). Quase vinte anos mais tarde, foi confirmada a importância do Se, identificando-o como um cofator da enzima glutatona peroxidase. Porém, o Se só foi considerado essencial na dieta do ser humano em 1980, quando níveis sanguíneos muito baixos de Se foram associados a uma doença cardíaca endêmica na China (COMBS, 2015; KIELISZEK e BLAZEJAK, 2016).

A partir disso, o Se foi considerado um micronutriente essencial ao organismo podendo ser adquirido pela ingestão de diferentes alimentos. As principais fontes de Se, para o consumo alimentar, são cereais, carnes e peixes, ovos, laticíneos, castanha do Brasil, cebola e alho. Porém, a concentração de Se nos alimentos depende de sua concentração no solo de uma determinada área geográfica, bem como da capacidade das plantas em acumular este elemento. Portanto, o consumo diário médio de Se pelos seres humanos pode variar entre as mais diferentes regiões (KIELISZEK e BLAZEJAK, 2016; OGAWA-WONG; BERRY; SEALE, 2016; WROBEL; POWER; TOBOREK, 2016).

O Se é essencial para o bem-estar humano, em grande parte devido à sua potente atividade antioxidante, anti-inflamatória, e antiviral. As funções fisiológicas do Se são devidas à selenoproteínas, onde o Se é especificamente incorporado a um aminoácido, a selenocisteína (WROBEL; POWER; TOBOREK, 2016). Essas selenoproteínas desempenham diversas funções, como por exemplo, a glutatona peroxidase e a tiorredoxina redutase atuam como agentes redutores, as iodotironinas desiodases removem o iodo dos hormônios da tireóide e as selenoproteínas P são necessárias para o transporte do Se no soro (SOLOVYEV, 2015).

Sabe-se que a carência de Se está relacionada com diversas patologias, como por exemplo, depressão, problemas musculares, alterações digestivas, doenças cardiovasculares, alterações reumáticas, esclerose, câncer, entre inúmeras outras (MALAGOLI et al., 2015). Por essa razão, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu que o consumo diário de Se deve ser em torno de 70 µg/dia para homens e 60 µg/dia para mulheres (KIPP et al., 2015). Entretanto, há uma janela relativamente estreita entre a deficiência de Se e toxicidade, devendo sempre

respeitar a dose recomendada para ingestão (WROBEL; POWER; TOBOREK, 2016).

Com o decorrer do tempo, o Se passou a ser empregado em estruturas químicas, uma vez que, dentre suas diversas propriedades, uma delas é ser facilmente introduzidos e eliminados de moléculas orgânicas. Inúmeros estudos foram realizados demonstrando diversas propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de Se, tais como, antidepressiva, antioxidante, neuroprotetora, antinociceptiva, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (BORTOLATTO et al., 2013; LEITE et al., 2015; MISRA et al., 2015; ROCHA et al., 2013; VICTORIA et al., 2014).

Dentre essas inúmeras propriedades, as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de compostos orgânicos de Se vêm chamando a atenção de pesquisadores nos últimos anos (BRÜNING et al., 2014; DEL FABBRO et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2003; PINTO et al., 2008; ROSA et a., 2015; ZASSO et al., 2005). O estudo realizado por Sari e colaboradores (2016) demonstrou que *p*-cloro-selenoesteroide (Figura 10) foi eficaz na atenuação da resposta inflamatória em modelos de inflamação aguda em camundongos. Essa ação poderia ser atribuída a uma inibição da infiltração leucocitária, demonstrada pela supressão da atividade da enzima MPO. Similarmente, compostos orgânicos de Se derivados do ácido salicílico (Figura 11) apresentam atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos químicos de nocicepção em camundongos (CHAGAS et al., 2014).

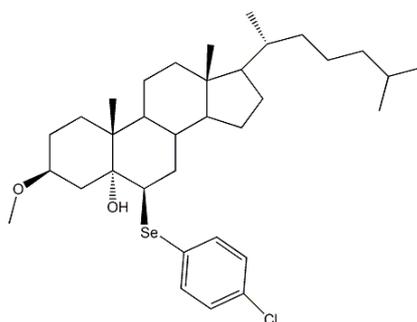


Figura 10: Estrutura química do composto *p*-cloro-selenoesteroide (SARI et al., 2016).

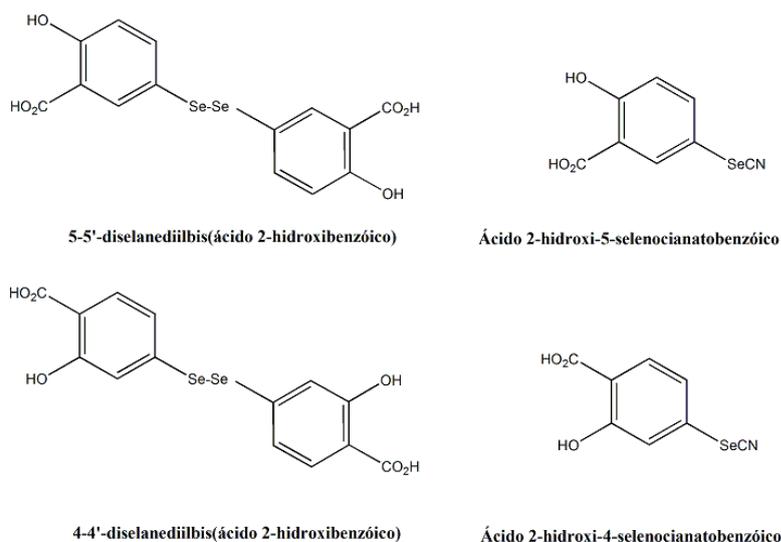


Figura 11: Estrutura química de compostos orgânicos de Se derivados do ácido salicílico (CHAGAS et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o composto *bis*(4-metilbenzoi) disseleneto (BMD) (Figura 12a) obteve respostas antinociceptivas em modelos nociceptivos mecânicos e químicos sem causar toxicidade aguda hepática e renal (DONATO et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados por Pavin e colaboradores (2011) onde o composto Se-fenil tiazolidina-4-carboxilato (Se-PTC) (Figura 12b) também apresentou propriedades antinociceptivas (em modelos de nocicepção térmica, mecânica e química) sem induzir toxicidade hepática e renal.

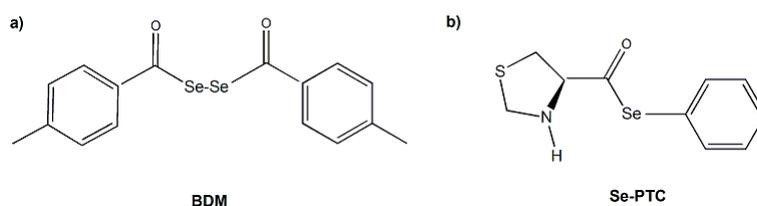


Figura 12: a) Estrutura química do composto bis (4-metilbenzoi) disseleneto; b) Estrutura química do composto Se-fenil tiazolidina-4-carboxilato (DONATO et al., 2015; PAVIN et al., 2011).

A partir disso, pode-se observar que diferentes compostos orgânicos de Se apresentam importantes ações antinociceptivas e anti-inflamatórias, bem como, baixa toxicidade, demonstrando a importância do estudo das propriedades farmacológicas do Se incorporado a estruturas químicas orgânicas (NOGUEIRA e ROCHA, 2011).

3.4.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE DERIVADOS QUINOLÍNICOS CONTENDO SELÊNIO

Mediante o exposto, pode-se dizer que há diversas propriedades farmacológicas de derivados quinolínicos e também de compostos orgânicos de Se, mostrando quão relevantes são diante das pesquisas de novos compostos (MARELLA et al., 2013; NOGUEIRA e ROCHA, 2011). Entretanto, poucos estudos relatam a atividade farmacológica de compostos quinolínicos contendo em sua estrutura o calcogênio Se.

Recentemente, Sampaio e colaboradores (2016) buscaram investigar um possível efeito inibitório de derivados de quinolinas contendo organocalcogênios (3-fenil-4-(feniltio) isoquinolina, 1; 3-fenil-4-(fenilselênio) isoquinolina, 2; 3-fenil-4-(fenilteluro) isoquinolina, 3) (Figura 13) sobre a atividade *in vitro* das enzimas monoamina oxidase A (MAO-A) e B (MAO-B) cerebrais. Nenhum dos compostos inibuiu a atividade da enzima MAO-A. Em relação a MAO-B, o composto 2 apresentou melhor resultado na inibição em relação aos outros compostos 1 e 3, indicando que o calcogênio Se influencia na atividade inibitória. Vale ressaltar, que essas enzimas regulam os níveis dos neurotransmissores do sistema monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) envolvidos no processo modulatório da dor (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; NAOI; RIEDERER; MARUYAMA, 2016).

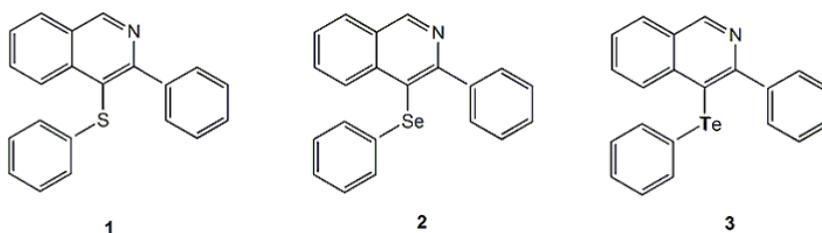


Figura 13: Estrutura química dos compostos 3-fenil-4-(feniltio) isoquinolina, 1; 3-fenil-4-(fenilselênio) isoquinolina, 2; 3-fenil-4-(fenilteluro) isoquinolina, 3 (SAMPAIO et al., 2016).

O nosso grupo de pesquisa realizou a síntese de 4-arilcalcogenil-7-cloroquinolinas, dentre elas, o 4-PSQ (Figura 14). Além disso, foi investigada a propriedade antioxidante do composto por meio de diferentes metodologias *in vitro* (SAVEGNAGO et al., 2013). O 4-PSQ demonstrou ser eficaz em reduzir o ferro do estado Fe^{3+} para Fe^{2+} , bem como, inibir a peroxidação do ácido linoleico. Similarmente, o composto foi efetivo em inibir a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de camundongos

denotando sua ação protetora contra os efeitos pró-oxidantes do ONOO^- . Dessa maneira, pode-se dizer que o 4-PSQ apresenta ação antioxidante promissora (SAVEGNAGO et al., 2013).

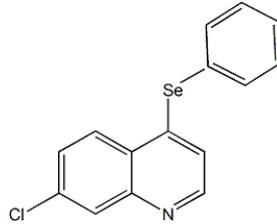


Figura 14 Estrutura química do composto 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-PSQ) (SAVEGNAGO et al., 2013).

Diante disso, é possível observar que os compostos quinolínicos e os orgânicos de Se apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, porém nenhum estudo demonstrou ambas as propriedades farmacológicas em compostos quinolínicos contendo Se em sua estrutura. Por essa razão, o presente trabalho buscou identificar as ações antinociceptiva e anti-inflamatória do 4-PSQ, uma quinolina contendo Se em camundongos.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

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

O artigo científico encontra-se publicado na revista *European Journal of Pharmacology*.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Immunopharmacology and inflammation

4-Phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions

Mikaela Pinz^a, Angélica S. Reis^a, Vanessa Duarte^a, Márcia J. da Rocha^a, Bruna S. Goldani^b, Diego Alves^b, Lucielli Savegnago^a, Cristiane Luchese^{a,*}, Ethel A. Wilhelm^{a,*}^a Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia - GPN, CCQFA/CDTec, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brazil^b Laboratório de Síntese Orgânica Limpa - LASOL - CCQFA - Universidade Federal de Pelotas, UFPel, P.O. Box 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 October 2015
Received in revised form
14 March 2016
Accepted 23 March 2016
Available online 25 March 2016

Keywords:
Nociception
Inflammation
Selenium
Quinoline
Myeloperoxidase
Mice

ABSTRACT

The development of new drugs to treat painful and inflammatory clinical conditions continues to be of great interest. The present study evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ). Mice were orally (p.o.) pretreated with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg), meloxicam (25 mg/kg, a reference drug) or vehicle, 30 min prior to the acetic acid, formalin, hot-plate and open-field tests. 4-PSQ reduced abdominal writhing induced by acetic acid and it caused an increase in latency time in the hot-plate test. 4-PSQ inhibited early and late phases of nociception and reduced the paw edema caused by formalin. Locomotor and exploratory activities in the open field test were not altered by treatments. In addition, a time–response curve was carried out by administration of 4-PSQ (25 mg/kg; p.o.) at different times before the acetic acid injection. The antinociceptive effect in inhibiting acetic acid-induced abdominal writhing of 4-PSQ started at 0.5 h and remained significant up to 4 h after administration. Indeed, the anti-inflammatory and antioxidant properties of 4-PSQ were investigated. 4-PSQ diminished the edema formation and decreased the myeloperoxidase activity and reactive species levels induced by croton oil in the ear tissue. 4-PSQ partially protected against the decrease of the 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) levels induced by croton oil. Meloxicam presented similar results for 4-PSQ in tests evaluated. These results demonstrated that 4-PSQ exerts acute anti-inflammatory and antinociceptive actions, suggesting that it may represent an alternative in the development of future new therapeutic strategies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pain and inflammation are major clinical symptoms that have negative impacts on quality of life. Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with real or potential tissue damage (IASP, 1994). These symptoms result from the action of inflammatory agents such as bradykinin, serotonin, histamine, prostaglandins, leukotrienes and nitric oxide (Li et al., 2011). This cascade of biochemical events is an attempt by the organism to protect itself against and remove injurious stimuli.

In this context, several mechanisms are involved in the pathophysiology of inflammation and nociception, such as oxidative

stress (Valerio et al., 2009). Free radical molecules and reactive oxygen species, including hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radicals and nitric oxide, have been implicated in tissue injury and increased nociceptive response (Halliwell, 2007; Khalil and Khodr, 2001). Reactive oxygen species are produced physiologically, but an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defenses causes oxidative stress, and consequently cell damage (Cadenas and Davies, 2000; Watson, 2013).

Several drugs are available to treat pain and inflammation (Kiefer and Dannhardt, 2002; Lacy et al., 2008). However, these drugs have major side effects limiting their use. Thus, there is a considerable need to discover and develop treatments for pain and inflammation. In this way, many efforts have been made by our research group to search for new molecules with antinociceptive and anti-inflammatory properties (Donato et al., 2015; Janiski et al., 2012; Villalba et al., 2014; Wilhelm et al., 2014).

Considering that quinolines are synthetic or natural heterocyclic compounds with interesting biological activities (Bhasin,

* Correspondence to: Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospeção (PPGBioq), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas CEP 96010-900, RS, Brazil.

E-mail addresses: cristiane_luchese@yahoo.com.br (C. Luchese), ethelwilhelm@yahoo.com.br (E.A. Wilhelm).

2010; Manera et al., 2015; Mantovani et al., 2014; Marella, 2013; Naik et al., 2009; Parameswaran et al., 2013; Shtrygol' et al., 2012), our studies targeted this class of compounds. In fact, our research group described the synthesis and pharmacological properties of quinoline derivatives (Saraiva et al., 2016; Savegnago et al., 2013; Wilhelm et al., 2014). One of the synthesized compounds, 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ), revealed potential antioxidant action, without toxicological effects (Savegnago et al., 2013). In view of our continued interest in the pharmacology of this compound, the objective of this study was to evaluate anti-inflammatory and antinociceptive effects of 4-PSQ, a quinoline derivative containing selenium, in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The behavioral experiments were conducted using male adult Swiss mice (25–35 g). Animals were kept in a separate animal room, in a 12 h light/dark cycle (with lights on at 6:00 a.m.), at a room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water. Mice were used only once throughout the experiments. The experiments were performed according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Pelotas, Brazil (CEEA1987).

The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drugs treatments.

2.2. Drugs

4-PSQ (Fig. 1) was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described by Savegnago et al. (2013). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with 4-PSQ assigned structure. The chemical purity of 4-PSQ (99.9%) was determined by GC/MS. Meloxicam was obtained commercially and it was used as a reference drug. 4-PSQ was dissolved in canola oil, while meloxicam was dissolved in 0.9% saline solution. The mice received oral (p.o., administered by intragastric gavage) or intraperitoneal (i.p.) drugs at a constant volume of 10 ml/kg body weight. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.3. Experimental models

2.3.1. Acetic acid-induced abdominal writhing test and time–response curve

Antinociceptive activity of 4-PSQ was evaluated using an acetic acid-induced abdominal writhing test and carried out according to the procedures described previously (Correa et al., 1996; Nogueira et al., 2003). Mice were pretreated with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg, p.o.), meloxicam (25 mg/kg, p.o.) or vehicle 30 min prior to acetic acid

injection (1.6%, i.p.). After acetic acid injection, mice were individually placed in separate boxes and the total number of abdominal contractions (writhing movements with full extension of both hind paws) was counted during 20 min. In addition, a time–response curve was carried out by administration of compound (25 mg/kg; p.o.) to mice at 0.25, 0.5, 1, 4 and 24 h before the acetic acid injection.

2.3.2. Formalin test

The formalin test was carried out as described by Hunskaar and Hole (1987). Mice were pretreated with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg, p.o.), meloxicam (25 mg/kg, p.o.) or vehicle. After 30 min, animals received the intraplantar (i.pl.) administration of formalin (2.5%, v/v; 20 μl /paw) into the right hind paw and saline solution (0.9%, w/v; 20 μl /paw) into the left paw left. The animals were individually placed in an acrylic box and duration of paw licking was recorded at 0–5 min (first phase) and 15–30 min (second phase). The first phase is regarded as a neurogenic mechanism and the second phase as an inflammatory mechanism (Oyemitan et al., 2008). After the observation period, mice were killed and the edema was measured. Paws were removed and weighed. The paw edema was measured by comparing the difference between the weight of the formalin-injected paw and the weight of the contralateral paw (saline-treated paw).

2.3.3. Hot-plate test

The hot-plate test was carried out as described by Woolfre and MacDonald (1944). It is a behavioral model of nociception where behaviors such as jumping and hind paw-licking are elicited following a noxious thermal stimulus. For this, animals were placed in a glass box on a heated metal plate maintained at 55 ± 1 °C. The latency of nociceptive responses such as licking or shaking one of the paws or jumping was recorded as the reaction. In order to avoid damage to the paws of animals, time standing on the plate was limited to 45 s. The change in thermal withdrawal latencies was recorded before treatment and at 30 min after treatment with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg, p.o.), meloxicam (25 mg/kg, p.o.) or vehicle. The delta of latency (Δt) was calculated for each animal: Δt (s) = post-treatment latency – pretreatment latency.

2.3.4. Ear edema induced by croton oil

Based on the results obtained in the nociception models, to extend our knowledge of the pharmacological properties of 4-PSQ, it was tested in an inflammatory model. Ear edema was induced by croton oil based on previous studies (Romay et al., 1998; Tubaro et al., 1986) with some modifications. 4-PSQ (0.1–25 mg/kg, p.o.), meloxicam (25 mg/kg, p.o.) or vehicle was administered 30 min prior to topical application of 2.5% croton oil in acetone (20 μl /ear) in the right ear of each mouse. The same volume (20 μl) of acetone was applied to the left ear. Four hours after the application of the phlogistic agent, mice were euthanized and both ears were cut at the base and the weight difference between the samples of the control ear (left) and the croton oil-treated ear (right) was established on an analytical balance (Swingle et al., 1981). The results obtained are represented as weight (mg). Subsequently, ears were used to determine the myeloperoxidase (MPO) activity, reactive species (RS) and non-protein thiols (NPSH) levels and 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging activities.

2.3.4.1. MPO assay. MPO activity was assayed according to the method previously described (Suzuki et al., 1983) with some modifications. The plugs of the ears obtained in the test described above (item 2.3.4.) were homogenized in potassium phosphate buffer (20 mmol/l, pH 7.4) containing ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mmol/l). After the homogenization, samples were

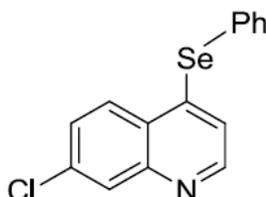


Fig. 1. Chemical structure of 4-PSQ.

centrifuged at 900g at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S₁). Then, S₁ fraction was centrifuged again at 20,000g at 4 °C for 15 min to yield a final pellet (P₂) that was resuspended in medium containing potassium phosphate buffer (50 mmol/l, pH 6.0) and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5%). Samples were finally frozen and thawed three times for the later enzymatic assay. For the MPO activity measurement, an aliquot of resuspended P₂ (100 µl) was added to a medium containing the resuspension medium and N,N,N',N'- tetramethylbenzidine (1.5 mmol/l). The kinetic analysis of MPO was started after H₂O₂ (0.01%) addition, and color reaction was measured at 655 nm at 37 °C. Results are expressed as optic density (OD)/mg protein/min.

2.3.4.2. RS measurement. The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method, using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay (Loetchutin et al., 2005). Four h after croton oil application, ear tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1:10, w/v), and centrifuged at 2400g for 10 min at 4 °C to obtain the low-speed supernatant (S₁). S₁ (10 µl) was incubated with 10 µl of DCHF-DA (1 mM). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation), 15 min after the addition of DCHF-DA to the medium (Shimadzu RF-5301PC fluorometer). RS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence.

2.3.4.3. NPSH assay. Ear samples were collected and homogenized with 200 µL of 0.02M EDTA. The homogenate was mixed with 25 µL of trichloroacetic acid 50% and was homogenized three times over 15 min. The mixture was centrifuged (15 min × 1500 g × 4 °C). The supernatant was added to 200 µl of 0.2M TRIS buffer, pH 8.2, and 10 µl of 0.01M 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). After 5 min, the absorbance was measured at 412 nm against a blank reagent with no supernatant. A standard reduced glutathione (GSH) curve was formed. The results are expressed as NPSH per g of tissue (Sedlak and Lindsay, 1968).

2.3.4.4. DPPH and ABTS radicals scavenging activity assay. Ear tissue was collected and immediately homogenized with 500 µl of 1.15% KCl, and centrifuged (10 min × 200 g × 4 °C). The ability of the sample to resist oxidative damage was determined as free radical scavenging ability by ABTS and DPPH assays (Re et al., 1999; Choi et al., 2002). For ABTS assay, ABTS solution was diluted with phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) to an absorbance of 730 nm. Then, 1.0 ml of diluted ABTS solution was mixed with 20 µl of supernatant (S₁). After 6 min, the absorbance was measured at 730 nm. For DPPH assay, DPPH solution was diluted with ethanol to an absorbance of 517 nm. Then, 1.0 ml of diluted DPPH solution

was mixed with 20 µl of S₁. After 6 min, the absorbance was measured at 517 nm. The results were equated against an ascorbic acid standard curve. The results are expressed as equivalents of ascorbic acid per gram of tissue weight in both assays.

2.3.5. Open field test

The spontaneous locomotor and exploratory behaviors were assessed in the open-field test (Walsh and Cummins, 1976). The open-field was made of plywood and surrounded by 30 cm-high walls. The floor of the open-field, 45 cm long and 45 cm wide, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). Mice were pretreated with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg, p.o.), meloxicam (25 mg/kg, p.o.) or vehicle. Thirty min after the treatment, each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (number of time rearing on the hind limbs) activities.

2.3.6. Acute toxicity

Mice received a single oral dose of 4-PSQ (25 mg/kg; p.o.) or vehicle. After drug administration, animals were observed for up to 72 h to determine the lethal potential of this compound. After this time of exposure, mice were anesthetized to draw blood by heart puncture and place it in tubes containing heparin. Plasma was obtained by centrifugation at 900g for 10 min (hemolyzed plasma was discarded) and used for biochemical assays, which were performed with commercial test kits. Plasma aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, used as the biochemical markers for early acute hepatic damage, were determined by the colorimetric method (Reitman and Frankel, 1957). Renal function was analyzed by determining plasma urea and creatinine (Mackay and Mackay, 1927).

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test when appropriate. Statistical analysis of acute toxicity data was performed using a non-paired *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Acetic acid-induced abdominal writhing test and time-response curve

The results depicted in Table 1 show that 4-PSQ caused a significant decrease in the amount of abdominal writhing when compared to the induced group (ANOVA: $F_{(5,37)}=4.713$, $P < 0.001$).

Table 1
Effects of 4-PSQ on nociceptive and inflammatory tests in mice.

Groups	Acetic acid test	Formalin test			Hot-plate test	Croton oil
	Number of writhing	First phase-licking (s)	Second phase-licking (s)	Paw edema (mg)	Δ Latency (s)	Ear edema (mg)
Induced	70.0 ± 5.7	50.1 ± 3.3	163.2 ± 9.0	56.2 ± 2.6	-1.1 ± 5.5	30.2 ± 1.3
4-PSQ						
0.1 mg/kg	48.1 ± 7.3	43.2 ± 5.6	93.6 ± 29.7 ^a	40.5 ± 3.2 ^a	2.1 ± 1.7	22.8 ± 2.4 ^a
1 mg/kg	34.4 ± 9.6 ^a	23.8 ± 5.0 ^{bd}	69.1 ± 28.8 ^b	37.8 ± 5.8 ^a	14.3 ± 0.8 ^a	18.9 ± 3.2 ^a
5 mg/kg	23.1 ± 10.8 ^b	12.7 ± 2.9 ^{cd}	26.9 ± 17.7 ^c	32.8 ± 3.8 ^b	12.8 ± 1.8 ^a	21.6 ± 3.4 ^a
25 mg/kg	16.0 ± 2.9 ^b	1.4 ± 0.8 ^{cd}	0.1 ± 0.1 ^{cd}	21.4 ± 4.2 ^c	19.0 ± 3.2 ^b	13.3 ± 2.1 ^c
Meloxicam	35.0 ± 12.3 ^a	4.7 ± 8.0	95.6 ± 11.9 ^a	38.8 ± 6.5 ^a	9.0 ± 2.0	14.1 ± 1.8 ^c

Each column represents the mean ± S.E.M. of 7–10 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline. Meloxicam was used at the dose of 25 mg/kg. Hot-plate test uses a noxious thermal stimulus. Asterisks denote significance levels when compared to the induced group (^a) $P < 0.05$; (^b) $P < 0.01$; (^c) $P < 0.001$. ^d denotes $P < 0.05$ when compared to the meloxicam group (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test).

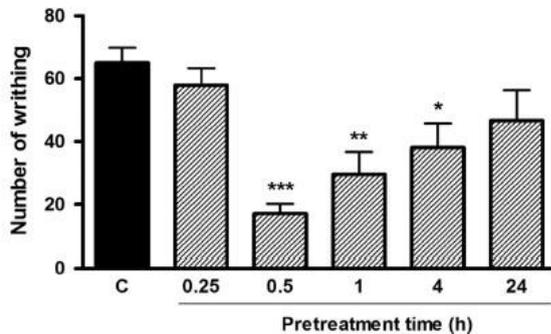


Fig. 2. Time-response curve for 4-PSQ (25 mg/kg) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline. Asterisks denote significance levels when compared to the induced group (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test) (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$.

4-PSQ at the doses of 1, 5 and 25 mg/kg was effective in reducing the abdominal writhing induced by acetic acid in 56% ($P < 0.05$), 67% ($P < 0.01$) and 77% ($P < 0.001$), respectively. 4-PSQ produced dose-dependent antinociception following p.o. administration. Meloxicam (25 mg/kg), a reference drug, reduced acetic acid-induced abdominal writhing around 50% ($P < 0.05$).

In the time-response curve, the antinociceptive effect in inhibiting acetic acid-induced abdominal writhing of 4-PSQ started at 0.5 h and remained significant up to 4 h after administration (ANOVA: $F_{(5,54)} = 7.251$, $P < 0.001$) (Fig. 2).

3.2. Formalin test

4-PSQ pretreatment showed dose-dependent antinociceptive activity when compared to the induced group in the first (ANOVA: $F_{(5,45)} = 16.06$, $P < 0.001$) and the second (ANOVA: $F_{(5,43)} = 8.12$, $P < 0.001$) phases of the test (Table 1). In the first phase, the animals pretreated with 4-PSQ at the doses of 1, 5 and 25 mg/kg reduced the licking time by 52% ($P < 0.01$), 75% and 97% ($P < 0.001$), respectively (Table 1). Meloxicam (25 mg/kg), a reference drug, did not alter the licking time induced by formalin in the first phase ($P > 0.05$).

As demonstrated in Table 1, in the second phase, 4-PSQ pretreatment, at the doses of 0.1, 1, 5 and 25 mg/kg, reduced the licking time when compared to the induced group, by 43% ($P < 0.05$), 58% ($P < 0.01$), 83.5% and 99.9% ($P < 0.001$), respectively. The group pretreated with meloxicam (25 mg/kg) decreased the licking time by 41% ($P < 0.05$). At the dose of 25 mg/kg, 4-PSQ was more effective in reducing the licking time in the second phase of formalin than meloxicam (25 mg/kg).

Pretreatment with 4-PSQ markedly reduced the paw edema formation (ANOVA: $F_{(5,41)} = 5.935$, $P < 0.001$) induced by formalin injection in 28% (0.1 mg/kg; $P < 0.05$), 33% (1 mg/kg; $P < 0.05$), 41.5% (5 mg/kg; $P < 0.01$) and 62% (25 mg/kg; $P < 0.001$).

When compared to the induced group (Table 1), 4-PSQ effect was dose-dependent. Meloxicam (25 mg/kg) reduced the paw edema formation induced by formalin by 31% ($P < 0.05$; Table 1).

3.3. Hot-plate test

As verified in Table 1, the pretreatment with 4-PSQ increased response latency to thermal stimulus when compared to the induced group (ANOVA: $F_{(5,37)} = 6.496$, $P < 0.001$). 4-PSQ showed significant antinociceptive activity at the doses of 1, 5, and 25 mg/kg, increasing the latency time by 14.3% ($P < 0.05$), 13% ($P < 0.05$)

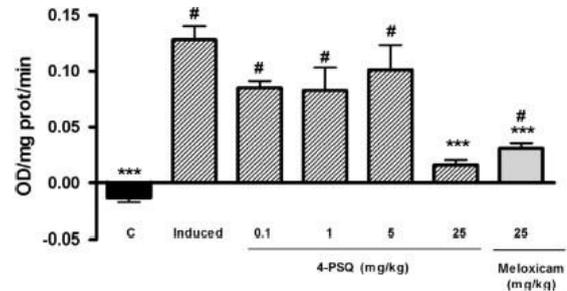


Fig. 3. Effect of a single oral administration of 4-PSQ on MPO activity induced by croton oil in ears of mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline. Asterisks denote significance levels when compared to the induced group (***) $P < 0.001$ and # denotes $P < 0.01$ when compared to the control group (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test).

and 19% ($P < 0.01$), respectively. 4-PSQ effect was dose-dependent. Meloxicam (25 mg/kg), a reference drug, did not alter response latency to thermal stimulus when compared to the control group ($P > 0.05$).

3.4. Ear edema induced by croton oil

Regarding the ear edema induced by croton oil, data are shown in Table 1. The anti-edematogenic effect of 4-PSQ was verified at all doses tested (0.1–25 mg/kg) (ANOVA: $F_{(5,54)} = 6.273$, $P < 0.001$) and this effect was dose-dependent. The inhibition of ear edema was 24% (0.1 mg/kg; $P < 0.05$), 37% (1 mg/kg; $P < 0.05$), 28% (5 mg/kg; $P < 0.05$) and 44% (25 mg/kg; $P < 0.001$). The similar anti-edematogenic effect was observed in the animals pretreated with meloxicam (53%; 25 mg/kg; $P < 0.001$).

3.4.1. MPO assay

Croton oil significantly increased the MPO activity (1071%) in ears of mice when compared to the control group. The results presented in Fig. 3 showed pretreatment with 4-PSQ (25 mg/kg) or meloxicam (25 mg/kg) protected against the increase in MPO activity in mouse ear induced by croton oil (ANOVA: $F_{(6,63)} = 15.77$, $P < 0.0001$). 4-PSQ effect was dose-dependent.

3.4.2. RS measurement

As shown in Table 2, croton oil application significantly increased (37%) the RS levels in ears of mice when compared to the control group. The pretreatment with 4-PSQ (25 mg/kg) or meloxicam (25 mg/kg) protected against the increase of the RS levels in mouse ear induced by croton oil (ANOVA: $F_{(3,26)} = 4.448$, $P < 0.05$).

Table 2
Effects of 4-PSQ on oxidative stress parameters in ear of mice exposed to croton oil.

Groups	RS (arbitrary units)	NPSH (nmol NPSH/g of tissue)	DPPH (equivalents of ascorbic acid/g of tissue)	ABTS (equivalents of ascorbic acid/g of tissue)
Control	41.6 \pm 1.8 ^b	1.6 \pm 0.2 ^a	54.4 \pm 3.8 ^c	108.6 \pm 7.7 ^c
Induced	57.1 \pm 1.3 ^d	0.7 \pm 0.1 ^d	14.6 \pm 4.3 ^d	54.2 \pm 2.5 ^d
4-PSQ	48.2 \pm 5.3 ^a	1.2 \pm 0.3	32.9 \pm 6.6 ^d	74.3 \pm 5.8 ^d
Meloxicam	45.8 \pm 2.0 ^a	0.9 \pm 0.2	24.5 \pm 4.8 ^d	59.6 \pm 1.8 ^d

Each column represents the mean \pm S.E.M. of 6 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline. Meloxicam and 4-PSQ were used at the dose of 25 mg/kg. Asterisks denote significance levels when compared to the induced group (^a) $P < 0.05$; (^b) $P < 0.01$; (^c) $P < 0.001$. ^d denotes $P < 0.05$ when compared to the control group (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test).

3.4.3. NPSH assay

Our results revealed that the application of croton oil induced a reduction (56%) of NPSH levels in ears of mice (ANOVA: $F_{(3,20)}=3.130$, $P < 0.05$). However, pretreatment with 4-PSQ (25 mg/kg) or meloxicam (25 mg/kg) was not effective in protecting against this alteration ($P > 0.05$) (Table 2).

3.4.4. DPPH and ABTS radicals scavenging activity assay

Croton oil significantly decreased the DPPH (73%) (ANOVA: $F_{(3,21)}=11.32$, $P < 0.0001$) and ABTS (50%) (ANOVA: $F_{(3,20)}=23.34$, $P < 0.0001$) levels in ears of mice, when compared to the control group (Table 2) (ANOVA: $F_{(6,63)}=15.77$, $P < 0.0001$). 4-PSQ pretreatment (25 mg/kg) partially protected against the decrease in the DPPH and ABTS levels induced by croton oil ($P < 0.05$). Meloxicam (25 mg/kg) was not effective in protecting against the decrease of these synthetic radicals induced by croton oil.

3.5. Open field test

Pretreatment of mice with 4-PSQ (0.1–25 mg/kg) or meloxicam (25 mg/kg) did not cause any significant change in the number of crossings (ANOVA: $F_{(5,42)}=1.885$, $P > 0.05$) or rearings (ANOVA: $F_{(5,36)}=1.761$, $P > 0.05$) in the open-field test (Table 3).

3.6. Acute toxicity

As demonstrated in Table 4, a single oral administration of 4-PSQ (25 mg/kg) did not cause the death of exposed mice. The activities of plasma ALT, AST and the levels of urea and creatinine remained unaltered after 4-PSQ treatment when compared to those of mice in the control group ($P > 0.05$).

4. Discussion

The present study addressed, for the first time, the 4-PSQ antinociceptive effect in chemical and thermal nociception models, without causing locomotor disturbances. This effect was also associated with an anti-inflammatory action of 4-PSQ in mice.

At the outset, 4-PSQ effects against abdominal writhing induced by acetic acid and the time-response curve were checked. 4-PSQ reduced the abdominal writhing induced by acetic acid, demonstrating the important antinociceptive and/or anti-inflammatory potential. Of particular importance, the present findings also demonstrated that the 4-PSQ effect starts at 0.5 h and remains significant up to 4 h after administration, revealing a rapid and long-lasting action. Although the writhing test has a poor specificity, it is sensitive and predictive for screening of new antinociceptive and anti-inflammatory drugs (Fischer et al., 2008; Le Bars et al., 2001). Acetic acid-induced abdominal writhing in mice is a result of a chemically induced acute peripheral inflammatory

Table 4

Effect of a single oral administration of 4-PSQ (25 mg/kg) on biochemical parameters in mice.

	Control	4-PSQ (25 mg/kg)
AST (U/l)	133.2 ± 23.8	100.5 ± 22.2
ALT (U/l)	40.1 ± 3.7	38.7 ± 4.2
Urea (mg/dl)	50.0 ± 1.9	50.1 ± 3.4
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1

Data are reported as the mean ± S.E.M. of 6–8 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline. Statistical analysis was performed using a non-paired *t* test.

reaction (Zakaria et al., 2006). Indeed, the peritoneal injection of acetic acid promotes the release of many endogenous inflammatory mediators such as kinins, nitric oxide, substance P, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1B (IL-1B) (Parveen et al., 2007). In addition, these mediators are able to produce not only nociception but an increase in vascular permeability and leukocyte migration, which are important features of the inflammatory process (Zeashan et al., 2009).

4-PSQ potentially reduced the nociceptive behavior in the first (nociceptive) and second (inflammatory) phases and it presented an anti-edematogenic effect in reducing the paw edema formation in the formalin test. Together, these results reinforce the antinociceptive and anti-inflammatory potential of 4-PSQ. It is worth mentioning that 4-PSQ at the low dose (0.1 mg/kg) reduced the licking behavior in the inflammatory phase and the paw edema formation. Therefore, our results suggest that 4-PSQ impairs the formation of inflammatory mediators. The subcutaneous injection of formalin induces a licking response characterized by a nociceptive response, resulted from a direct activation of nociceptors in the first phase. In second phase of formalin, locally produced inflammatory and algescic mediators activate the paw nociceptors (Tassorelli et al., 2006).

Moreover, results obtained in the formalin test indicated that 4-PSQ is likely to have both central and peripheral antinociceptive effects. Centrally acting drugs inhibit the response in both phases equally, such as aminopyrine and mefenamic acid.

However, peripherally acting drugs, such as aspirin, only inhibit the second phase. Therefore, this method enables to easily distinguish the analgesic action site (Shibata et al., 1989; Guimarães et al., 2013).

In line with these results, 4-PSQ reduced the nociceptive behavior from the thermal stimulus in the hot-plate test, suggesting central action of this compound. The hot-plate test produces an acute non-inflammatory nociception, and is a good model to investigate the central effect of analgesic drugs with selectivity for opioid-like drugs (Fischer et al., 2008; Oliveira Fde et al., 2008). This result is in agreement with the results obtained in the acetic acid and formalin tests, supporting the 4-PSQ antinociceptive action.

In the present study the open field test was performed to evaluate the 4-PSQ effects on locomotor and exploratory activities. Here, we found that treatment with 4-PSQ in a single dose did not alter the number of crossings and rearings in the open field test. Thus, our data indicate that 4-PSQ had no sedative effects/central unspecific effect at the doses tested. Importantly, when a compound has sedative/central unspecific effects, this can interfere in the results of nociception tests (Walsh and Cummins, 1976; Ritter et al., 2014). A sedative effect could prevent the animal response to the nociceptive effect.

In order to extend our knowledge of the anti-inflammatory potential of 4-PSQ, its effects were further evaluated in another model of inflammation. In this regard, an ear edema was induced by croton-oil application. Importantly, 4-PSQ reduced ear edema

Table 3
Effect of 4-PSQ on open-field test in mice.

Groups	Number of crossings	Number of rearing
Control	66.2 ± 5.8	50.1 ± 6.9
4-PSQ		
0.1 mg/kg	70.2 ± 7.5	42.8 ± 4.8
1 mg/kg	54.8 ± 5.8	29.9 ± 2.4
5 mg/kg	74.6 ± 7.1	44.7 ± 5.4
25 mg/kg	59.7 ± 2.0	38.8 ± 3.4
Meloxicam	79.2 ± 9.2	51.0 ± 11.2

Data are reported as the mean ± S.E.M. of 8 mice in each group. 4-PSQ means 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline. Meloxicam was used at the dose of 25 mg/kg. (one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls' test).

formation and protected against the increase of MPO activity in mouse ear induced by its phlogistic agent. It is well established that croton oil causes constant irritation, which leads to fluid accumulation as well as edema characteristic of an acute inflammatory response (Parveen et al., 2007). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, a kind of phorbol ester present in croton oil, has been reported to stimulate phospholipid-dependent protein kinase C and overexpression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 (Lee et al., 2013; Nakadate, 1989).

MPO activity is a marker of neutrophil influx into tissue (Krawisz et al., 1984). Four h after croton oil application the MPO activity was significantly increased in the mouse ear. In this study, 4-PSQ decreased the MPO activity induced by croton oil, which is related to the reduction of neutrophil and macrophage infiltration into the ear tissues. An interesting result found in the present study was reduction by 4-PSQ of 87% of the MPO activity at the dose of 25 mg/kg. At this dose, 4-PSQ was more effective in all tests evaluated, and therefore we suggest that it is one of the most important mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory actions of this compound. However, we believe that there are other mechanisms implicated in these actions, because at the doses of 0.1–5 mg/kg it exerted positive effects.

In an attempt to correlate the antinociceptive and anti-inflammatory effects observed in this study the antioxidant effect of 4-PSQ was determined in ears of mice exposed to croton oil. Taking into account the study performed by Savegnago et al. (2013) and the antioxidant effects of 4-PSQ demonstrated here by reduction of RS levels and protection against the decrease of DPPH and ABTS levels induced by croton oil exposure, we can infer that antioxidant and antinociceptive/anti-inflammatory properties of 4-PSQ were correlated. Indeed it has been suggested that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of inflammation by promoting the production of several cytokines (Cuzzocrea et al., 2001; Navarro et al., 2013), which are responsible for activating neutrophils and inducing migration to the inflammatory site. TNF- α and IL-1 β activate NADPH oxidase inducing the production of superoxide anion, starting the generation of reactive oxygen species (Drummond et al., 2011). In turn, superoxide anion can induce cytokine production by activation of nuclear factor kappa B (NF κ B). Oxidative stress is a contributing factor to inflammatory hyperalgesia together with inflammatory cytokines (Verri et al., 2012).

In line with our results, it is important to highlight some advantages of using 4-PSQ. The antioxidant action is an important activity exerted by an antinociceptive and anti-inflammatory drug, because the oxidative stress is also critical to the etiology of many chronic and degenerative diseases (Méndez-Armenta et al., 2014; Duvvuri et al., 2015; Marseglia et al., 2014; Thanan et al., 2014). Therefore, the use of compounds with a potential antioxidant effect has received attention from researchers and it is promising therapies by acting as a “multi-target” drug that is important in the treatment of associated pathologies. In addition, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as meloxicam, have been widely used clinically to treat pain and inflammation. However, they cause adverse effects such as gastrointestinal, renal and hepatic impairment (Gudis and Sakamoto, 2005; Burukoglu et al., 2014). Therefore, it should be noted that 4-PSQ did not cause kidney and liver toxicity, as demonstrated by parameters such as urea and creatinine levels, ALT and AST activities.

Additionally, several studies have demonstrated that the classic analgesic and anti-inflammatory drugs require high doses to exert their action in animal models. For example, acetylsalicylic acid when administered at the dose of 200 mg/kg by oral route in mice, did not present an antinociceptive effect in the first phase of the formalin test (Chagas et al., 2014). On the other hand, 4-PSQ presented antinociceptive and anti-inflammatory actions at low doses

in both formalin phases.

Finally, 4-PSQ is an organoselenium compound synthesized in high yields and under simple reaction conditions (Savegnago et al., 2013). Nowadays, selenium is recognized as an essential dietary element for mammals with physiological roles as structural component of several antioxidant enzymes, participation in metabolic pathways, including the thyroid hormones metabolism and immune function (Ursini and Bindoli, 1987; Stazi and Trinti, 2008, Nogueira and Rocha, 2011). In accordance with this, organoselenium compounds have received the attention of researchers because of their broad pharmacological potential (Nogueira et al., 2004; Nogueira and Rocha, 2011). Results of the present study and the advantages highlighted here support the potential of this compound.

5. Conclusion

Taken together, the results presented here demonstrated acute antinociceptive and anti-inflammatory effects of 4-PSQ in mice making this a compound of interest for future studies to develop new drugs to treat important painful and inflammatory clinical conditions. We can infer that antioxidant and antinociceptive/anti-inflammatory properties of 4-PSQ were correlated. Indeed, our results are consistent with the fact that meloxicam, a reference drug, presents similar results to 4-PSQ. Further studies are necessary to clarify its effects and to better elucidate the mechanisms involved.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to UFPel, CNPq and FAPERGS (1946-2551/13-0) for the financial support.

References

- Bhasin, K.K., 2010. Synthesis and characterization of novel quinolone selenium compounds: X-ray structure of 6-methoxy-3 H-[1,2]diselenolo[3,4-b]quinoline. *J. Organomet. Chem.* 695, 1065–1068.
- Burukoglu, D., Baycu, C., Taplamacioglu, F., Sahin, E., Bektur, E., 2014. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory meloxicam on stomach, kidney, and liver of rats. *Toxicol. Ind. Health*, 1–7.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Chagas, P.M., Rosa, S.G., Sari, M.H., Oliveira, C.E., Canto, R.F., Da Luz, S.C., Braga, A.L., Nogueira, C.W., 2014. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 118, 87–95.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 153, 1161–1168.
- Correa, C.R., Kyle, D.J., Chakraverty, S., Calixto, J.B., 1996. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br. J. Pharmacol.* 117, 552–558.
- Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., Salvemini, D., 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 53, 135–159.
- Donato, F., Pavin, N.F., Goes, A.T.R., Souza, I.C., Soares, L.C., Rodrigues, O.E.D., Jesse, C.R., Savegnago, L., 2015. Antinociceptive and anti-hyperalgesic effects of bis(4-methylbenzoyl) diselenide in mice: evidence for the mechanism of action. *Pharm. Biol.* 53, 395–403.
- Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K., Sobey, C.G., 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat.*

- Rev. Drug Discov. 10, 453–471.
- Duvvuri, L.S., Katiyar, S., Kumar, A., Khan, W., 2015. Delivery aspects of antioxidants in diabetes management. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 1–18.
- Fischer, L.G., Santos, D., Serafin, C., Malheiros, A., DelleMonache, F., DelleMonache, G., Cechinel Filho, V., de Souza, M.M., 2008. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Pliniaglomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 235–239.
- Gudis, K., Sakamoto, C., 2005. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Dig. Dis. Sci.* 50, 116–123.
- Guimarães, A.G., Quintans, J.S., Quintans Jr., L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytother. Res.* 27, 1–15.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Hunnskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Ianiski, F.R., Alves, C.B., Souza, A.C.G., Pinton, S., Roman, S.S., Rhoden, C.R.B., Alves, M.P., Luchese, C., 2012. Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid- β peptide-induced damage in mice. *Behav. Brain Res.* 230, 100–107.
- International Association for the Study of the Pain, 1994. Task force on taxonomy. In: Harold, M., Bogduk, N. (Eds.), *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*, 2nd ed. IASP Press, Seattle, WA.
- 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.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344–1350.
- Kiefer, W., Dannhardt, G., 2002. COX-2 inhibition and the control of pain. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3, 1348–1358.
- Lacy, F.C., Armstrong, L.L., Goldman, M.P., Lance, L.L., 2008. *Drug Information Handbook*, 14th ed. Lexi-Comp, USA.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Lee, H.N., Cho, H.J., Lim, do, Y., Kang, Y.H., Lee, K.W., Park, J.H., 2013. Mechanisms by which licochalcone exhibits potent anti-inflammatory properties: studies with phorbol ester-treated mouse skin and lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10926–10943.
- Li, Y., Xian, Y., Ip, S., Su, J., He, J., Xie, Q.F., Lai, X.P., Lin, Z.X., 2011. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemon* is Herbain animal models. *Fitoterapia* 82, 1295–1301.
- Loechutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P., Man-khetkom, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat. Phys. Chem.* 72, 323–331.
- Mackay, E.M., Mackay, L.L., 1927. The concentration of urea in the blood of normal individuals. *J. Clin. Investig.* 4, 295–306.
- Manera, C., Malfitano, A.M., Parkkari, T., Lucchesi, V., Carpi, S., Fogli, S., Bertini, S., Laezza, C., Ligestri, A., Saccomanni, G., Savinainen, J.R., Ciaglia, E., Pisanti, S., Gazzero, P., Di Marzo, V., Nieri, P., Macchia, M., Bifulco, M., 2015. New quinoline- and 1,8-naphthyridine-3-carboxamides as selective CB2 receptor agonists with anticancer and immuno-modulatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 10–18.
- Mantovani, A.C., Pesarico, A.P., Sampaio, T.B., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2014. Synthesis of pharmacologically active 1-amino-isoquinolines prepared via silver triflate-catalyzed cyclization of *o*-alkynylbenzaldoximes with isocyanates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 51, 196–203.
- Marella, A., Tanwar, O.P., Saha, R., Ali, M.R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaqui-quzzaman, M., Alam, M.M., 2013. Quinoline: a versatile heterocyclic. *Saudi Pharm. J.* 21, 1–12.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., Arrigo, T., 2014. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 378–400.
- Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Juárez-Rebollar, D., Rodríguez-Martínez, E., Yescas Gómez, P., 2014. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 293689.
- Naik, H.R., Naik, H.S., Naik, T.R., Naika, H.R., Gouthamchandra, K., Mahmood, R., Ahamed, B.M., 2009. Synthesis of novel benz[*h*]quinolines: wound healing, antibacterial, DNA binding and in vitro antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 981–989.
- Nakadate, T., 1989. The mechanism of skin tumor promotion caused by phorbol esters: possible involvement of arachidonic acid cascade/lipoxygenase, protein kinase C and calcium/calmodulin systems. *Jpn. J. Pharmacol.* 49, 1–9.
- Navarro, S.A., Serafin, K.G., Mizokami, S.S., Hohmann, M.S., Casagrande, R., Verri Jr., W.A., 2013. Analgesic activity of piracetam: effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 105, 183–192.
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Anti-inflammatory, antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm. Res.* 52, 56–63.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255–6285.
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85, 1313–1359.
- Oliveira Fde, S., De Sousa, D.P., de Almeida, R.N., 2008. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 588–591.
- Oyemitan, I.A., Iwalewa, E.O., Akanmu, M.A., Olugbade, T.A., 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* G. Baker (Annonaceae) in rodents. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 5, 355–362.
- Parameswaran, K., Sivaguru, P., Lalitha, A., 2013. Synthesis of novel bis(pyrimido [5,4-*c*]quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione) and its derivatives: evaluation of their antioxidant properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3873–3878.
- Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M.K., Dai, R., Ahamad, W., Yu, Y.H., 2007. Anti-inflammatory and analgesic activities of Thesium chinense Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-*O*-glucoside. *Yakugaku Zasshi* 127, 1275–1279.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56–63.
- Ritter, A.M., Ames, F.Q., Otani, F., de Oliveira, R.M., Cuman, R.K., Bersani-Amado, C.A., 2014. Effects of anethole in nociception experimental models. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2014, 345829. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/345829>.
- Romy, C., Ledon, N., González, R., 1998. Further studies on anti-inflammatory activity of hycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* 47, 334–338.
- Saraiva, M.T., Krüger, R., Baldinotti, R.S.M., Lenardão, E.J., Luchese, C., Savegnago, L., Wilhelm, E.A., Alves, D., 2016. 7-Chloroquinoline-1,2,3-triazolyl carboxylates: organocatalytic synthesis and antioxidant properties. *J. Braz. Chem. Soc.* 1, 41–53.
- Savegnago, L., Vieira, A.J., Seus, N., Goldani, B.S., Castro, M.R., Lenardão, E.J., Alves, D., 2013. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. *Tetrahedron Lett.* 54, 40–44.
- Stazi, A.V., Trinti, B., 2008. Selenium deficiency in celiac disease: risk of autoimmune thyroid diseases. *Minerva Med.* 99, 643–653.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347–352.
- Shtrygol', S.I.U., Zubkov, V.A., Podol'skiĭ, I.N., Gritsenko, I.S., 2012. 2-Methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one as potential antidepressant with nootropic properties. *Eksp. Klin. Farmakol.* 75, 7–9.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345–352.
- Swingle, K.F., Reiter, M.J., Schwartzmiller, D.H., 1981. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 254, 168–176.
- Tassorelli, C., Greco, R., Wang, D., Sandrini, G., Nappi, G., 2006. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 103–107.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawashiri, S., Murata, M., 2014. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 193–217.
- Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C., Dellaloggia, R., 1986. The croton-oil ear test revisited. *Agents Act.* 117, 347–349.
- Ursini, F., Bindoli, A., 1987. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44, 255–276.
- Verri Jr., W.A., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, R.D.R., Cunha, T.M., 2012. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. In: Atta-ur-Rahman, F.R.S. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Oxford, pp. 297–330.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504.
- Watson, J., 2013. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open. Biol.* 3, 120144.
- Wilhelm, E.A., Machado, N.C., Pedrosa, A.B., Goldani, B.S., Seus, N., Moura, S., Savegnago, L., Jacob, R.G., Alves, D., 2014. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazolylcarboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. *RSC Adv.* 04, 41437–41445.
- Woolf, H.G., MacDonald, A.D., 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80, 300–307.
- Valerio, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.V., Vieira, S.M., Fonseca, M.J., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri Jr., W.A., 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975–1979.
- Villalba, B.T., Ianiski, F.R., Wilhelm, E.A., Fernandes, R.S., Alves, M.P., Luchese, C., 2014. Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and anti-edematogenic effects in acute models of nociception. *Life Sci.* 115, 36–43.
- Zakaria, Z.A., Abdul Chani, Z.D., RadenMohdNor, R.N., Gopalan, H.K., Sulaiman, M.R., Abdullah, F.C., 2006. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. *Yakugaku Zasshi* 126, 1197–1203.
- Zeashan, H., Amresh, G., Rao, C.V., Singh, S., 2009. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 122, 492–496.

5 CONCLUSÃO

- O 4-PSQ demonstrou ação antinociceptiva dose-dependente no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina em ambas as fases (neurogênica e inflamatória).
- A curva de tempo, realizada no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, demonstrou que o composto iniciou sua ação antinociceptiva em 30 minutos perdurando até 4 horas após a sua administração.
- O composto 4-PSQ reduziu a formação do edema de pata e de orelha demonstrando sua propriedade anti-inflamatória e anti-edematogênica.
- O 4-PSQ reduziu o comportamento nociceptivo do estímulo térmico no teste da placa quente, sugerindo uma ação central.
- O composto 4-PSQ protegeu contra o aumento da atividade da enzima MPO, possivelmente pela redução dos neutrófilos e da infiltração de macrófagos no tecido.
- Os resultados indicaram uma relação entre a ação antioxidante e as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias do 4-PSQ.
- O 4-PSQ não alterou o número de cruzamentos e elevações no teste do campo aberto, demonstrando que o composto não apresenta efeitos sedativos.
- O composto 4-PSQ não alterou os níveis séricos de creatinina e uréia e a atividade das enzimas AST e ALT, demonstrando que o composto não apresenta efeito nefro e hepatotóxico, nas condições avaliadas.

PERSPECTIVAS

Mais estudos são necessários para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória do 4-PSQ. Além disso, nosso grupo de pesquisa buscará verificar se o 4-PSQ apresenta efeito antinociceptivo em modelos de dor crônica. Paralelamente, será investigada a possível toxicidade após exposição crônica ao 4-PSQ e se este derivado de quinolina induz dependência e/ou tolerância em animais.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; PLESSIS, S.S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 112, p. 1-19, 2014.
- AGUILERA-AGUIRRE, L.; BACSI, A.; RADAK, Z.; HAZRA, T.K.; MITRA, S.; SUR, S.; BRASIER, A.R.; BA, X.; BOLDOGH, I. Innate Inflammation Induced by the 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-KRAS-NF- κ B Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 9, n. 193, p. 4643-53, 2014.
- ATKINSON, T.J.; FUDIN, J.; JAHN, H.L.; KUBOTERA, N.; RENNICK, A.L.; RHORER, M. What's new in NSAID pharmacotherapy: oral agents to injectables. **Pain Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2013.
- AZEVEDO, Maria Isabel Carneiro de. **Efeito dos Flavonóides Rutina e Quercetina na Neuropatia Sensitiva Periférica Induzida por Oxaliplatina**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Clínica) - Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/6899>> Acesso em: 02 mai. 2016.
- BABOS, M.G.; GRADY, B.; WISNOFF, W.; MCGHEE, C. Pathophysiology of pain. **Disease-a-month**, v. 59, n. 10, p. 330-358, 2013.
- BALBINOT, Daniela Tagliari Longhi. **Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-eno (TTHL) isolado de *Combretum leprosum***. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/106706/319064.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 02 jun. 2016.
- BALIKI, M.N.; APKARIAN, A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 474-491, 2015.
- BARRET, J.E. The pain of pain: Challenges of animal behavior models. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 183-190, 2015.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BENARROCH, E.E. Ion channels in nociceptors: recent developments. **Neurology**, v. 84, n. 11, p. 1153-1164, 2015.

BIHEL, F. Opioid adjuvant strategy: improving opioid effectiveness. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 339-354, 2016.

BILD, W.; CIOBICA, A.; PADURARIU, M.; BILD, V. The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 1, n. 69, p. 147-154, 2013.

BILEVICIUS, E.; KOLESAR, T.A.; KORNELSEN, J. Altered Neural Activity Associated with Mindfulness during Nociception: A Systematic Review of Functional MRI. **Brain Science**, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2016.

BISWAS, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1-9, 2016.

BORTOLATTO, C.F.; GERRA SOUZA, A.C.; WILHELM, E.A.; NOGUEIRA, C.W. Acute treatment with bis selenide, an organic compound containing the trace element selenium, prevents memory deficits induced by reserpine in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 151, n. 1, p. 92-99, 2013.

BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Translational neuropathic pain research: A clinical perspective. **Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 252-259, 2016.

BOURNE, S.; MACHADO, A.G.; NAGEL, S.J. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629-638, 2014.

BOZIMOWSKI, G. A Review of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **AANA Journal Course**, v. 83, n. 6, p. 425-433, 2015.

BRADESI, S.; Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 5, p. 499-511, 2010.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, P.R. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 2013.

BRÜNING, C.A.; GAI, B.M.; SOARES, S.M.; MARTINI, F.; NOGUEIRA, C.W. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 125, n. 1, p. 15-20, 2014.

BURNSTOCK, G. Purinergic mechanisms and pain - an update. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, n. 3, p. 24-40, 2013.

CAMPOS-BUZZI, F.; FRACASSO, M.; CLASEN, B.K.; TICONA, J.C.; GIMENEZ, A.; CECINEL-FILHO, V. Evaluation of antinociceptive effects of Galipea longiflora alkaloid extract and major alkaloid 2-phenylquinoline. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 32, n. 10, p. 707-711, 2010.

CARTA, D.; BORTOLOZZI, R.; HAMEL, E.; BASSO, G.; MORO, S.; VIOLA, G.; FERLIN, M.G. Novel 3-Substituted 7-Phenylpyrrolo[3,2-f]quinolin-9(6H)-ones as

Single Entities with Multitarget Antiproliferative Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 7991-8010, 2015.

CAZACU, I.; MOGOSAN, C.; LOGHIN, F. Safety issues of current analgesics: an update. **Clujul Medical**, v. 88, n. 2, p. 128-136, 2015.

CHAGAS, P.M.; ROSA, S.G.; SARI, M.H.; OLIVEIRA, C.E.; CANTO, R.R.; DA LUZ, S.C.; BRAGA, A.L.; NOGUEIRA, C.W. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 118, n. 1, p. 87-95, 2014.

CHARVATOVA, N.; ZELINSKA, G.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; SEHONOVA, P.; MARSHALEK, P.; BARTOSKOVA, M.; PISKOROVA, I.; SVOBODOVA, Z. The effect of the fluoroquinolone norfloxacin on somatic indices and oxidative stress parameters in early stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Neuro Endocrinology Letters**, v. 36, n. 1, p. 79-87, 2015.

CHO, H.; YANG, Y.D.; LEE, J.; LEE, B.; KIM, T.; JANG, Y.; BACK, S.K.; NA, H.S.; HARFE, B.D.; WANG, F.; RAOUF, R.; WOOD, J.N.; OH, U. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 1015-1021, 2012.

COMBS, G.F. Biomarkers of selenium status. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2209-2236, 2015.

COWEN, R.; STASIOWSKA, M.K.; LAYCOCK, H.; BANTEL, C. Assessing pain objectively: the use of physiological markers. **Anaesthesia**, v. 70, n. 7, p. 828-847, 2015.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J. O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres, 1999. p. 183-214.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 243-254, 2011.

DAHANVIAY, P.; MISRA, A.K.; VARMA, S.K. Diclofenac induced acute renal failure in a decompensated elderly patient. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 2, p. 155-157, 2013.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 3, p. 277-291, 2016.

DEL FABRO, L.; BORGES FILHO, C.; SOUZA, L.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D.; SCHNEIRDER, P.; DE SALLES, H.; JESSE, C. Effects of Se-phenyl thiazolidine-4-carboselenoate on mechanical and thermal hyperalgesia in brachial plexus avulsion in mice: mediation by cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Brain Research**, v. 1471, n. 1, p. 31-36, set. 2012.

DJOUHRI, L. A δ -fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in

relation to A δ -fiber high threshold mechanoreceptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 61, n. 1, p. 225-238, 2016.

DONATO, F.; PAVIN, N.F.; GOES, A.T.R.; SOUZA, L.C.; SOARES, L.C.; RODRIGUES, O.E.D.; JESSE, C.R.; SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of bis(4-methylbenzoyl) diselenide in mice: Evidence for the mechanism of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 395-403, 2015.

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

EL-FEKI, S.A.; THABET, H.K.; UBEID, M.U. Synthesis, molecular modeling and anti-inflammatory screening of novel fluorinated quinoline incorporated benzimidazole derivatives using the Pfitzinger reaction. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 161, n. 1, p. 87-94, 2014.

EMERY, E.C.; YOUNG, G.T.; BERROCOSO, E.M.; CHEN, L.; MCNAUGHTON, P.A. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1462-1466, 2011.

FABBRO, F.; CRESCENTINI, C. Facing the experience of pain: A neuropsychological perspective. **Physics of Life Reviews**, v.11, n. 3, p. 540-552, 2013.

FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: Galipea longiflora. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 12, p. 2116-2118, 1989.

GARCIA-LARREA, L. The posterior insular-opercular region and the search of a primary cortex for pain. **Neurophysiologie clinique**, v. 42, n. 5, p. 299-313, 2012.

GARLAND, E.L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care**, v. 39, n. 3, p. 561-571, 2012.

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, n. 1, p. 1-6, 2014.

GOMTSYAN, A.; BAYBURT, E.K.; SCHMIDT, R.G.; ZHENG, G.Z.; PERNER, R.J.; DDOMENICO, S.; KOENIG, J.R.; TURNER, S.; JINKERSON, T.; DRIZIN, I.; HANNICK, S.M.; MACRI, B.S.; MCDONALD, H.A.; HONORE, P.; WISMER, C.T.; MARSH, K.C.; WETTER, J.; STEWART, K.D.; OIE, T.; JARVIS, M.F.; SUROWY, C.S.; FALTYNEK, C.R.; LEE, C.H. Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain: structure-activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinazoline, phthalazine, quinoxaline, and cinnoline moieties. **Journal of Medicinal and Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 744-752, 2005.

GOUDARSHIVANANAVAR, B.C.; VIGNESHWARAN, V.; DHARMAPPA, K.K.; PRAMOD, S.N. Pharmacological Potential of Tetrahydrofurano/Pyrano Quinoline and Benzo[b]furoindolyl Derivatives in Acute Inflammation, Pain and Oxidative Stress.

Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, v. 13, n. 3, p. 165-173, 2015.

GRUPTA, S.K.; MISHRA, A. Synthesis, characterization & screening for anti-inflammatory and analgesic activity of quinoline derivatives bearing azetidinones scaffolds. **Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, 2016, *in press*.

GUERRERO, C.A.; ACOSTA, O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. **World Journal of Virology**, v. 5, n. 2, p. 38-62, 2016.

GUO, D.; HU, J. Spinal presynaptic inhibition in pain control. **Neuroscience**, v. 283, n. 1, p. 95-106, 2014.

HAYHURST, C.J.; DURIEUX, M.E. Differential Opioid Tolerance and Opioid-induced Hyperalgesia: A Clinical Reality. **Anesthesiology**, v. 124, n. 2, p. 483-488, 2016.

HÖFLE, M.; HAUCK, M.; ENGEL, A.K.; SENKOWSKI, D. Viewing a needle pricking a hand that you perceive as yours enhances unpleasantness of pain. **Pain**, v. 153, n. 5, p. 1074-1081, 2012.

JACUS, M.O.; UEBELE, V.N.; RENGER, J.J.; TODOROVIC, S.M. Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 27, p. 9374-9382, 2012.

JESSE, C.R.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Further analysis of the antinociceptive action caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 573-580, 2009.

JONES, M.R.; CARNEY, M.J.; KAYE, R.J.; PRABHAKAR, A.; KAYE, A.D. Drug Formulation Advances in Extended-Release Medications for Pain Control. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 36, p. 1-8, 2016.

JOSEPHY, P.D. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 589.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 355-384, 2013.

KALUDERCIC, N.; GIORGIO, V. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1-17, 2016.

KIELISZEK, M.; BLAZEJAK, S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1-16, 2016.

KIPP, A.P.; STROHM, D.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHMBURG, L.; BECHTHOLD, A.; LESCHIK-BONNET, E.; HESEKER, H.; GERMAN NUTRITION SOCIETY.

Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, n. 1, p. 195-199, 2015.

KHAN, M.I.; WALSH, D.; BRITO-DELLAN, N. Opioid and adjuvant analgesics: compared and contrasted. **American Journal of Hospice and Palliative Medicine**, v. 28, n. 5, p. 378-383, 2011.

KREMER, M.; SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, 2016. *In press*.

LEITE, M.R.; CECHELLA, J.L.; MANTOVANI, A.C.; DUARTE, M.M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. **Cytokine**, v. 71, n. 1, p. 119-123, 2015.

LEWIS, K.M.; TURNER, R.J.; VINK, R. Blocking neurogenic inflammation for the treatment of acute disorders of the central nervous system. **International Journal of Inflammation**, v. 2013, n. 1, p. 1-13, 2013.

LINLEY, J.E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 657-669, 2010.

LIPNIK-STANGELJ, M. Mediators of Inflammation as Targets for Chronic Pain Treatment. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, n. 1, p. 1-3, 2013.

LOPES, J.M.C. Modulação descendente. In: LOPES, J.M.C. **Fisiopatologia da dor**. Permanyer Portugal: Lisboa, 2003. p. 30-31.

LOTSHC, J.; GEISSLINGER, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 7, p. 485-499, 2001.

LUCHESE, C.; PRIGOL, M.; ACKER, C.L.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidences for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 644, n. 1-3, p. 49-54, 2010.

MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M.; DALL'ACQUA, S.; PILON-SMITS, E.A. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2015.

MANCINI, A.; DI SEGNI, C.; RAIMONDO, S.; OLIVIERI, G.; SILVESTRINI, A.; MEUCCI, E.; CURRÒ, D. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, n. 1, p. 1-12, 2016.

MANERA, C.; CACIO, M.G.; BENETTI, V.; ALLARÀ, M.; TUCCINARDI, T.; MARTINELLI, A.; SACCOMANNI, G.; VIVOLI, E.; GHELARDINI, C.; DI MARZO, V.; RERRARINI, P.L. New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB2 selective agonists. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 23, p. 6505-6510, 2007.

MARELLA, A.; TANWAR, O.P.; SAHA, R.; ALI, M.R.; SRIVASTAVA, S.; AKHTER, M.; SHAQUIQUZZMAN, M.; ALAM, M.M. Quinoline: a versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2013.

MCCARBERG, B.; GIBOFSKY, A. Need to Develop New Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 9, p. 1954-1963, 2012.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-999, 1965.

MERTENS, P.; BLOND, S.; DAVID, R.; RIGOARD, P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: A focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**, v. 61, n. 1, p. 22-34, 2015.

MILLAN, M. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

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

MISRA, S.; BOYLAN, M.; SELVAM, A.; SPALLHOLZ, J.E.; BJÖRNSTEDT, M. Redox-active selenium compounds-from toxicity and cell death to cancer treatment. **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3536-3556, 2015.

MOXON, A. L. 1937. **Alkali disease or selenium poisoning**, Bulletin 331. South Dakota Agricultural Experimental Station, Brookings.

MULEY, M.M.; KRUSTEV, E.; MCDUGALL, J.J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **CNS Neuroscience e Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 88-101, 2016.

NAOI, M.; RIEDERER, P.; MARUYAMA, W. Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. **Journal of Neuronal Transmission**, v. 123, n. 2, p. 91-106, 2016.

NAVARRO, S.A.; SERAFIM, K.G.; MIZOKAMI, S.S.; HOHMANN, M.S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 105, n.1, p. 183-192, 2013.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.; ZENI, G.; ROCHA, J.B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of diphenyl diselenides. **Inflammation Research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003.

OGAWA-WONG, A.N.; BERRY, M.J.; SEALE, L.A. Selenium and Metabolic Disorders: An Emphasis on Type 2 Diabetes Risk. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1-19, 2016.

OH, H.; JUNG, J. Cellular functions of TMEM16/anoctamin. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 468, n. 3, p. 443-453, 2016.

OYINLOYE, B.E.; ADENOWO, A.F.; KAPPO, A.P. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Antimicrobial Peptides and Human Inflammatory Diseases. **Pharmaceuticals**, v. 2, n. 8, p. 151-175, 2015.

PATER, P.R.; SUN, W.; KIM, M.; HAUNG, X.; SANDERSON, P.E.; TANAKA, T.Q.; MCKEW, J.C.; SIMEONOV, A.; WILLIAMSON, K.C.; ZHENG, W.; HUANG, W. In vitro evaluation of imidazo[4,5-c]quinolin-2-ones as gametocytocidal antimalarial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 12, p. 2907-2911, 2016.

PAVIN, N.F.; DONATO, F.; CIBIN, F.W.; JESSE, C.R.; SCHNEIDER, P.H.; DE SALLES, H.D.; SOARES, A.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and antihypernociceptive effects of Se-phenyl thiazolidine-4-carboselenoate in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 169-176, 2011.

PAYNE, J.E.; BONNEFOUS, C.; SYMONS, K.T.; NGUYEN, P.M.; ROZENKRANTS, N.; ZHANG, Y.; WANG, L.; YAZDANI, N.; SHIAU, A.K.; NOBLE, S.A.; RIX, P.; RAO, T.S.; HASSIG, C.A.; SMITH, N.D. Discovery of dual inducible/neuronal nitric oxide synthase (iNOS/nNOS) inhibitor development candidate 4-((2-cyclobutyl-1H-imidazo[4,5-b]pyrazin-1-yl)methyl)-7,8-difluoroquinolin-2(1H)-one (KD7332) part 2: identification of a novel, potent, and selective series of benzimidazole-quinolinone iNOS/nNOS dimerization inhibitors that are orally active in pain models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 7739-7755, 2010.

PERL, E.R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Progress in Neurobiology**, v. 94, n. 1, p. 20-38, 2011.

PESARICO, A.P.; STANGHERLIN, E.C.; MANTOVANI, A.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. 7-Fluoro-1,3-diphenylisoquinoline-1-amine abolishes depressive-like behavior and prefrontal cortical oxidative damage induced by acute restraint stress in mice. **Physiology and Behavior**, v. 149, n. 1, p. 294-302, 2015.

PHAM, D.L.; KIM, J.H.; TRINH, T.H.K.; PARK, H.S. What we know about nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 417-432, 2016.

PINHO-RIBEIRO, F.A.; HOHMANN, M.S.; BORGHI, S.M.; ZARPELON, A.C.; GUAZELLI, C.F.; MANCHOPE, M.F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 25, n. 228, p. 88-99, 2015.

PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 487-496, 2008.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 97, p. 55-74, 2015.

PISSINATE, K.; VILLELA, A.D.; RODRIGUES-JUNIOR, V.; GIACOBBO, B.C.; GRAMS, E.S.; ABBADI, B.L.; TRINDADE, R.V.; NERY, L.R.; BONAN, C.D.; BACK, D.F.; CAMPOS, M.M.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; MACHADO, P. 2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides Are Active against Drug-Susceptible and Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 3, p. 235-239, 2016.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n.1, p. 1-11, 2013.

POMPER, U.; HÖFLE, M.; HAUCK, M.; KATHMANN, N.; ENGEL, A.K.; SENKOWSKI, D. Crossmodal bias of visual input on pain perception and pain-induced beta activity. **NeuroImage**, v. 66, n. 1, p. 469-478, 2013.

PORTA-SALES, J.; GARZÓN-RODRÍGUEZ, C.; LLORENS-TORROMÉ, S.; BRUNELLI, C.; PIGNI, A.; CARACENI, A. Evidence on the analgesic role of bisphosphonates and denosumab in the treatment of pain due to bone metastases: A systematic review within the European Association for Palliative Care guidelines project. **Palliative Medicine**, v. 30, n. 3, p. 1-12, 2016.

QIN, J.; WU, M.; YU, S.; GAO, X.; ZHANG, J.; DONG, X.; JI, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; DING, F. Pyrroloquinoline quinone-conferred neuroprotection in rotenone models of Parkinson's disease. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 3, p. 70-82, 2015.

REICHLING, D.B.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.D. The fundamental unit of pain is the cell. **Pain**, v. 154, n. 1, p. 2-9, 2013.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1267-1276, 2010.

RENTON, T.; EQBUNIWE, O. Pain. Part 2a: Trigeminal Anatomy Related to Pain. **Dental update**, v. 42, n. 3, p. 238-240, 2015.

RIOS, Emiliano Ricardo Vasconcelos. **Efeito antinociceptivo do acetato de citrionelila: estudo dos possíveis mecanismos de ação**. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. Disponível em <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/8494/1/2014_tese_ervrios.pdf> Acesso em: 20 jun. 2016.

ROCHA, J.T.; PINTON, S.; GAI, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl Diselenide Reduces mechanical and thermal nociceptive behavioral responses after unilateral intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 154, n. 3, p. 372-378, 2013.

ROSA, S.G.; QUINES, C.B.; ROCHA, J.T.; BORTOLATTO, C.F.; DUARTE, T.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception

induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 64-71, 2015.

RUIZ, M.L.; KRAUS, R.L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, n. 18, p. 7093-7118, 2015.

SAMPAIO, T.B.; ROCHA, J.T.; PRIGOL, M.; SARAIVA, R.A.; NOGARA, P.F.; STEINL, A.L.A.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. 4-Organoseleno-Isoquinolines Selectively and Reversibly Inhibit the Cerebral Monoamine Oxidase B Activity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 59, n. 1, p. 135-145, 2016.

SANTOS, M.R.; BARROS, P.R.; BORTULUZZI, J.H.; MENEGHETTI, M.R.; DA SILVA, Y.K.; DA SILVA SANTOS, M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Synthesis and evaluation of the anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of 4-aminoquinoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4390-4396, 2015.

SARI, M.H.M.; SOUZA, A.C.G.; ROSA, S.G.; CHAGAS, P.M.; LUZ, S.C.A.; RODRIGUES, O.E.D.; NOGUEIRA, C.W. Biochemical and histological evaluations of anti-inflammatory and antioxidant p-chloro-selenosteroid actions in acute murine models of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 781, n. 1, p. 25-35, 2016;

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; MORO, A.V.; BORGES, V.C.; SANTOS, F.W.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W. Bis selenide alkene derivatives: A class of potential antioxidant and antinociceptive agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 221-229, 2006.

SAVEGNAGO L.; VIEIRA, A.I.; SEUS, N.; GOLDANI, B.S.; CASTRO, M.R.; LENARDÃO, E.J.; ALVES, D. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 1, p. 40-44, 2013.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 12, p. 3292-3293, 1957.

SENKOWSKI, D.; HÖFLE, M.; ENGEL, A.K. Crossmodal shaping of pain: a multisensory approach to nociception. **Trends in cognitive sciences**, v. 18, n. 6, p. 319-327, 2014.

SKELDON, A.; SALEH, M. The Inflammasomes: Molecular Effectors of Host Resistance Against Bacterial, Viral, Parasitic, and Fungal Infections. **Frontiers and Microbiology**, v. 2, n. 15, p. 2-15, 2011.

SMITH, E.S.; LEWIN, G.R. Nociceptors: a phylogenetic view. **Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral physiology**, v. 195, n. 12, p. 1089-1106, 2009.

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

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v.31. n. 2, p. 49-53, 2013.

STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, n. 1-3, p. 179-189, 2013.

TABAKOFF, B.; REN, W.; VANDERLINDEN, L.; SNELL, L.D.; MATHESON, C.J.; WANG, Z.J.; LEVINSON, R.; SMITHERS, C.T.; WOODWARD, J.J.; HONSE, Y.; LOVINGER, D.; RUSH, A.M.; SATHER, W.A.; GUSTAFSON, D.L.; HOFFMAN, P.L. A novel substituted aminoquinoline selectively targets voltage-sensitive sodium channel isoforms and NMDA receptor subtypes and alleviates chronic inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 784, n. 1, p. 1-14, 2016.

TIMBRELL, Jonh. **Principles of biochemical toxicology**. 3 ed., Londres: Taylor & Francis, 2000. p. 404.

VANDERAH, T.W.; Pathophysiology of pain. **The Medical Clinicas of North America**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.

VASILEIOU, I.; GIAGINIS, C.; KLONARIS, C.; THEOCHARIS, S. Insight into pain-inducing and -related gene expression: a challenge for development of novel targeted therapeutic approaches. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, v. 25, n.1, p. 48-62, 2011.

VEINANTE, P.; YALCIN, I.; BARROT, M. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2013.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A.S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 213-220, 2015.

VERRI, W.A.; VICENTINI, F.T.M.C.; BARACAT, M.M.; GEORGETTI, S.R.; CARDOSO, R.D.R.; CUNHA, T.M. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. In: ATTAUR-RAHMAN, F.R.S. **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier: Oxford, 2012. p. 297-330.

VICTORIA, F.N.; ANVERSA, R.; PENTEADO, F.; CASTRO, M.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L. Antioxidant and antidepressant-like activities of semi-synthetic α -phenylseleno citronellal. **European Journal of Pharmacology**, v. 724, n. 1, p. 131-138, 2014.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, n. 1, p. 69-85, 2010.

WARNER, E.A. Opioids for the treatment of chronic noncancer pain. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 12, p. 1155-1161, 2012.

WEMMIE, J.A.; TAUGHER, R.J.; KREPLE, C.J. Acid-sensing ion channels in pain and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 461-471, 2013.

WESTLUND, K.N. The dorsal and hyperalgesia. In: AMINOFF, M.J; BOLLER, F.; SWAAB, D.F. **Pain**. Elsevier: Amsterdam, 2006, p. 117.

WIECH, K.; TRACEY, I. The influence of negative emotions on pain: behavioral effects and neural mechanisms. **NeuroImage**, v. 47, n. 3, p. 987-994, 2009.

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

WROBEL, J.K.; POWER, R.; TOBOREK, M. Biological activity of selenium: Revisited. **IUBMB Life**, v. 62, n. 2, p. 97-105, 2016.

YAKSH, T.L.; WALLACE, M. Opioids, analgesia, and pain management. In: GOODMAN'S; GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. p. 481-527.

YAKSH, T.L; WOLLER, S.A; RAMACHANDRAN, R.; SORKIN, L.S. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. **F1000prime Reports**, v. 7, n. 56, p. 1-27, 2015.

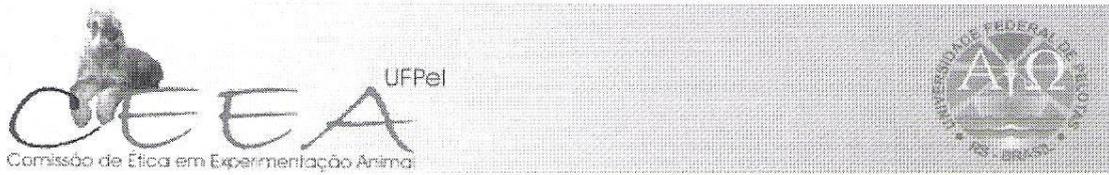
YANG, C.; YU, L.; KONG, L.; MA, R.; ZAHANG, J.; ZHU, Q.; ZHU, J.; HAO, D. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Inhibits Lipopolysaccharide Induced Inflammation in Part via Down regulated NF-kB and p38/JNK Activation in Microglial and Attenuates Microglia Activation in Lipopolysaccharide Treatment Mice. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.

ZASSO, F.B.; GONÇALES, C.E.; JUNG, E.A.; ARALDI, D.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I.; TSCHOPP, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136-140, 2010.

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



Pelotas, 02 de abril de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)***Para:** Professor(a) Ethel Antunes Wilhelm*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos*

Senhor(a) Professor(a):

A *CEEA* analisou o projeto intitulado: “**Avaliação das ações antinociceptiva e anti-inflamatória de compostos sintéticos derivados de quinolonas em camundongos**”, processo nº23110.001987/2014-41, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 1987**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva*Presidente da CEEA*Ciente em: 24/04/2014

Assinatura do(a) Professor(a) Responsável: