

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



Dissertação de mestrado

Contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico no efeito antinociceptivo e efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia de 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina em camundongos.

Vanessa Duarte Gonçalves da Silva

Pelotas, 2016

Vanessa Duarte Gonçalves da Silva

Contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico no efeito antinociceptivo e efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia de 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586c Silva, Vanessa Duarte Gonçalves da

Contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico no efeito antinociceptivo e efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia de 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina em camundongos. / Vanessa Duarte Gonçalves da Silva ; Ethel Antunes Wilhelm, orientadora ; Cristiane Luchese, coorientadora. – Pelotas, 2016.

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

CDD : 574.192

Vanessa Duarte Gonçalves da Silva

Título: Contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico no efeito antinociceptivo e efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia de 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina 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:

Ethel Antunes Wilhelm

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

Cristiani F. Bortolatto

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

Lucieli Savegnago

Prof^a. Dr^a. Lucieli Savegnago, Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade, espaço e recursos fornecidos para a realização desse trabalho.

Ao meu pai que é meu alicerce e meu maior apoiador em tudo. Agradeço também saudosamente a minha mãe (*in memoriam*) por toda criação, esforço e oportunidades a que me foram dedicados e oferecidos. Amo vocês!!!

Ethel e Cris, muitíssimo obrigada por tudo que fizeram por mim e por acreditarem no meu trabalho! Obrigada também pelo tempo despendido, pelos conselhos e pela dedicação que tiveram comigo!

As iniciantes científicas do laboratório que tornaram meu trabalho mais fácil, o meu grato agradecimento, todas de uma forma geral contribuíram muito para que eu pudesse finalizar esse trabalho! Principalmente, as que já estavam lá antes da minha chegada, que tiveram paciência e esforço para me ajudar em tudo que precisei! Muito obrigada gurias!

Aos demais mestrandos do laboratório e meu Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) também agradeço a vocês por todo carinho e ajuda que sempre me deram! Além disso, aos demais laboratórios da UFPel que forneceram materiais e reagentes sempre que necessário, em especial aos professores e alunos do LASOL pela síntese do composto e parceria!

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, pela atenção e cuidado.

A CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todos, que de alguma forma colaboraram para a concretização dessa dissertação, o meu MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

SILVA, Vanessa Duarte Gonçalves da. **Contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico no efeito antinociceptivo e efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia de 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina em camundongos.** 2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Uma nova quinolina contendo selênio, 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-PSQ), foi descrita e sintetizada por nosso grupo de pesquisa. Recentemente, o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do 4-PSQ foi demonstrado. Desta forma, o primeiro objetivo deste estudo foi estender nossos conhecimentos através da investigação da contribuição dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico na ação antinociceptiva aguda deste composto em camundongos Swiss. O pré-tratamento com WAY100635 (0,7 mg/kg, por via intraperitoneal, (i.p.), um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}), ketanserina (0,3 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{2A}) e pindolol (1 mg /kg, i.p., um antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A/1B}) bloqueou parcialmente o efeito antinociceptivo de 4-PSQ (25 mg/kg, per oral, p.o.) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O precursor de óxido nítrico, L-arginina (600 mg/kg, i.p.), reverteu parcialmente a antinocicepção exercida pelo 4-PSQ ou ω-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.). Adicionalmente, os tratamentos não alteraram as atividades locomotoras e exploratórias dos camundongos. Além disso, o efeito anti-inflamatório agudo do 4-PSQ foi investigado em um modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. O 4-PSQ reduziu a migração celular, o acúmulo de exsudato pleural e a atividade da mieloperoxidase induzidos pela exposição à carragenina. Adicionalmente, o 4-PSQ protegeu contra o aumento dos níveis de espécies reativas e a redução dos níveis de tióis não-proteicos induzidos pela carragenina. Estes resultados sugerem que o 4-PSQ possui potencial terapêutico para a inflamação aguda. Os dados apresentados neste estudo também demonstraram que a modulação dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico contribuem para a ação antinociceptiva do 4-PSQ.

Palavras-chave: camundongo; inflamação; nocicepção; óxido nítrico; quinolina; selênio; serotonina.

ABSTRACT

SILVA, Vanessa Duarte Gonçalves da. **Contribution of serotonergic and nitrgic systems in the antinociceptive effect and anti-inflammatory effect in model of pleurisy of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice.** 2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A new quinoline containing selenium, 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ), was described and synthesized by our research group. Recently, we demonstrated the potential antinociceptive and anti-inflammatory of 4-PSQ. For this reason, the first objective of this study was extending our previous findings by investigating the contribution of serotonergic and nitrgic systems in the acute antinociceptive action of this compound in Swiss mice. The pretreatment with WAY100635 (0.7 mg/kg, intraperitoneally (i.p.), a selective antagonist of 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{2A} receptor) and pindolol (1 mg/kg, i.p., a nonselective antagonist of 5-HT_{1A/1B} receptors) partially blocked the antinociceptive effect caused by 4-PSQ (25 mg/kg, per oral, p.o.) in the acetic acid-induced abdominal writhing test. Nitric oxide precursor, L- arginine hydrochloxyde (L-arginine, 600 mg/kg, i.p.), partially reversed antinociception caused by 4-PSQ or ω -nitro-L-arginine (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.). Furthermore, treatments did not modify locomotor and exploratory activities of mice. Additionally, acute anti-inflammatory effect of 4- PSQ in a model of pleurisy induced by carragenan was investigated in mice. 4-PSQ reduced the cellular migration, pleural exudate accumulation and myeloperoxidase activity induced by carragenan exposure. Additionally, 4-PSQ protected against the increase in reactive species levels and reduction of nonprotein thiols levels induced by carragenan. These data suggest that 4-PSQ has therapeutical potential for acute inflammation. Data presented here showed that the modulation of serotonergic and nitrgic systems contributed to the antinociceptive effect of 4-PSQ.

Keywords: mice; inflammation; nociception; nitric oxide; quinoline; selenium; serotonin.

Lista de Figuras

Figura 1	Figura esquemática da neurotransmissão serotoninérgica.....	20
Figura 2	Cascata de sinalização ON/cGM	22
Figura 3	Adesão leucócito-endotélio	24
Figura 4	Estrutura química de 4-PSQ	30

Lista de Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
4-PSQ	7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina
A β	A-beta
ABTS	2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6sulfônico)
A δ	A-delta
AIES	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato amino transferase
COX	Cicloxigenase
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
eONS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama amino butírico
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato ciclase
IASP	Associação internacional para estudo da dor
iONS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
L-NOARG	ω -nitro-L-arginina
MAO-A	Monoamina oxidase A
MPO	Mieloperoxidase
nONS	Óxido nítrico sintase neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe

NPSH	Níveis de tióis não protéicos
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato salina
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
SNP	Sistema nervoso periférico
SNC	Sistema nervoso central
TMAV	Transportador de monoaminas vesicular
TNF- α	Fator de necrose tumoral

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 Revisão de literatura	15
3.1 Dor e nocicepção	15
3.1.1 Mecanismos envolvidos na nocicepção	18
3.1.1.1 Sistema serotoninérgico	19
3.1.1.2 Sistema nitrérgico	21
3.2 Inflamação	23
3.2.1 Anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais	25
3.3 Nocicepção, inflamação e estresse oxidativo	26
3.4 Compostos quinolínicos e orgânicos de selênio	27
3.4.1 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina	29
4 Manuscrito científico	31
5 Conclusões	63
Perspectivas	64
Referências	65
Anexo A – Aprovação do comitê de ética de experimentação animal	75

1 Introdução

A dor além de uma sensação é também uma experiência, pois inclui componentes sensoriais aliados a influências pessoais e ambientais. Embora exista a divisão da dor em termos anatômicos, fisiológicos e farmacológicos, muitos fatores estão envolvidos no seu entendimento e exigem uma abordagem multifatorial para o estudo da analgesia (SILVA et al., 2013; CAVALCANTE, 2014). O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, definida como a sensação determinada pelo estímulo das fibras aferentes primárias, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam a percepção final do processo doloroso (BALIKI e APKARIAN, 2015).

A transmissão da dor é resultante da integração de sistemas de transdução e transmissão, em vários níveis do sistema nervoso central (SNC), os quais têm convergência, principalmente, no cordão espinhal (BALIKI e APKARIAN, 2015). Aliados a estes sistemas estão a modulação, responsável pela restauração da homeostasia, e a percepção, responsável pela interpretação (nocicepção) da resposta advinda de centros superiores do SNC a um estímulo nociceptivo (MOURAUX et al., 2013; WANG et al., 2010).

Frequentemente, quando ocorre dano tecidual a dor é acompanhada por um processo inflamatório. A inflamação é uma resposta natural do organismo contra uma infecção ou lesão, com o objetivo de destruir os agentes agressores. Os processos inflamatórios envolvem uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares que incluem o extravasamento de fluídos, a ativação enzimática, as migrações celulares, a liberação de mediadores químicos, a sensibilização e ativação de receptores, a lise tecidual e de reparo (CAVALCANTE, 2014).

Diante de tais circunstâncias, o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos para a dor e a inflamação implica em conhecimentos de diversos mediadores endógenos, neurotransmissores, receptores e sistemas enzimáticos envolvidos nas ações efectoras. Fundamentalmente a terapia da dor visa a prevenção, o alívio ou a cura embasada na fisiologia e fisiopatologia deste fenômeno. Assim, estudos sobre os mecanismos serotoninérgico, GABAérgico, nitrérgico, opióide, colinérgico e adrenérgico constituem a base dos tratamentos medicamentosos (SARDELLA, 2014).

Nesse sentido, os mediadores endógenos serotonina (5-HT) e óxido nítrico (ON) envolvidos na nocicepção e inflamação merecem menção. Historicamente, é bem conhecido que no SNC a 5-HT surge a partir de uma série de núcleos situados na linha média do tronco cerebral, representando a fonte mais rica de natureza neuronal sintetizada no cérebro de mamíferos (DI e DE DEURWAERDÈRE, 2016). Há relatos de que a administração de drogas que atuam no sistema serotoninérgico produzem efeitos analgésicos na modulação, dependendo do tipo e sub-tipo de receptor ativado e ainda da dosagem de uso (XIE et al., 2012). Aliado a 5-HT, o ON possui importante função na modulação periférica da nocicepção (CHEN et al., 2015). Esse mediador ainda pode apresentar um papel dual, desencadeando efeito pró-nociceptivo ou antinociceptivo, também dependendo de alguns fatores, como por exemplo, a dose de ON ou precursor e a via de administração (SILVA et al., 2014).

De fato, o interesse em identificar novos alvos para o tratamento da dor e inflamação tem aumentado expressivamente nos últimos anos (KLECZKOWSKA e LIPKOWSKI, 2013; NADAL et al, 2013; WELCH et al, 2012). Apesar dos avanços recentes ocorridos na compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da dor e inflamação, as terapias disponíveis atualmente possuem apenas resultados parciais e a maior parte das drogas analgésicas e anti-inflamatórias apresentam importantes efeitos adversos, o que dificulta o uso contínuo. Neste sentido, estudos vêm sendo realizados com compostos quinolínicos (MANTOVANI et al., 2014; PARAMESWARAN et al., 2013) em conjunto com orgânicos de selênio (ROCHA et al., 2013; SARI et al., 2014) frente a modelos de nocicepção e inflamação em modelos experimentais. Desta forma, sugere-se que estas classes de compostos representam uma estratégia promissora para o tratamento de condições clínicas dolorosas e inflamatórias (CHAGAS et al., 2014; NOGUEIRA e ROCHA, 2011; PINZ et al., 2016).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem dedicado esforços no estudo das propriedades farmacológicas de derivados de quinolina (PINZ et al., 2016; SAVEGNAGO et al., 2013; SARAIVA et al., 2015; WILHELM et al., 2014). Recentemente demonstrou-se que o composto 7-cloro-4-(fenilselênio)quinolina (4-PSQ), um derivado quinolínico contendo selênio, apresentou atividade antinociceptiva em camundongos nos testes da placa quente, ácido acético e formalina, sem causar dano hepático e renal (PINZ et al., 2016). Adicionalmente,

este composto não causou alterações na atividade locomotora e exploratória dos animais, descartando um possível efeito sedativo.

De maneira importante, os resultados demonstrados revelaram o potencial anti-inflamatório do 4-PSQ em camundongos (PINZ et al., 2016). De fato, este derivado quinolínico reduziu a formação do edema e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) induzidos por óleo de cróton em orelhas de camundongos (PINZ et al., 2016). Aliado a esta propriedade, o 4-PSQ também revelou possuir um potente efeito antioxidante através da redução dos níveis de espécies reativas (ER) e da proteção contra a diminuição dos níveis dos radicais 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) induzidos pela exposição tópica ao óleo de cróton (PINZ et al., 2016). Desse modo, pode-se sugerir que o seu efeito antioxidante estaria correlacionado com as propriedades antinociceptivas/anti-inflamatórias avaliadas. Ainda, verificou-se que os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios exercidos por 4-PSQ foram similares aos apresentados pelo meloxicam, um fármaco de referência, demonstrando dessa forma o seu potencial como terapia para a dor e inflamação.

Juntos, esses resultados reforçam o grande potencial biológico e as vantagens promissoras do composto quinolínico 4-PSQ, sendo necessário, portanto, a investigação dos mecanismos envolvidos na sua ação antinociceptiva. Aliado a este fato e considerando o interesse do grupo de pesquisa no estudo do potencial farmacológico do 4-PSQ, se torna relevante ampliar os estudos referentes ao efeito anti-inflamatório deste em um modelo de inflamação aguda.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do composto 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina (4-PSQ) e ampliar o estudo a cerca de sua ação anti-inflamatória aguda em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a possível contribuição do sistema serotoninérgico na ação antinociceptiva do 4-PSQ.
- Elucidar o possível envolvimento do sistema nitrérgico na ação antinociceptiva do 4-PSQ.
- Investigar a ação anti-inflamatória aguda do 4-PSQ no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.

3 Revisão de literatura

3.1 Dor e nocicepção

A dor corresponde a uma resposta subjetiva que o organismo apresenta quando é submetido a algum estímulo potencialmente nocivo. Desse modo, quando ocorre um estímulo nocivo são ativadas reações fisiológicas para que seja possível evitar o aparecimento de uma lesão em tecidos normais (SCHAIBLE et al., 2011). Logo, é percebido que a dor configura-se como uma função protetora, possuindo vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção desse estímulo prejudicial (GUYTON e HALL, 2011).

A manifestação da dor funciona como um sinal de alerta que o SNC utiliza para sinalizar um perigo iminente, interferindo, portanto, na homeostasia do indivíduo e na sua relação com o meio (BARROT, 2012). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (1994), a dor é definida como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos (LOESER e TREEDE, 2008).

Em relação à sensação dolorosa, a dor pode ser classificada em aguda, transitória ou crônica. Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa. Quando o episódio doloroso é transitório ocorre a ativação de receptores específicos sem que haja dano tecidual e ele se dissipa em pouco tempo (CARVALHO, 2014). A dor aguda é caracterizada por lesão tecidual e eminente, que leva à ativação direta desses receptores específicos no local da injúria. Na dor crônica, muitos eventos ocorrem em associação com manifestações neurológicas geradas por estímulos nocivos, alterando dessa forma a modulação do estado doloroso resultante (BALIK e APKARIAN, 2015). Além disso, alterações centrais crônicas na neuroquímica da sinalização da dor produzem hipersensibilidade, aumentando a frequência e a duração dos impulsos aferentes, tornado o tempo desse processo mais prolongado (VIEIRA et al., 2012). Essa hipersensibilidade está diretamente relacionada com quadros de hiperalgesia

(resposta aumentada a um estímulo doloroso) e alodínia (dor resultante de um estímulo normalmente não nocivo) manifestados nos processos dolorosos (SYDNEY, 2013).

O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a sensação determinada pelo estímulo das fibras aferentes primárias. Dessa forma, a nocicepção refere-se apenas a parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos (TODD, 2010). Assim, a nocicepção é avaliada indiretamente através da observação comportamental, segundo avaliações das respostas aos estímulos provocados experimentalmente. Os modelos de nocicepção são designados como agudos quando a nocicepção é de curta duração, funcionando como sistema de alerta juntamente com a lesão tecidual. Por outro lado, modelos experimentais de nocicepção denominados crônicos são usados para investigar a nocicepção de longa duração, esta persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (SILVA et al., 2013).

Nesse sentido, a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação das fibras nervosas periféricas para o SNC depende de receptores específicos, os nociceptores, que quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração desses potenciais. As terminações nervosas das fibras nociceptivas são capazes de traduzir um estímulo nocivo (de natureza térmica, química ou mecânica) em estímulo elétrico que será transmitido até o SNC através da medula espinhal e interpretado no córtex cerebral como dor (VOSCOPOULOS e LEMA, 2010). A resposta a esses estímulos elétricos ocorre por despolarização dos receptores periféricos, desencadeando assim potenciais de ação dependentes de canais iônicos e receptores ionotrópicos (WHITE et al., 2010). Após a ativação dos nociceptores específicos, a dor é produzida e percebida de forma localizada, com intensidade proporcional à magnitude do estímulo e duração correspondente à vigência do estímulo doloroso. Os nociceptores ativados geram estímulos que são conduzidos à medula por diferentes tipos de fibras aferentes periféricas: A-delta ($A\delta$), A-beta ($A\beta$) e C (RANG et al., 2012). As fibras $A\delta$ são mielinizadas e de condução rápida (10-30 m/s), localizadas na pele e membranas mucosas. As fibras C não são mielinizadas e conduzem lentamente o impulso (0,5-2 m/s), algumas atuam como quimiorreceptores, estando amplamente distribuídas nos tecidos e na pele (PINHEIRO et al., 2011). As fibras $A\beta$, também são mielinizadas e de grande diâmetro, capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso, respondendo a

estímulos periféricos semelhantes e estão principalmente ligadas à condução de estímulos não-nociceptivos, como vibração e movimento. As fibras A δ são responsáveis pela condução da “primeira dor” que se caracteriza por ser rápida, aguda e pontual (MEYER et al., 2008). Por outro lado, um estímulo doloroso mais intenso leva à ativação das fibras C, responsáveis pela transmissão da “segunda dor” desencadeando uma sensação de dor difusa, atrasada e persistente após o término do estímulo (SILVA, 2013). A maioria dessas fibras é originária de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais e fazem sinapses com neurônios secundários do corno da medula dorsal.

Além disso, a atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias endógenas que são liberadas e/ ou sintetizadas em elevadas concentrações no ambiente tecidual em decorrência de processos inflamatórios. Essas substâncias endógenas estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios mediando ou facilitando a transmissão da informação ao SNC (REN e DUBNER, 2010). Nesse contexto, durante a transmissão dolorosa ocorrem múltiplos eventos devido a ação direta ou indireta de mediadores endógenos, tanto a nível central quanto periférico (LIPNIK-STANGELJ, 2013). Tais mediadores são oriundos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, 5-HT, dopamina e ON), peptídeos (cininas, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), proteínas (citocinas, fator de crescimento do nervo), entre outros e desempenham assim papéis importantes nessa transmissão (CURY et al., 2011).

Considerando a importância dos processos dolorosos, esforços têm sido dedicados para a busca de tratamentos eficientes e para a melhor compreensão da patofisiologia da dor. Para isto, diversos modelos experimentais são utilizados no intuito de mimetizar os processos envolvidos na nocicepção. Entretanto, mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos (estudos *in vitro*, culturas de células etc.), os modelos animais ainda apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos. Os resultados obtidos na maioria dos testes nociceptivos mostram uma variabilidade individual relativamente baixa apresentando como consequência um uso de animais mais reduzido (BARROT, 2012). Dentre os diversos testes de nocicepção utilizados na pesquisa pré-clínica, têm-se como principais exemplos, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o

teste da formalina, o Randall-Selitto, o Von Frey, a placa quente e o teste de retirada da cauda (MULEY et al., 2015; SILVA et al., 2013).

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético merece destaque, devido ao fato de ser um clássico modelo usado para triagem de drogas analgésicas e por ser um teste nociceptivo simples e sensível. Esse modelo permite a avaliação da atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico, baseado na contagem das contorções abdominais, seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (PINHEIRO et al., 2011). Esses resultados no comportamento dos animais são o reflexo da resposta à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (GADOTTI et al., 2012). Devido a sua reprodutibilidade, este teste é um dos testes de escolha de grande parte dos estudos de nocicepção (COUTO et al., 2011).

Ainda, é importante mencionar que os testes nociceptivos além de fornecerem informações sobre o potencial de drogas terapêuticas, também auxiliam na descoberta dos mecanismos envolvidos na ação farmacológica.

3.1.1 Mecanismos envolvidos na nocicepção

Os estudos farmacológicos têm contribuído para a descoberta de múltiplos mediadores químicos envolvidos na dor, o que facilita o entendimento dos mecanismos de ação dos neurotransmissores e das vias de ação das drogas envolvidas na modulação central e periférica da dor (SARDELLA, 2014). De fato, muitos esforços têm sido dedicados, buscando compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na origem da nocicepção (NADAL et al., 2013; SZOLCSÁNYI et al., 2011; WELCH et al., 2012).

As substâncias moduladoras da transmissão dos impulsos nociceptivos para o cérebro são capazes de agir como pró-nociceptivas (ativação descendente) ou antinociceptivas (inibição descendente), dependendo de diversos fatores, como o tipo e a intensidade do estímulo da região central ativada e o tipo de receptor envolvido (GARLAND, 2012). Assim, a sensação dolorosa pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibitórios, principalmente por meio das vias descendentes de noradrenalina, 5-HT, acetilcolina, ácido gama aminobutírico (GABA), ON, glutamato, dopamina e outros (ALMEIDA, 2014). Estudos recentes têm destacado a participação das vias serotoninérgica (GIORNO et al., 2016; KUMAR et

al., 2014; SILVA et al., 2014) e nitrérgica (CHEN et al., 2015; GEDIZ et al., 2015; GIORNO et al., 2015) nos processos dolorosos e inflamatórios.

3.1.1.1 Sistema Serotoninérgico

A 5-HT ou 5-hidroxitriptamina é um neurotransmissor vasoativo encontrado nas plaquetas e células enterocromafins (células enteroendócrinas presente nos seres humanos e roedores) e nos mastócitos (roedores) (LESCH e WAIDER, 2012). O sistema inibitório descendente da dor consiste em diversas conexões anatômicas centrais, iniciando pela substância cinzenta periaquedutal, que por sua vez, recebe aferências de núcleos diencefálicos e do tronco encefálico. A substância cinzenta periaquedutal envia projeções para o núcleo paragigantocelular e núcleo magno da rafe (BRAZ e CASTIGLIA, 2000). Desse modo, os neurônios serotoninérgicos localizam-se nos núcleos da rafe, localizados no tronco encefálico e se organizam ao longo da linha média emitindo projeções ascendentes e descendentes (MAZIERO, 2014; SILVA, 2014).

A síntese da 5-HT ocorre nos núcleos da rafe mediana mesencefálica, a partir do aminoácido essencial triptofano, captado de forma ativa do plasma por carreadores de aminoácidos neutros, conforme mostrado na (Figura 1) (LESCH e WAIDER, 2012). Após a formação e recaptação de 5-HT ela pode ser degradada pela ação da monoamina oxidase (MAO-A) mitocondrial, enzima que regula os níveis dos neurotransmissores do sistema serotoninérgico, envolvidos no processo modulatório da dor (NAOI; RIEDERER; MARUYAMA, 2016). Além disso, a 5-HT pode estimular os auto-receptores proporcionando uma inibição por retroalimentação (VINCENS; CHYUNG; TURNER, 2008; VOLPICELLI et al., 2014). Atualmente são conhecidos, em mamíferos, sete tipos de receptores para 5-HT (5-HT₁ – 5-HT₇) divididos de forma heterogênea em quatorze sub-tipos com funções e localizações específicas nas áreas pré e pós sinápticas (VOLPICELLI et al., 2014).

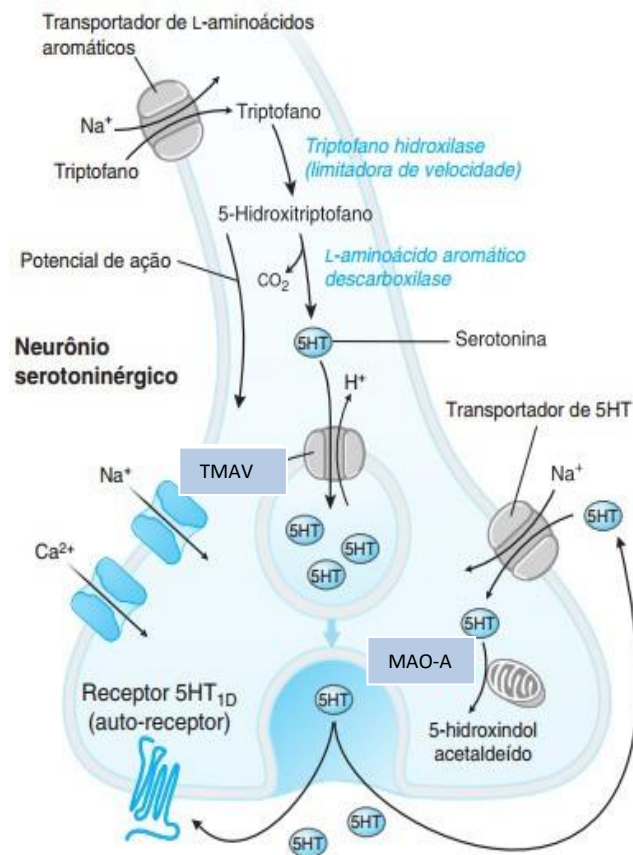


Figura 1: Figura esquemática da neurotransmissão serotoninérgica (Adaptado a partir de VICENS, CHYUNG e TURNER et al., 2008, p. 188).

A administração de antagonistas serotoninérgicos, quando envolvidos na nocicepção de roedores, exercem seus efeitos através da excitação das fibras C e A δ , através da ligação da 5-HT com os receptores serotoninérgicos (GRASSI, 2011). Estudos têm demonstrado que o sistema serotoninérgico do bulbo espinal pode suprimir a entrada da informação nociceptiva para a medula espinhal e assim inibir a transmissão da dor (BALIKI e APKARIAN, 2015; FRANÇA, 2012). Jessel e Iversen (1977) propuseram que os interneurônios (neurônios de associação) que estão ligados à via descendente serotoninérgica, exercem um controle pré-sináptico inibitório sobre as fibras aferentes primárias que contêm substância P e são os responsáveis pelo estímulo doloroso. Com o bloqueio sobre os neurônios aferentes contendo substância P, esta não seria liberada e não haveria o estímulo doloroso sobre as estruturas talâmicas.

Além disso, os múltiplos tipos de receptores 5-HT desempenham funções diferentes no controle da nocicepção por meio dos mecanismos de transdução

intracelular (VOLPICELLI et al., 2014). As atividades dos receptores de 5-HT são complexas e dependem de alguns fatores, como, sub-tipo do receptor a ser ativado, e intensidade do estímulo doloroso (WERNER et al., 2009). Ainda, autores apontam que a ativação dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ modulam a transmissão nociceptiva na medula espinal produzindo efeito antinociceptivo em testes utilizando modelos animais (VOLPICELLI et al., 2014; XIE et al., 2012).

Dentre os receptores envolvidos na modulação nociceptiva, destaca-se o receptor 5-HT_{1A} que está envolvido no mecanismo molecular de antinocicepção central (BARDIN et al., 2003). Há evidências também de que a ativação dos receptores 5-HT₂ estaria envolvida na antinocicepção inflamatória e neuropática induzida pela estimulação aversiva na superfície dorsal do mesencéfalo em ratos (SASAKI et al., 2003). Além disso, também foi constatado que receptores 5-HT₃ participam do processamento nociceptivo periférico, sugerindo que a resposta nociceptiva é influenciada diretamente por ele, em especial em resposta à dor inflamatória, possivelmente devido a um processo de interação com mediadores inflamatórios ou através do bloqueio direto das vias nociceptivas (CARVALHO, 2012). Evidências sugerem que a 5-HT, seus receptores, e suas interações com outros neurotransmissores são essenciais para a modulação da nocicepção (SPATH, 2002).

3.1.1.2 Sistema nitrérgico

O ON é um neurotransmissor (MITKOVSKI et al., 2012) que está envolvido na transmissão sináptica, tanto a nível central quanto periférico (GEDIZ et al., 2015). O ON é sintetizado enzimaticamente pela óxido nítrico sintase (ONS) a partir do aminoácido L-arginina através de três isoformas: a neuronal (nONS), a endotelial (eONS) e a induzível (iONS). As atividades das nONS e eONS são constitutivas e dependem do cálcio (Ca²⁺). Entretanto, a atividade da iONS não depende do influxo de Ca²⁺ na célula e a sua expressão é aumentada por estímulos inflamatórios (RAPOSO et al., 2013). Dessa forma, a iONS não é expressa sobre condições normais, sendo induzida por citocinas e/ou endotoxinas nos macrófagos, linfócitos, hepatócitos, condrócitos e neutrófilos (ROSEMBERG, 2012).

O ON ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), responsável por catalisar a reação de conversão de guanosina-5'-trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O acúmulo de GMPc, por sua vez, ativa as proteínas quinases dependente de GMPc, os canais iônicos e as enzimas fosfodiesterases

(XU et al., 2007). Este ciclo se repete e o ON pode então modular várias funções fisiológicas, desencadeando assim diferentes efeitos celulares, dentre eles a nocicepção, conforme é mostrado esquematicamente na (Figura 2). Dessa forma, tanto o ON quanto o GMPc estão envolvidos no processo nociceptivo (COSTA, 2013).

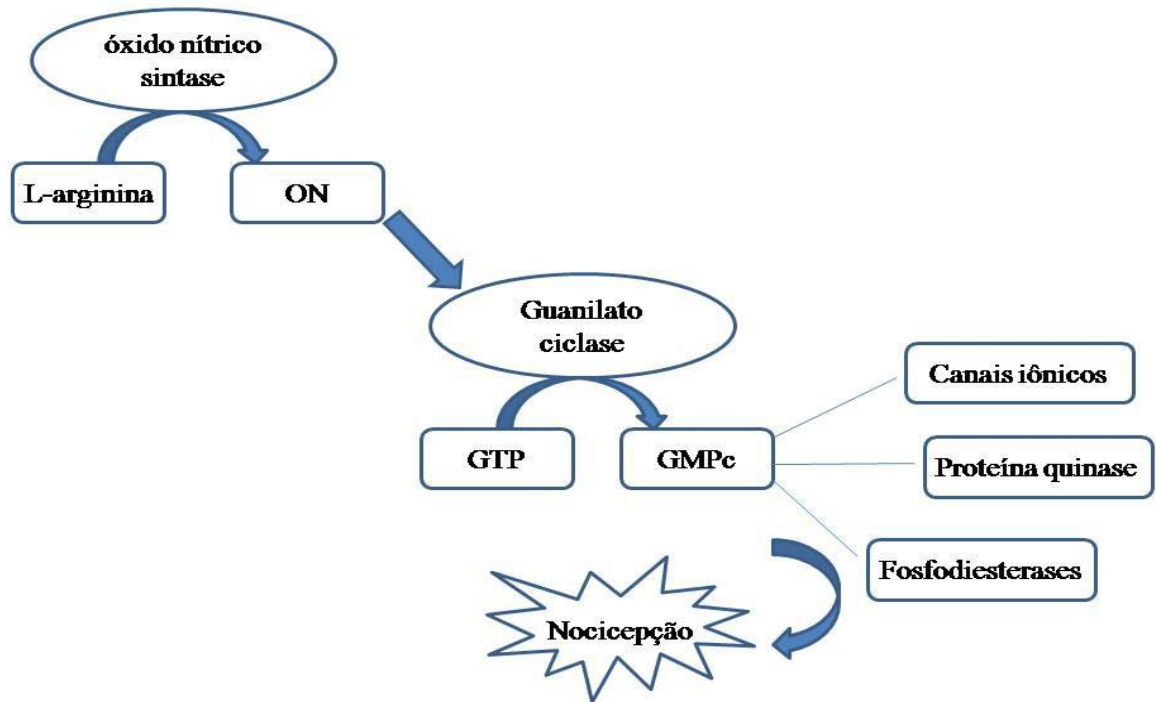


Figura 2: Cascata de sinalização ON/cGMP (Adaptado de FRIEBE e KOESLING 2003, p. 97).

O estudo realizado por Benedito (2013) evidenciou a participação do ON durante a transmissão nociceptiva prolongada, sugerindo importante papel desse neurotransmissor na dor. Estudos têm sugerido o uso de inibidores da síntese de ON para o tratamento de processos dolorosos ou hiperalgésicos (CURY et al., 2011; ZAITONE e ABO-GRECHA, 2012). De fato, os inibidores da ONS e/ou da GCs desempenham atividade antinociceptiva (GEDIZ et al., 2015; SILVA et al., 2014). Por outro lado, quando se utiliza ativadores da cascata L-arginina/ON/GMPc, o ON age como um agente pró-nociceptivo em sítios periféricos e supra-espinhais (RAPOSO et al., 2013). Ainda, quando este neurotransmissor age como pró-nociceptivo, pode-se sugerir que o ON está em altas concentrações e que ele pode interagir com outras espécies reativas de oxigênio (ERO) e levar a formação de peroxinitritos, estes com potente efeito citotóxico e pró-inflamatório (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011).

3.2 Inflamação

Um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo a uma invasão de micro-organismos patogênicos é o processo inflamatório (RODRIGUEZ-VITA e LAWRENCE, 2010). Desta forma, a resposta inflamatória pode ser benéfica, atenuando uma infecção em defesa do organismo, prolongando-se até o retorno da homeostase (CHOI; CHA; JEON, 2012). Porém, quando esta resposta não é modulada, ocorre exacerbação do processo inflamatório e assim a inflamação pode se tornar crônica e conduzir à perda de função (RADMARK et al., 2015; SHAIKH, 2011).

A inflamação pode ser classificada de acordo com o tempo de permanência do processo no organismo em aguda e crônica (KOEBERLE et al., 2014). A inflamação aguda é um tipo de resposta rápida a um agente tóxico de modo que ocorre um estímulo da síntese de mediadores de defesa e um direcionamento dos mesmos ao local da lesão. Os fatores que caracterizam esse processo são a presença de proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. A junção desses fatores promove uma vasodilatação, estimulada por histamina, ON, prostaglandinas (PGE_2), prostaciclina (PGI_2) que podem atuar junto com citocinas no aumento da permeabilidade promovendo a formação do edema (TALERO et al., 2012). Por outro lado, a inflamação crônica pode se prolongar por períodos mais extensos e está associada com processos de alteração histológica como a fibrose e a necrose do tecido afetado, o aumento de vasos sanguíneos e a participação de linfócitos e macrófagos (SHAIKH, 2011).

De maneira geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local, através do recrutamento de leucócitos que liberam mediadores inflamatórios, como por exemplo: cininas (bradicinina e calidina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (5-HT e histamina) e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos) (SANTOS et al., 2010). Esses mediadores endógenos modificam bioquímica e fisiologicamente a estrutura do local afetado pelo processo inflamatório e são capazes de estimular e sensibilizar os nociceptores provocando a dor (RANG et al., 2012).

Como resultados da reação inflamatória são evidenciados os sinais clínicos: dor, calor, rubor, edema e eventualmente, perda da função (BRASILEIRO FILHO, 2011), também chamados de sinais flogísticos. A primeira etapa do processo

inflamatório consiste em uma resposta vascular com aumento na permeabilidade da parede dos vasos. Há uma vasoconstrição arteriolar promovida pela contração dos músculos lisos vasculares, com aumento do fluxo sanguíneo para a área danificada, resultando em hiperemia local. Nessa fase inicial, as alterações no endotélio vascular são facilmente detectáveis, como por exemplo, a exsudação de proteínas (ALESSANDRI et al., 2013).

A próxima etapa da resposta inflamatória envolve a migração de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido-alvo, onde exercem sua função efetora. O extravasamento de leucócitos ocorre através da ação combinada de receptores de adesão celular e fatores quimiotáticos, envolvendo alterações morfológicas nos leucócitos e nas células endoteliais conforme mostrado na (Figura 3) (LEY et al., 2007). Através desse recrutamento leucocitário, os neutrófilos, como por exemplo, as células sanguíneas leucocitárias polimorfonucleares (PMN) são ativados e contribuem para o aparecimento de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), visto que, os mesmos são uma das principais fontes dessas ER (PETRONILHO et al., 2015).

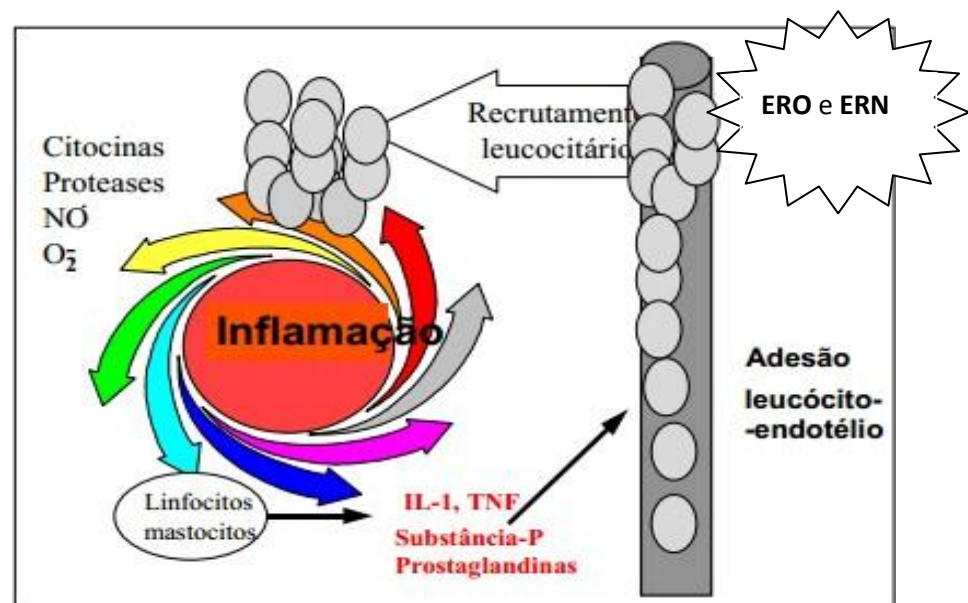


Figura 3: Adesão leucócito-endotélio (Adaptado de LEY et al., 2007, p.679).

Diante de tais fatos, o estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório é de fundamental importância para se conhecer os alvos de intervenção farmacológica para o desenvolvimento de fármacos com potencial anti-inflamatório. Tais mecanismos envolvem a vasodilatação com formação de edema, a ação dos

leucócitos e a liberação de mediadores químicos (STABLES e GILROY, 2011). A prevenção do recrutamento dos leucócitos é um dos principais objetivos para o tratamento desses processos inflamatórios, pois a adesão dos leucócitos (neutrófilos) ao endotélio é o primeiro estado da inflamação. Dessa forma, o bloqueio dessa interação de “adesividade” entre estes a uma região inflamada, poderá inibir a resposta inflamatória e imunitária formada (FIRESTEIN et al., 2013).

Nesse sentido, são utilizados diversos modelos experimentais para a busca de novas drogas anti-inflamatórias. Dentre eles podem-se citar os modelos de pleurisia ou peritonite induzidas por carragenina ou lipopolissacarídeo (LPS), de edema de orelha induzido por óleo de cróton, cinamaldeído, e xileno. O modelo de pleurisia induzida por carragenina merece menção por ser um modelo clássico de estudo do processo inflamatório agudo (MIYAZAWA et al., 2015; IANISKI et al., 2016). Este modelo permite avaliar a capacidade anti-inflamatória em inibir a migração celular após a administração de um estímulo inflamatório no espaço pleural (espaço entre a pleura parietal e a pleura visceral) em modelos animais (PETRONILHO et al., 2015). Neste modelo, o volume do fluido extravasado que acarreta em um aumento da permeabilidade vascular, o acúmulo celular de leucócitos PMN, a inflamação local e a produção de mediadores químicos que participam do processo inflamatório podem ser analisadas quantitativamente e qualitativamente. Essa exsudação produzida é considerada como uma das principais características na modulação da resposta inflamatória aguda, juntamente com a migração de leucócitos e a saída de proteínas séricas nos locais inflamados (TALERO et al., 2012).

Considerando que no processo inflamatório a dor é um dos principais sinais, fármacos que interferem na inflamação, especificamente na resolução da mesma também podem ser eficazes para o alívio e tratamento da dor. Neste contexto os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) são classes que podem cumprir esse papel (GRASSI, 2011).

3.2.1 Anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais

Os AINES são os medicamentos mais comumente usados para reduzir a dor e inflamação resultantes de diversos tipos de lesões através da inibição da produção de mediadores da inflamação. Apesar de serem muito utilizados para o tratamento de desordens inflamatórias agudas, esses fármacos convencionais não possuem

êxito em curar desordens inflamatórias crônicas. O mecanismo de ação dos AINES ocorre através da inibição não seletiva da enzima cicloxigenase (COX). Contudo, também causam sérios efeitos adversos e os mais comuns são irritação no trato gastrointestinal, urticária e insuficiência renal aguda. O uso indiscriminado e prolongado dos AINES podem levar a outros efeitos como inibição da agregação plaquetária, nefrotoxicidade, dentre outros. Como exemplos de AINES têm-se: meloxicam, nimesulida, valdecoxib, celecoxibe, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008).

Os AIES também são denominados de glicocorticóides ou corticóides, fazem parte de um grupo de hormônios cujo mecanismo de ação envolve a interação com um receptor de glicocorticóide e a regulação da expressão de proteínas. AIES são considerados mediadores anti-inflamatórios endógenos potentes pois são liberados em minutos, em resposta ao estresse e à lesão tecidual, para controlar a severidade da resposta inflamatória, funcionando contra reações inflamatórias potencialmente exageradas produzidas pelo hospedeiro. Essa classe de agentes anti-inflamatórios está entre os fármacos mais usados na terapia de doenças crônicas. Dentre os mais utilizados estão: hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, budesonida, fenilbutazona e beclometazona (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008).

Enfim, em situações patológicas em que a resposta inflamatória pode se tornar um fator de lesão, perda das funções normais do organismo e até mesmo um fator de risco de morte, surgem as inúmeras alternativas terapêuticas. Contudo, tais alternativas mostram-se apenas paliativas, e/ou apresentam efeitos adversos que, muitas vezes, se sobrepõem às vantagens do tratamento (GRASSI, 2011).

Conjuntamente com a dor e inflamação, é preconizado um importante papel das ER na indução e manutenção do processo inflamatório e doloroso.

3.3 Nocicepção, Inflamação e estresse oxidativo

O organismo dispõe de mecanismos que promovem um controle dos níveis de ER. As substâncias capazes de retardar ou inibir os efeitos prejudiciais da oxidação causada pelas ER são denominadas antioxidantes (ASOLINI, et al., 2006). Dentre as características esperadas de um antioxidante estão: atacar preferencialmente as ER, interagir com outros antioxidantes, ter uma concentração relevante nos fluidos e tecidos biológicos (VALKO et al., 2006). Além disso, um antioxidante pode sequestrar as ERO/ERN, impedindo a continuidade das etapas na cadeia de reações destas espécies. Uma vez sequestradas, as ER são convertidas

a espécies menos reativas (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Em condições normais, os antioxidantes controlam o efeito oxidativo das ERO/ERN, mantendo-as em níveis basais. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, têm-se o estresse oxidativo (FIRESTEIN et al., 2013; PETRONILHO, 2015).

O estresse oxidativo, por sua vez, contribui para o desenvolvimento e/ou manutenção de diversos processos patológicos, dentre eles a dor e a inflamação (PETRONILHO et al., 2015). De fato, estudos têm demonstrado que no modelo de pleurisia induzida por carragenina, após a infiltração de neutrófilos, a inflamação pleural é seguida de lesão pulmonar causada por ERO e ERN, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), e peroxinitrito (ONOO) (MIYAZAWA et al., 2015; PETRONILHO et al., 2015). Em circunstâncias patológicas, o excesso de produção dessas ER contribui para o aumento de danos no tecido inflamado (MIYAZAWA et al., 2015). Como resultado do estresse oxidativo, ocorre a ativação dos fatores redox de transcrição, tais como o fator nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1), os quais desempenham um papel crucial na indução de citocinas inflamatórias e molécula de adesão intercelular (WERTZ e DIXIT, 2010).

Neste sentido, têm-se demonstrado que substâncias com potencial antioxidante são efetivas na dor e inflamação (LUCHESE et al., 2012; MIYAZAWA et al., 2015; PETRONILHO et al., 2015; SILVA et al., 2015). Alguns antioxidantes mostraram-se efetivos na redução da hiperalgesia, associada com o desenvolvimento de estados de dor persistente, incluindo dor neuropática e dor inflamatória (GAO et al., 2007; YOWTAK et al., 2011). Contudo, os mecanismos fundamentais pelos quais a redução de ERO/ERN promove o alívio da dor e da inflamação ainda não são bem esclarecidos (SCHWARTZ et al., 2009).

3.4 Compostos quinolínicos e orgânicos de selênio

Compostos contendo núcleos quinolínicos foram primeiramente descritos por Fournet e colaboradores (1989), esses encontram-se presentes em produtos naturais e revelam efetivas propriedades medicinais.

Os derivados quinolínicos têm recebido a atenção dos pesquisadores devido às suas importantes ações farmacológicas, incluindo propriedades anti-inflamatória, antimalárica, antitumoral, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, anti-asmática, anti-

histamínica e antidepressiva (BHASIN et al., 2010; MARELLA, 2012; SHTRYGOL et al., 2012). Manera e colaboradores (2007) revelaram que derivados de quinolina apresentam ação antinociceptiva *in vivo*, possivelmente devido a sua alta afinidade por receptores canabinóides. Ainda, nosso grupo de pesquisa demonstrou as ações antinociceptiva, anti-inflamatória e anticonvulsivante de 7-cloroquinolina-1,2,3-triazol carboxamidas em camundongos (WILHELM et al., 2014), reforçando o potencial destes compostos.

Recentemente, derivados quinolínicos demonstraram uma significativa atividade anti-inflamatória, em modelo de inflamação de pata induzida por carragenina e atividade antinociceptiva através do teste da chapa quente (GRUPTA e MISHRA, 2016). Além disso, outros estudos têm demonstrado relevância terapêutica contra a dor neuropática e inflamação crônica (BARE et al., 2007; PAYNE et al., 2010; TABAKOFF et al., 2016). Cabe destacar que esta classe de compostos também se mostrou promissora, uma vez que, já demonstrou não desencadear toxicidade hepática, gástrica e renal em roedores (SANTOS et al., 2015).

Paralelamente aos derivados de quinolina, destacam-se os compostos orgânicos de selênio, os quais possuem síntese simples e atividades farmacológicas relevantes, como antioxidante (NOGUEIRA e ROCHA, 2011; BORTOLATTO et al., 2012; BORTOLATTO et al., 2013; KUDVA; SHAY; PRABHU, 2015; SARAIVA et al., 2016), neuroprotetora (ABDEL-HAFEZ, 2008), ansiolítica e antidepressiva (SAVEGNAGO et al., 2008). Além disso, esta classe de compostos tem despertado interesse devido a sua baixa toxicidade (SARI et al., 2014; WILHELM et al., 2009). Inúmeros compostos orgânicos de selênio exercem ações efetivas sobre a nocicepção e inflamação em modelos experimentais (BRÜNNING et al., 2010; CHAGAS et al., 2014; LUCHESE et al., 2012; PAVIN et al., 2011; ROSA et al., 2015; ROCHA et al., 2013; WILHELM et al., 2009). Segundo Luchese e colaboradores (2012), o disseleneto de difenila, demonstrou capacidade redutora no processo inflamatório causado por pleurisia induzida por carragenina em camundongos.

Diante deste contexto, quinolinas substituídas com grupamento organoselênio parecem ser importantes alvos de estudo e podem representar uma importante estratégia terapêutica para a dor e inflamação.

3.4.1 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina (4-PSQ)

Nosso grupo de pesquisa tem buscado elucidar as propriedades farmacológicas do 4-PSQ (Figura 4). Savegnago e colaboradores (2013) demonstraram que este composto inibe a peroxidação lipídica e possui capacidade redutora do íon férrico, mostrando-se como um potente antioxidante. Recentemente foi evidenciado um importante potencial farmacológico do 4-PSQ em modelos de nocicepção e inflamação em camundongos (PINZ et al., 2016).

A atividade antinociceptiva do 4-PSQ foi demonstrada através de diversos testes comportamentais de nocicepção (teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina) em camundongos. Além disso, a ação antinociceptiva deste derivado quinolínico mostrou-se rápida e duradoura (PINZ et al., 2016). Nossos resultados sugerem que o 4-PSQ possui ação tanto a nível central quanto periférico. De maneira importante, os efeitos observados nos animais tratados com o 4-PSQ foram similares aos observados após o tratamento com o meloxicam, um fármaco de referência (PINZ et al., 2016).

O 4-PSQ também revelou um importante potencial anti-inflamatório em camundongos. Esta ação foi observada através da redução de edema de pata e orelha induzidos por formalina e óleo de cróton, respectivamente. Além disso, a resposta nociceptiva na fase inflamatória do teste da formalina foi reduzida em 99,9 % nos animais tratados com o 4-PSQ (PINZ et al., 2016). Assim, o conjunto de resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, revela o potencial farmacológico deste derivado quinolínico contendo selênio para o tratamento de patologias dolorosas e associadas a inflamação.

A ação anti-inflamatória do 4-PSQ parece ser mediada pela redução da infiltração de neutrófilos bem como pela sua atividade antioxidante, uma vez que o 4-PSQ reduziu a atividade da mieloperoxidase e os níveis de ER induzidas pela aplicação tópica de óleo de cróton. Além disso, o tratamento com o 4-PSQ não causou toxicidade hepática e renal (PINZ et al., 2016).

Diante destes promissores resultados, torna-se de grande importância a avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva aguda do 4-PSQ bem como a investigação de seu potencial farmacológico em modelos inflamatórios.

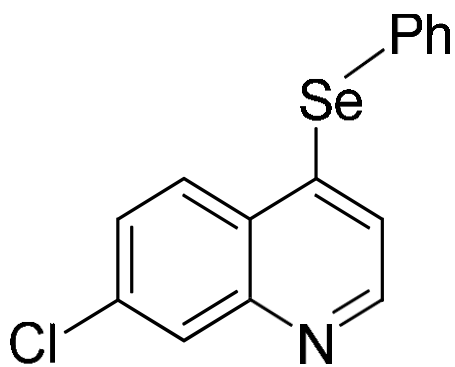


Figura 4: Estrutura química do 4-PSQ.

4 Manuscrito científico

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências do artigo, encontram-se estruturados de acordo com as normas do periódico *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. O presente manuscrito encontra-se submetido a esta revista científica.

Contribution of serotonergic and nitrergic systems in the acute antinociceptive action and anti-inflammatory effect in a model of pleurisy of 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline in mice

Vanessa D. G. Silva^a, Angélica S. Reis^a, Mikaela Pinz^a, Luis Fernando B. Duarte^b,
Juliano A. Roehrs^b, Diego Alves^b, Cristiane Luchese^{a*}, Ethel A. Wilhelm^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia - GPN, CCQFA - Universidade Federal de Pelotas, UFPel - P.O. Box 354 - 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Química, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa - LASOL - CCQFA - Universidade Federal de Pelotas, UFPel - P.O. Box 354 - 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

Correspondence should be sent to:

Ethel Antunes Wilhelm

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil

E-mail: ethelwilhelm@yahoo.com.br / Phone: 55-53-32757356

Cristiane Luchese

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil

E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br / Phone: 55-53-32757233

Abstract

A new quinoline containing selenium, 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ), was described and synthesized by our research group. Recently, we demonstrated the potential antinociceptive and anti-inflammatory of 4-PSQ. For this reason, the first objective of this study was extending our previous findings by investigating the contribution of serotonergic and nitrergic systems in the acute antinociceptive action of this compound in Swiss mice. The pretreatment with WAY100635 (0.7 mg/kg, intraperitoneally (i.p.), a selective antagonist of 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{2A} receptor) and pindolol (1 mg/kg, i.p., a nonselective antagonist of 5-HT_{1A/1B} receptors) partially blocked the antinociceptive effect caused by 4-PSQ (25 mg/kg, per oral, p.o.) in the acetic acid-induced abdominal writhing test. Nitric oxide precursor, L- arginine hydrochloride (L-arginine, 600 mg/kg, i.p.), partially reversed antinociception caused by 4-PSQ or ω -nitro-L-arginine (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.). Furthermore, treatments did not modify locomotor and exploratory activities of mice. Additionally, acute anti-inflammatory effect of 4- PSQ in a model of pleurisy induced by carragenan in mice was investigated. 4-PSQ reduced the cellular migration, pleural exudate accumulation and myeloperoxidase activity induced by carragenan exposure. Additionally, 4-PSQ protected against the increase in reactive species levels and reduction of nonprotein thiols levels induced by carragenan. Data presented here showed that the modulation of serotonergic and nitrergic systems contributed to the antinociceptive effect of 4-PSQ and it reinforced has therapeutical potential for acute inflammation.

Keywords: nociception; inflammation; mechanisms; nitric oxide; serotonin; selenium.

1. Introduction

Quinoline compounds have attracted great attention due important biological proprieties in the field of drug development (Bhasin, 2010; Chung et al., 2015; Manera et al., 2015; Mantovani et al., 2014; Marella et al., 2013; Parameswaran et al., 2013; Shtrygol' Siu et al., 2012). In this sense, our research group has shown the synthesis and pharmacological properties of new quinoline derivates (Pinz et al., 2016; Savegnago et al., 2013; Saraiva et al, 2015; Wilhelm et al., 2014). Recently, we demonstrated antinociceptive and anti-inflammatory potential of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) and its pharmacological actions were correlated to antioxidant property (Pinz et al., 2016).

In view of our continued interest in the pharmacology of this compound, it is important to highlight some advantages of 4-PSQ that justify the objective in extending our knowledge of the anti-inflammatory and antinociceptive potential of this quinolinic compound. The use of compounds with a potential antioxidant effect has received attention from researchers and they are promising therapies by acting as a “multi-target” drug, which is important in the treatment of associated pathologies (Chen and Decker, 2013; Duvvuri et al., 2015; Marseglia et al., 2015; Thanan et al., 2015). In this context, 4-PSQ antioxidant activity is an important advantage. Therefore, it should be noted that 4-PSQ did not cause renal and hepatic impairment (Pinz et al., 2016) while non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and steroidal anti-inflammatory drugs (SAIDs) used clinically to treat pain and inflammation cause these adverse effects (Burukoglu et. al., 2014, Kumar and Jain, 2014). Additionally, 4-PSQ presented antinociceptive and anti-inflammatory actions at low doses (0.1 - 25 mg/kg, p.o.) reinforcing its pharmacological potential (Pinz et al., 2016). Moreover, it is an organoselenium compound synthesized in high yields and under simple

reaction conditions (Savegnago et al., 2013). Importantly, organoselenium compounds have received the attention of researchers because their broad pharmacological potential (Nogueira et al., 2003; Nogueira and Rocha, 2011). Finally, results of Pinz et al. (2016) were consistent with the fact that meloxicam (25 mg/kg, p.o.), a reference drug, presented similar results to 4-PSQ (25 mg/kg, p.o.) in experimental models of nociception and inflammation.

Considering this background regarding the potential of 4-PSQ, the knowledge of their pharmacological properties and the mechanisms involved in these actions should be extended. In this sense, the objectives of this study were: (a) to evaluate the contribution of serotonergic and nitroergic systems in the antinociceptive effect elicited by 4-PSQ; and (b) to investigate the anti-inflammatory action of 4-PSQ in a model of pleurisy induced by carragenan (acute inflammation).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male adult Swiss mice (25–35 g) were obtained from the Federal University of Pelotas, Brazil (UFPel) and kept at controlled room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with free access to food and water, under a 12 h light/dark cycle (with lights on at 6:00 a.m.). Mice were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the same University (CEEAA 8997). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments.

2.2. Drugs and reagents

Carrageenan, Evans blue dye, WAY100635, ketanserin, pindolol, L-arginine hydrochloride (L-arginine) e ω -nitro-L-arginine (L-NOARG), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dexamethasone (used as reference drug) and Tween 80 were obtained commercially. 4-PSQ (Figure 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 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Ketanserin and WAY100635 were dissolved in isotonic saline solution, pindolol was dissolved in Tween 80 (10 %), and 4-PSQ was dissolved in canola oil.

2.3 *In vivo* experiments

2.3.1 Evaluation of the involvement of serotonergic and nitrergic systems in the antinociceptive effect of 4-PSQ

In order to investigate the participation of the serotonergic and nitrergic systems in the antinociceptive action of 4-PSQ, the acetic acid-induced abdominal writhing test was used. The abdominal constrictions were induced by an intraperitoneal injection (i.p.) of 450 μl of acetic acid (1.6 %) according to the procedures described previously (Côrrea and Calixto, 1993; Nogueira et al., 2003). After the acetic acid injection, mice were individually placed in separate boxes, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min.

2.3.1.1 Involvement of serotonergic system

The possible contribution of the serotonergic system in the antinociceptive action of 4-PSQ was investigated using WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{1A} receptor), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{2A} receptor) and pindolol (1 mg/kg, i.p., a nonselective antagonist of 5-HT_{1A/1B} receptors). Fifteen minutes after the antagonists or vehicle administration (10 ml/kg of body weight, i.p.), animals received 4-PSQ (25 mg/kg, per oral, p.o.) and after 30 min, the acetic acid injection. The pre-treatment times, doses and route of administration were selected in accordance with previous study (Jesse et al., 2009; Pinz et al., 2016).

2.3.1.2 Involvement of L-arginine-nitric oxide (NO) pathway

In order to investigate the role played by L-arginine-NO pathway in the antinociception caused by 4-PSQ, mice were pretreated with L-arginine, a NO precursor (600 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 ml/kg of body weight, i.p.), and 20 min later they received 4-PSQ (25 mg/kg, p.o.), L-NOARG (75 mg/kg, i.p., an inhibitor of NO synthase) or respective vehicle (10 ml/kg of body weight). After 30 min, mice received acetic acid injection. The pre-treatment times, doses and route of administration were selected in accordance with previous study (Sari et al., 2014; Pinz et al., 2016).

2.3.2 Open-field task

Spontaneous locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (number of times reared on the hind limbs) activities were assessed using the open-field test (Walsh and Cummins, 1976). The open-field was made of

plywood with 30 cm in height, 45 cm in length and 45 cm in width. The apparatus floor was divided by masking tape into 9 squares (3 rows of 3). Mice were pretreated in according itens 2.3.1.1 and 2.3.1.2. Thirty minutes after the treatments, each animal was placed individually in the center of the apparatus to counting crossings and rearings, in a 5 min session.

2.4 *Ex vivo* experiments

2.4.1 Carrageenan-induced pleurisy in mice

Mice were divided into six groups of 6 animals each: Group 1 (control): canola oil + saline; Group 2 (4-PSQ): 4-PSQ + saline; Group 3 (Dx): dexamethasone + saline; Group 4 (Cg): canola oil + carrageenan; Group 5 (4-PSQ + Cg): 4-PSQ + carrageenan; Group 6 (Dx + Cg): dexamethasone + carrageenan.

Animals received 4-PSQ (25 mg/kg, p.o.) or canola oil (10 ml/kg of body weight, p.o.) or dexamethasone (25 mg/kg, p.o.), 30 min before pleurisy induction.

Pleurisy was induced by a single intrapleural (i.pl.) injection of 0.1 ml of carrageenan (1 %, dissolved in NaCl 0.9 %) into the right pleural cavity of the animals, as previously described (Henriques et al., 1992). Four hours after carrageenan or saline injection, animals were killed, the thorax was opened and the pleural cavity was washed with 1.0 ml of phosphate buffered saline (PBS) [NaCl (130 mmol), Na₂HPO₄ (5 mmol), KH₂PO₄ (1 mmol) and distilled water (1,000 ml) containing heparin (20 IU/ml), pH 7.6].

Pleural fluid samples were collected for further determinations of total leukocytes, myeloperoxidase (MPO) activity, reactive species (RS) and nonprotein thiols (NPSH) levels and Evans blue assay.

2.4.1.1 Total leukocytes count

Total leukocytes count was performed in a Neubauer chamber by means of an optical microscope after diluting sample of the collected fluid from the pleural space with Türk solution (1:20). Results were expressed as total leukocytes ($\times 10^6/\text{cavity}$).

2.4.1.2 MPO activity

MPO activity was determined according to the method of Suzuki et al. (1983), with some modifications. Briefly, the pleural fluid samples were subjected to ultrasonic bath and then frozen and thawed three times. The volume 100 μl was collected in this fluid and added in 860 μl potassium acetate buffer (pH 7.4) and then stirred. This mixture was kept on ice to add to the further reading bucket 20 μl tetramethylbenzidine (TMB) and 20 μl hydrogen peroxide. The absorbance was monitored at a wavelength of 655 nm. Results were expressed as optic density (OD)/minute.

2.4.1.3 NPSH levels

The concentration of NPSH levels in the pleural exudates was estimated according to the method previously described (Sedlak and Lindsay, 1968) with some modifications (Silva et al, 2014). Aliquots (600 μl) of the pleural exudates were centrifuged at 1500 $\times g$ for 15 min at 4°C. Next, 400 μl of each supernatant was mixed with 800 μl of Tris buffer (0.4 M, pH 8.9) and 20 μl of 0.01 M 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). Subsequently, the samples were stirred for 3 min and read on a spectrophotometer at 412 nm. NPSH levels were expressed as μmol of NPSH/ml of pleural exudate.

2.4.1.4 RS levels

The levels of RS production in the pleural fluid were determined in an assay in which samples were incubated with 10 µl of dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1 mM). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) is measured for the detection of intracellular RS. The DCHF-DA is a nonfluorescent compound, which easily crosses cell membranes and, in the presence of RS is rapidly oxidized to its highly fluorescent derivative DCF (Loetchutin et al., 2005). The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. Results were expressed as units of fluorescence.

2.4.1.5 Pleural exudates (Evans blue assay)

For this experiment, another set of animals was used for all groups. Measurements of the amount of dye Evans blue extravasation were used to evaluate the degree of pleural exudate. The experimental groups were the same in the above Section 2.4.1. One hour before the induction of pleurisy, animals received an Evans blue dye solution (25 mg/kg, 0.2 ml, intravenous, i.v.) (Saleh et al., 1999). After pretreatment time, carragenan (0.1 ml, 1 %) or saline (0.1 ml, 0.9 % NaCl) was injected into the right pleural cavity. The animals were killed 4 h after the carragenan or saline injection. The thorax was opened, the pleural cavity was washed with 1 ml of saline (NaCl 0.9 %) plus heparin (20 IU/ml), and the pleural fluid was collected and centrifuged at 900 x g for 5 min. The sample of pleural fluid (1 ml) was used to determine the concentration of Evans blue dye at 600 nm by interpolation from a standard curve constructed for Evans blue (0.5-25 mg/ml).

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as the mean (s) $\pm$ standard error of the means (SEM). Statistical analysis of differences between groups was performed using a two-way ANOVA followed by the Newman Keuls test, when appropriated, using Graphpad Prism® 5. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Evaluation of the involvement of serotonergic and nitrenergic systems in the antinociceptive effect of 4-PSQ

3.1.1 Involvement of serotonergic system

The two-way ANOVA revealed significant 4-PSQ x WAY100635 [$F_{(1,28)} = 14.72$, $P < 0.001$], 4-PSQ x ketanserin [$F_{(1,28)} = 7.78$, $P < 0.01$] and 4-PSQ x pindolol [$F_{(1,28)} = 30.93$, $P < 0.0001$] interactions.

The antinociceptive effect exerted by 4-PSQ in the acetic acid test was altered by the pretreatment of mice with different serotonergic antagonists. Pretreatment of animals with WAY100635 ($P < 0.001$) (Fig. 2), ketanserin ($P < 0.01$) (Fig. 3) and pindolol ($P < 0.0001$) (Fig. 4), partially reversed antinociception caused by 4-PSQ in the acetic acid-induced abdominal writhing test.

3.1.2 Involvement of L-arginine-NO pathway

The two-way ANOVA of involvement of NO pathway demonstrated significant 4-PSQ x L-arginine [$F_{(1,28)} = 132.5$, $P < 0.0001$] and L-NOARG x L-arginine [$F_{(1,28)} = 88.93$, $P < 0.0001$] interactions.

Treatment with L-arginine ($P < 0.0001$) partially reversed antinociception caused by L-NOARG ($P < 0.0001$). The systemic pre-administration of L-arginine ($P <$

0.0001) was effective in partially blocking the antinociceptive effect of 4-PSQ ($P < 0.0001$) in the acetic acid-induced abdominal writhing test (Fig. 5).

3.1.3. Open-field test

No alteration in the number of crossings and rearings was observed after the different treatments of mice ($P > 0.05$) (data not shown).

3.1.4. Carrageenan-induced pleurisy in mice

3.1.4.1. Total leukocytes count

The two-way ANOVA of total leukocytes count yielded significant carrageenan x 4-PSQ [$F_{(1,20)} = 35.93$; $P < 0.0001$] and carrageenan x dexamethasone [$F_{(1,20)} = 71.31$; $P < 0.0001$] interactions. Post-hoc comparisons demonstrated that carrageenan increased total leukocytes count in the pleural cavity (3.9 times higher than control group) ($P < 0.0001$). 4-PSQ ($P < 0.0001$) and dexamethasone (a positive control) ($P < 0.0001$) treatments protected against the increase in the total leukocyte count induced by carrageenan (Fig. 6). Dexamethasone presented higher reduction in the total leukocytes count than 4-PSQ ($P < 0.05$). Mice treated with 4-PSQ or dexamethasone alone did not change the total leukocytes count in the pleural cavity (data not shown).

3.1.4.2. MPO activity

The two-way ANOVA of MPO activity revealed significant carrageenan x 4-PSQ [$F_{(1,20)} = 14.24$; $P < 0.01$] and carrageenan x dexamethasone [$F_{(1,20)} = 14.57$; $P < 0.01$] interactions. Post-hoc comparisons revealed that carrageenan increased MPO activity in the pleural cavity (about 238 %) ($P < 0.0001$). 4-PSQ ($P < 0.01$) and

dexamethasone (a positive control) ($P < 0.01$) treatments protected against the increase on MPO activity caused by carrageenan in the pleural cavity (Fig 7). 4-PSQ effect was similar to dexamethasone ($P > 0.05$). Mice treated with 4-PSQ or dexamethasone alone did not change the MPO activity in the pleural fluid (data not shown).

3.1.4.3. NPSH levels

Data of NPSH levels showed significant carrageenan x 4-PSQ [$F_{(1,20)} = 9.129$; $P < 0.01$] and carrageenan x dexamethasone [$F_{(1,20)} = 51.23$; $P < 0.0001$] interactions. Post-hoc comparisons revealed that carrageenan reduced NPSH levels in the pleural cavity (about 60 %) ($P < 0.05$). 4-PSQ ($P < 0.05$) and dexamethasone (a positive control) ($P < 0.0001$) treatments protected against the reduction in the NPSH levels caused by carrageenan in the pleural cavity (Fig. 8). Levels of dexamethasone were higher than 4-PSQ ($P < 0.05$). Mice treated with 4-PSQ or dexamethasone alone did not change the NPSH levels in the pleural fluid (data not shown).

3.1.4.4. RS levels

The two-way ANOVA of RS levels demonstrated carrageenan x 4-PSQ [$F_{(1,20)} = 27.54$; $P < 0.0001$] and carrageenan x dexamethasone [$F_{(1,20)} = 11.77$; $P < 0.01$] interactions. Post-hoc comparisons showed that carrageenan increased RS levels in the pleural fluid (206 %) ($P < 0.0001$). 4-PSQ ($P < 0.0001$) and dexamethasone (a positive control) ($P < 0.001$) were partially effective against the increase in RS levels induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy (Fig. 9). 4-PSQ was more effective in reducing the RS levels than dexamethasone ($P < 0.05$). Treatment of

mice with 4-PSQ or dexamethasone alone did not change RS levels in the pleural fluid (data not shown).

3.1.4.5 Pleural exudate

The two-way ANOVA of Evans blue dye showed significant carrageenan x 4-PSQ [$F_{(1,20)} = 84.65$; $P < 0.0001$] and carrageenan x dexamethasone [$F_{(1,20)} = 75.63$; $P < 0.0001$] interactions. Post-hoc comparisons demonstrated that carrageenan increased Evans blue dye concentration in the pleural cavity (2 times higher than control group) ($P < 0.0001$). 4-PSQ ($P < 0.0001$) and dexamethasone (a positive control) ($P < 0.0001$) treatments partially protected against the increase of Evans blue dye concentration caused by carrageenan in the pleural cavity (Fig. 10). 4-PSQ effect was similar to dexamethasone ($P > 0.05$). Treatment of mice with 4-PSQ or dexamethasone alone did not change the exudation in the pleural cavity (data not shown).

4. Discussion

In the present study, we extended previous data in the literature (Pinz et al., 2016) by demonstrating that the antinociceptive effect of the 4-PSQ may be associated, at least in part, with its ability to directly or indirectly modulate the serotonergic and nitroergic systems. Additionally, we have also demonstrated that 4-PSQ elicits anti-inflammatory activity in the pleurisy model in mice.

At the outset, we attempted to characterize the mechanisms involved in the antinociception of 4-PSQ through the pretreatment of animals with several drugs capable of interfering in different systems involved in the nociceptive transmission process (Chen et al., 2015; Gediz et al., 2015; Oliveira et al., 2009, Xie et al., 2012).

The induction of nociception behaviors in animals relies upon a stimulus applied to a nociceptive neuron and the activation of a nociceptive pathway. Several drugs induce antinociception by interfering with the neuronal pathways involved in the receipt and transmission of the nociceptive information from the periphery to higher centers in the central nervous system (Zasso et al., 2005).

In agreement with the results obtained in the writhing test, WAY100635, ketanserin and pindolol, blocked the activity of 4-PSQ, suggesting that 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A/1B} receptors would be involved, at least in part, in the antinociception caused by studied compound. Indeed, serotonergic system is one of the well-known non-opioid mediators for analgesia (Kim et al., 2013). According Zhao and collaborators (2014), the bulb spinal serotonin system may suppress incoming noxious input to the spinal cord and inhibit pain transmission. Moreover, the multiple 5-HT receptor types are related with different roles in the control of nociception, reflecting their patterns of coupling to intracellular transduction mechanisms (Bardin et al., 2000; Lee et al., 2014). Our findings are in accordance with studies showing that other organoselenium compounds have potent antinociceptive activities by modulating serotonergic system (Brüning et al. 2014; Jesse et al., 2009; Luchese et al., 2010; Zasso et al., 2005).

In the same way, the involvement of nitrergic system on antinociceptive effect of 4-PSQ was investigated. It is well accepted that L-arginine/NO-cGMP pathway is involved in the modulation of pain perception (Feng et al., 2012). Additionally, it is established that an increase in the production of NO will lead to an augmentation in the synthesis or release of pro-inflammatory mediators, promoting inflammatory reactions and nociceptive sensations (Bruzziches et al., 2013). There is evidence that the activation of NO synthase (NOS) with a consequent production of NO plays

an important role in the central and peripheral modulation of nociception (Chen et al., 2015). A closer inspection of results revealed that L-arginine was effective in partially blocking the antinociceptive effect of 4-PSQ in the acetic acid-induced abdominal writhing test, suggesting that the modulation of nitrenergic system also contribute to antinociceptive effect of 4-PSQ.

Recently, we showed the 4-PSQ anti-inflammatory effect on ear inflammation model induced by croton oil (Pinz et al., 2016). In this sense, in order to extend our knowledge about anti-inflammatory potential of 4-PSQ, in a model of pleurisy induced by carrageenan was employed. Here, treatment of mice with 4-PSQ decreased the acute inflammation parameters induced of carrageenan such as total leukocytes count, pleural exudates (Evans blue assay) and MPO activity. Indeed, most of the results were similar to dexamethasone, a reference drug, making consistent and relevant this study. Indeed, acute inflammatory reaction induced by injection of carrageenan is characterized by marked accumulation of pleural exudates and intense activation, adhesion and migration of leukocytes in the pleural cavity (Müller et al., 2016) and physiological and biochemical changes occur over a short time course (Gediz et al., 2015). The increase in the vascular permeability is characterized by exudation and it is considered as a major feature of acute inflammation in the inflammatory sites (Paul et al., 2009). Evidences indicates that MPO activity is an indirect marker of active neutrophils (represent 65% of leukocytes) and results in the exudation and migration of monomorphonuclear cells (Guo and Ward, 2007; Petronilho et al., 2015).

Pleurisy has been linked to neutrophils infiltration and production of their derived free radicals, as well as the local release of other mediators (Kroegel and Antony, 1997). In this sense, all these events culminate in an oxidative imbalance

due to the higher free radicals production and the antioxidant depletion associated with an intense inflammatory process (Talero et al., 2012). Here, we found that 4-PSQ treatment was effective in preventing the alterations on NPSH and RS levels induced by carragenan. Thus, these results are consistent with our previous findings that 4-PSQ antioxidant property contributes to its anti-inflammatory effect (Pinz et al., 2016).

5. Conclusion

In summary, the present study showed that the modulation of serotonergic and nitrenergic systems contributed to the antinociceptive effect of 4-PSQ. Data presented here also provided more evidence for the reinforce of anti-inflammatory effect of 4-PSQ in mice. These data suggest that 4-PSQ has therapeutical potential for acute inflammation treatment, revealing the promising potential of quinolinic derivative as an alternative in the development of future new therapeutic strategies.

Acknowledgments

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

Funding

This work was supported by FAPERGS (1946-2551/13-0).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

References

- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschalier, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*. 86, 11-18.
- Bhasin, K. K., 2010. Synthesis and characterization of novel quinolone selenium compounds: X-ray structure of 6-methoxy-3H-[1,2]diselenolo[3,4-b]quinoline. *J. Organomet. Chem.* 695, 1065-1068.
- Brüning, C. A., Gai, B. M., Soares, S. M., Martini, F., Nogueira, C. W., 2014. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 125, 15-20.
- Bruzziches, R., Francomano, D., Gareri, P., Lenzi, A., Aversa, A., 2013. An update on pharmacological treatment of erectile dysfunction with phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Expert. Opin. Pharmacother.* 14, 1333-1344.
- 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*. 32, 980-986.
- Chen, X., Decker, M., 2013. Multi-target compounds acting in the central nervous system designed from natural products. *Curr. Top. Med. Chem.* 20, 1673-1685.
- Chen, J. Q., Zeng, Y. M., Dai, T. J., Tang, Q. F., 2015. Intrathecal l-arginine reduces the antinociception of sevoflurane in formalin-induced pain in rats. *Neurosci. Lett.* 590, 156-160.

- Chung, P. Y., Gambari, R., Chen, Y. X., Cheng, C. H. ; Bian, Z. X., Chan, A., Tang, J., Leung, P., Chui, C.H., Lam, K. H., 2015. Development of 8-benzyloxy-substituted quinoline ethers and evaluation of their antimicrobial activities. *Med. Chem. Res.* 24, 1568-1577.
- Corrêa, C., Calixto, J., 1993. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 110, 193-198.
- Duvvuri, L.S., Katiyar, S., Kumar, A., Khan W., 2015. Delivery aspects of antioxidants in diabetes management. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 1-18.
- Feng, X. J.J., Liu, X., Zhou, F.H., Song, X.Y., Yang, X.S., Chen, W.Q., Huang, L.H., Zhou, J.H., 2012. Single sevoflurane exposure decreases neuronal nitric oxide synthase levels in the hippocampus of developing rats. *Br. J. Anaesth.* 109, 225-233.
- Gediz, E. I., Cahit, N., Edibe, M., Gulay, S., 2015. Antinociceptive Effect of Vardenafil on Carrageenan-Induced Hyperalgesia in Rat: Involvement of Nitric Oxide/Cyclic Guanosine monophosphate/Calcium Channels Pathway. *Iran. J. Pharm. Res.* 14, 1137-1143.
- Guo, R.F., Ward., P.A., 2007. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 1991-2002.
- Henriques, M.G., Rae, G.A., Cordeiro, R.S., Williams, T.J., 1992. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw edema and pleurisy in the mouse. *Br J. Pharmacol.* 106, 579-82.
- Jesse, C. R., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Savegnago, L., 2009. Further analysis of the antinociceptive action caused by *p*-methoxyl-diphenyl diselenide in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91, 573-580.

- Kim, W., Kim, S.K., Min, B.I., 2013. Mechanisms of electroacupuncture-induced analgesia on neuropathic pain in animal model. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2013, 913-924.
- Kumar, T., Jain, V., 2014. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Methanolic Fruit Extract in Experimental Animals. *Scientific World Journal.* 2014, 151-163.
- Kroegel, C., Antony, V.B., 1997. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur. Respir. J.* 10, 2411-2418.
- Lee, J. H., Li, D. X., Heera, Y., Donghyun, G., Fu, S. Q., Byung, M., Sun, K. K., 2014. Serotonergic mechanism of the relieving effect of bee venom acupuncture on oxaliplatin-induced neuropathic cold allodynia in rats. *BMC Complement Altern Med.* 14, 471-478.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay- Gerin, J., Mankhetkorn, 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.
- Manera, C., Malfitano, A.M., Parkkari, T., Lucchesi, V., Carpi, S., Fogli, S., Bertini, S., Laezza, C., Ligresti, A., Saccomanni, G., Savinainen, J.R., Ciaglia, E., Pisanti, S., Gazzo, P., Di Marzo, V., Nieri, P., Macchia, M., Bifulco, M., 2015. New quinolone and 1,8-naphthyridine-3-carboxamides as selective CB₂ receptor agonists with anticancer and immuno-modulatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 10-18.
- Luchese, C., Prigol, M., Acker, C., Nogueira, C., 2010. Antinociceptive effect of butyl (2-phenylethynyl) selenide on formalin test in mice: Evidences for the involvement of serotonergic and adenosinergic systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* 644, 49-54.

- Marella, A., Tanwar, O.P., Saha, R., Ali, M.R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M., Alam, M.M., 2013. Quinoline: A versatile heterocyclic. Saudi Pharm. J. 21, 1-12.
- 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.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., Arrigo, T., 2015. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. Int. J. Mol. Sci. 16, 378-400.
- Müller, S. D., Florentino, D., Ortmann, C. F., Martins, F. A., Danielski, L. G., Michels, M. S., Constantino, L., Petronilho, F., Reginatto, F. H., 2016. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. J. Ethnopharmacol. 185, 255-262.
- Nogueira, C., Quinhones, E., Jung, E., Zeni, G., Rocha, J., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyldiselenide. Inflamm. Res. 52, 56-63.
- Nogueira, C., Rocha, J., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. Arch. Toxicol. 85, 1313-1359.
- Oliveira, R. A., Savegnago, L., Jesse, C. R., Menezes, P. H., Molander, G. A., Nogueira, C. W., 2009. Toxicological Investigation and Antinociceptive Property of Potassium Thiophene-3-Trifluoroborate. Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol. 104, 448-454.
- Parameswaran, K., Sivaguru, P., Lalitha, A., 2013. Synthesis of novel bis(pyrimido[5,4-c]quinoline-2,4(1H,3H)-dione) and its derivatives: evaluation of their antioxidant properties. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 3873-3878.

- Paul, E.L., Lunardelli, A., Caberlon, E., de Oliveira, C.B., Santos, R. C., Biolchi, V., Bastos, C.M., Moreira, K.B., Nunes, F.B., Gosmann, G., de Oliveira, J.R., 2009. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharistriera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflamm. Res.* 32, 419-425.
- Petronilho, F., Florentino, D., Silvestre, F., Danielski, L. G., Nascimento, D. Z., Vieira, A., Kanis, L. A., Fortunato, J. J., Badawy, M., Barichello, T., Quevedo, J., 2015. Ebselen Attenuates Lung Injury in Experimental Model of Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats. *Inflamm. Res.* 38, 1394-1400.
- Pinz, M., Schiavon, A., Duarte, V., Rocha, M., Goldani, B., Alves, D., Savegnago, L., Luchese, C., Wilhelm, E., 2016. 4-phenylselenyl-7 chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *Eur. J. Pharmacol.* 780, 122-128.
- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1999. Effects of antiinflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides.* 20, 949-956.
- Sari, M. H. M., Souza, A. C. G., Rosa, S. G., Souza, D., Rodrigues, O. E. D., Nogueira, C.W., 2014. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *Eur. J. Pharmacol.* 725, 79-86.
- 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-triazoyl Carboxylates: Organocatalytic Synthesis and Antioxidant Properties. *J. Braz. Chem. Soc.* 1, 41-53.
- Savegnago, L., Vieira, A.I., 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, 40-4.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 24, 1992-2005.

Shtrygol', Siu., 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.

Silva, R. O., Salvadori, M. S., Sousa, F. B., Santos, M. S., Carvalho, N. S., Sousa, D. P., Gomes, B. S., Oliveira, F. A., Barbosa, A. L., Freitas, R. M., Almeida, R. N., Medeiros, J. R., 2014. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. *Flav. Fragr. J.* 29, 184-192.

Suzuki, K, Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 132, 345-352.

Talero, E., Di Paola, R., Mazzon, E., Emanuela, E., Motilva, V., Cuzzocrea, S., 2012. Anti-inflammatory effects of adrenomedullin on acute lung injury induced by carrageenan in mice. *Mediators Inflamm.* 2012, 1-13.

Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., Murata, M., 2014. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 193-217.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482-504.

Wilhelm, E.A., Machado, N.C., Pedroso, 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.* 4, 41437-41445.

Xie, D. J., Uta, D., Feng, P. Y., Wakita, M., Shin, M. C., Furue, H., Yoshimura, M., 2012. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. *Mol. Pain.* 8, 58-70.

Zasso, F.; Gonçalves, C.; Jung, E.; Araldi, D.; Zeni, G.; Rocha, J.; Nogueira, C., 2005. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 283-289.

Zhao, Z.Q., Liu, X.Y., Jeffry, J., A. Karunarathne, W.K., Li, Jin-Lian, Munanairi, A., Zhou, X.Y., Li, H., Sun, Y. G., Wan, L., Wu, Z.Y., Kim, S., Huo, F. Q., Mo, P., Barry, D. M., Zhang, C. K., Kim, J.Y., Gautam, N., Renner, K.J., Li, Y.Q., Chen, Z. F., 2014. Descending Control of Itch transmission by the Serotonergic System via 5-HT_{1A}-Facilitated GRP-GRPR Signaling. *Neuron.* 84, 821-834.

Legend of figures

Fig. 1 – Chemical structure of 4-PSQ.

Fig. 2 – WAY100635 effect (0.7 mg/kg, i.p.) on antinociceptive action of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 mice in each group. (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ denotes significance levels when compared to the control group, (#) $P < 0.001$ denotes significance levels when compared to 4-PSQ group (Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test).

Fig. 3 – Ketanserin effect (0.3 mg/kg, i.p.) on antinociceptive action of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 mice in each group. (***) $P < 0.001$ denotes significance levels when compared to the control group and (#) $P < 0.01$ denotes significance levels when compared to 4-PSQ group (Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test).

Fig. 4 – Pindolol effect (1 mg/kg, i.p.) on antinociceptive action of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 mice in each group. (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the control group and (#) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to 4-PSQ group (Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test).

Fig. 5 – L-arginine effect (600 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive action of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) and L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) on the writhing behavior induced by acetic acid in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 mice in each group. (*) $P < 0.05$ and (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to control group and (#) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to 4-PSQ or L-NOARG group (Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls' test).

Fig. 6 – Effect 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dx) (25 mg/kg, p.o.) on total leukocytes in the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice in each group. (**) $P < 0.01$ and (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the control group, (#####) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the carrageenan (Cg) group and (a) $P < 0.05$ when compared to the 4-PSQ + Cg group.

Fig. 7 – Effects of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dx) (25 mg/kg, p.o.) on MPO activity in the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice in each group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the control group, (##) $P < 0.01$ and (#####) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the carrageenan (Cg) group.

Fig. 8 – Effects of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dx) (25 mg/kg, p.o.) on NPSH levels in the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice in each group. (*) $P < 0.05$ denotes significance levels when compared to the control group, (#) $P < 0.05$ and (#####) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the carrageenan (Cg) group and (a) $P < 0.05$ denotes significance levels when compared to 4-PSQ + Cg group.

Fig. 9 – Effects of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dx) (25 mg/kg, p.o.) on RS levels in the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice in each group. (***) $P < 0.001$ and (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the control group. (##) $P < 0.01$ and (#####) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the carrageenan (Cg) group and (a) $P < 0.05$ when compared to 4-PSQ + Cg group.

Fig. 10 – Effects of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline (4-PSQ) (25 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dx) (25 mg/kg, p.o.) on exudation (Evans blue dye) in the pleural cavity in carrageenan-induced pleurisy in mice. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice in each group. (****) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the control group, (#####) $P < 0.0001$ denotes significance levels when compared to the carrageenan (Cg) group.

Figures

Fig.1

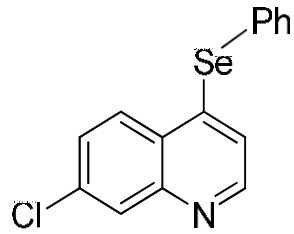


Fig. 2

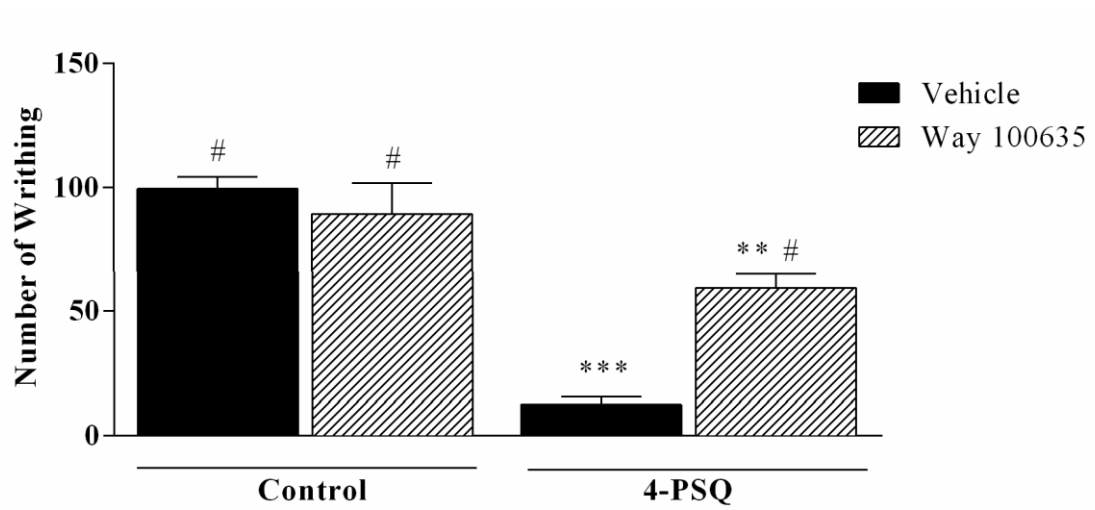


Fig. 3

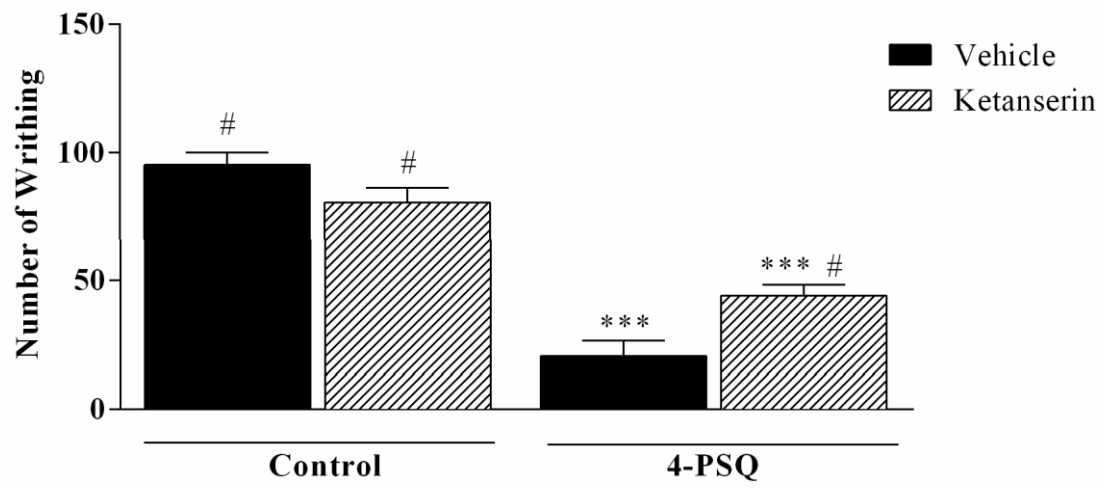


Fig. 4

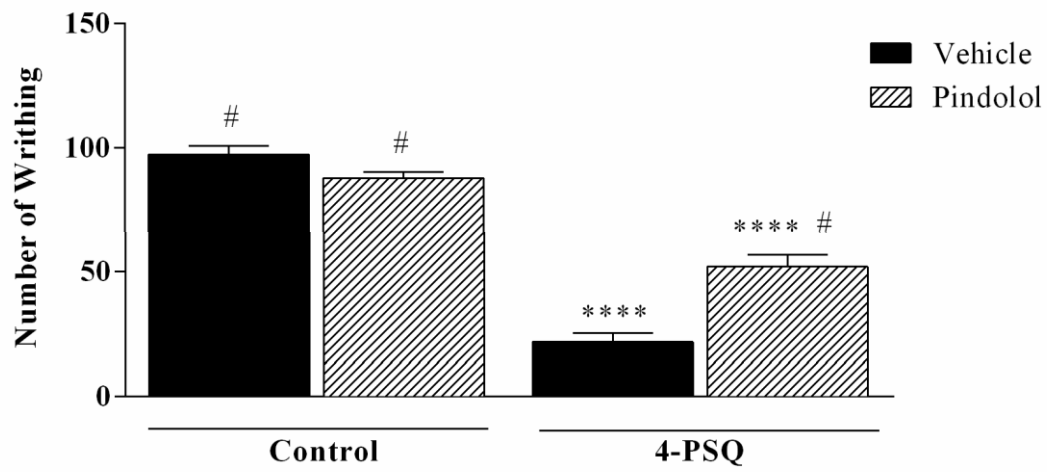


Fig. 5

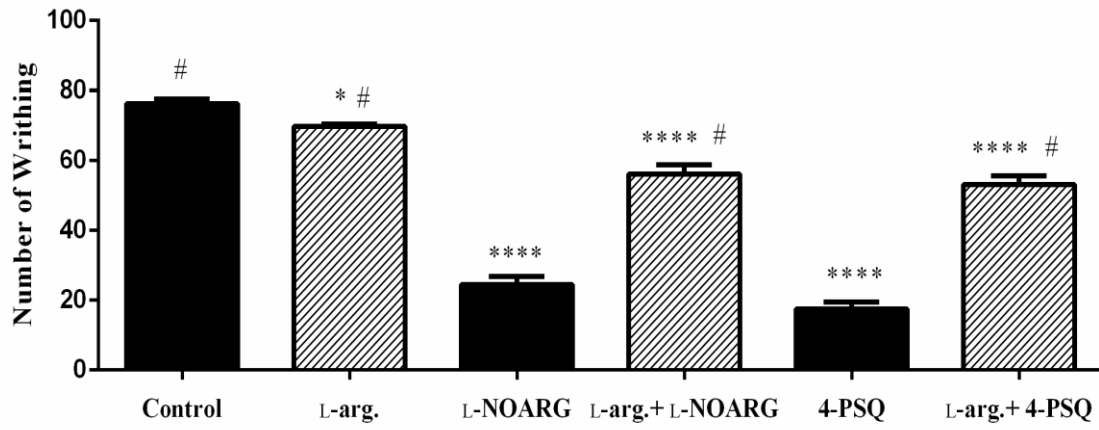


Fig. 6

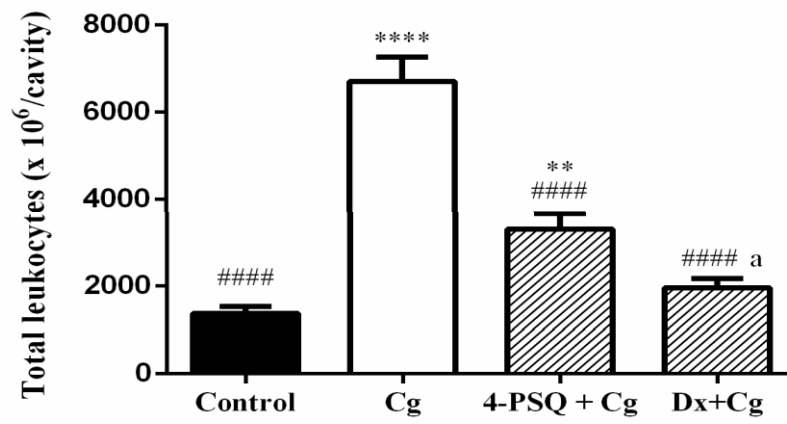


Fig. 7

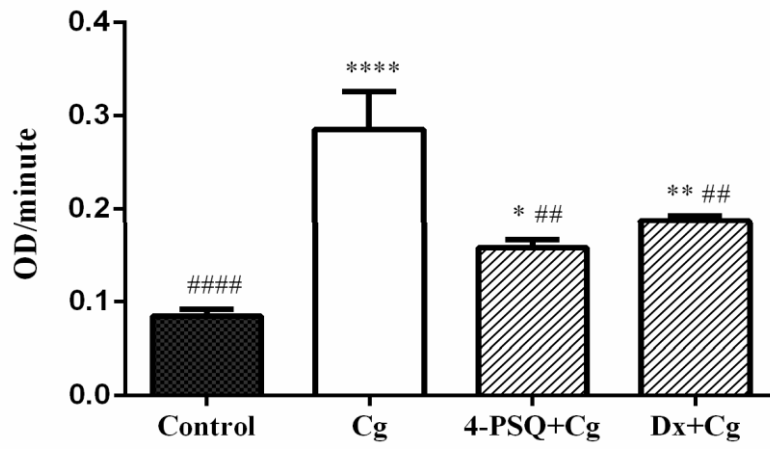


Fig. 8

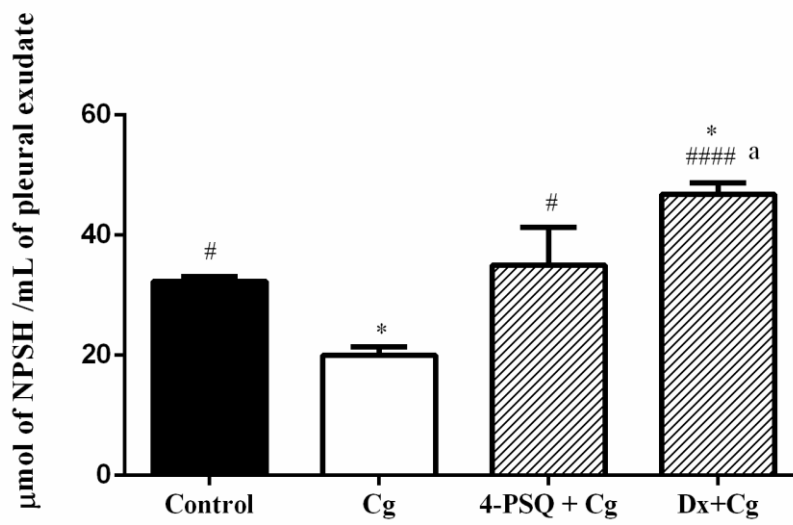


Fig. 9

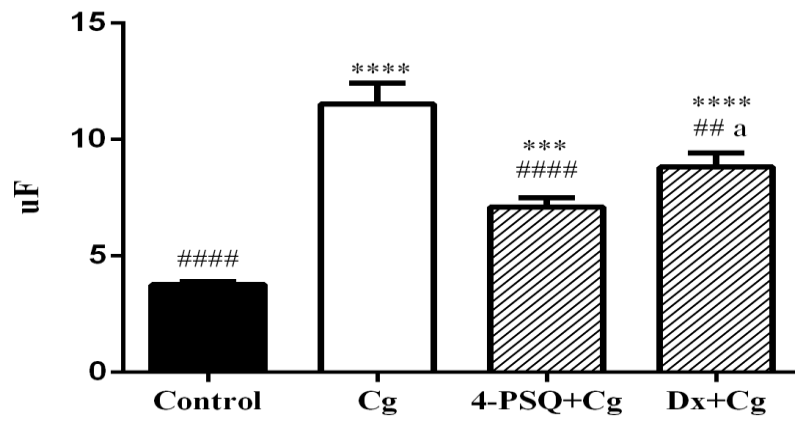
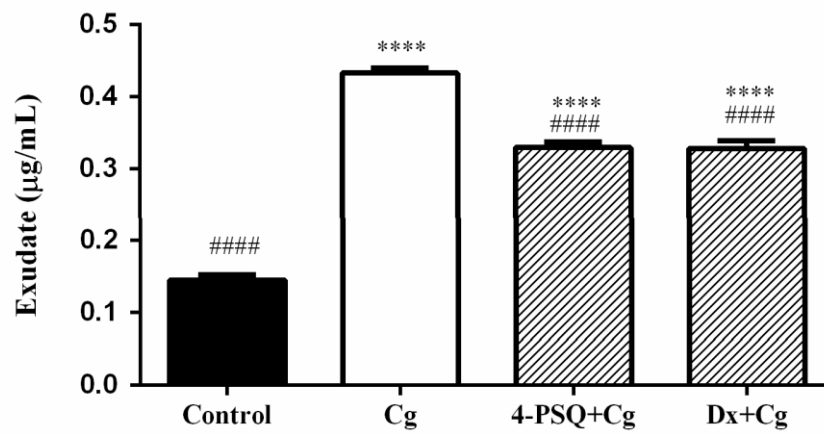


Fig. 10



5 Conclusões

Baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que:

- Os sistemas serotoninérgico e nitrérgico contribuem para a ação antinociceptiva do 4-PSQ.
- O 4-PSQ possui ação anti-inflamatória aguda no modelo de pleurisia, uma vez que este foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios induzidos pela carragenina (conteúdo total de leucócitos, exsudato pleural, atividade da mieloperoxidase).
- A ação antioxidante do 4-PSQ contribui para a sua ação anti-inflamatória.
- O 4-PSQ possui uma ação anti-inflamatória relevante, uma vez que seus efeitos foram similares aos apresentados pela dexametasona (uma droga de referência) no modelo de pleurisia induzida pela carragenina.

Perspectivas

Considerando os resultados obtidos e o interesse do nosso grupo pesquisa na farmacologia do 4-PSQ, pretende-se ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e anti-inflamatória deste composto. 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

- ABDEL-HAFEZ, S. Selenium containing heterocycles: synthesis, anti-inflammatory, analgesic and anti-microbial activities of some new 4-cyanopyridazine-3(2H)selenonederivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1971-1977, 2008.
- ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 189-212, 2013.
- ALMEIDA, M. R. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.** 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2014.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W.H. Glicocorticóides (GC) e as doenças reumáticas do idoso: considerações gerais. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 3, 2008.
- ASOLINI, F. C. et al. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 209-215, 2006.
- BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron Perspective**. n. 87, 2015.
- BARDIN, L. et al. Profound, non opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1A) agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 182-194, 2003.
- BARE, T. et al. Pyridazinoquinolinetriones as NMDA glycine-site antagonists with oral antinociceptive activity in a model of neuropathic pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 3113-3131, 2007.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BRAZ, J. R. C.; CASTIGLIA, Y. M. M. **Temas de anestesiologia**. 2 ed. São Paulo: UNESP, 2000. 316 p.
- BENEDITO, R. B. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BHASIN, K. Synthesis and characterization of novel quinolone selenium compounds: X-ray structure of 6-methoxy-3H-[1,2]diselenolo[3,4-b]quinoline. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 695, p. 1065-1068, 2010.

BORTOLATTO, C. et al. p-Chloro diphenyl diselenide, an organoselenium compound with antidepressant-like and memory enhancer actions in aging male rats. **Biogerontology**, v. 13, p. 237-249, 2012.

BORTOLATTO, C. et al. 2,2'-dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 677-684, 2013.

BRÜNNING, C. et al. Evidence for the involvement μ -opioid and δ -opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 21, p. 621-626, 2010.

CARVALHO, T. S. A Influência dos Receptores 5-HT₃ no Processamento Nociceptivo. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 4, p. 487, 2012.

CAVALCANTE, B. **Pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 na artrite aguda induzida por zymosan em ratos**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado de Ciências Médico-cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2014.

CHAGAS, P. M. et al. Evaluation of the pharmacological properties of salicylic acid-derivative organoselenium: 2-Hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and antinociceptive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 118, p. 87-95, 2014.

CHEN, J. Q. et al. Intrathecal L-arginine reduces the antinociception of sevoflurane in formalin-induced pain in rats. **Neuroscience Letters**, v. 590, p. 156-160, 2015.

CHOI, J. H.; CHA, D. S.; JEON, H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 144, p. 379-386, 2012.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Journal of Pharmacology and chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, M. A. **Efeito modulatório dos receptores de A₁ e A_{2A}, sobre a neurotransmissão nitrérgica em cultura de células da região dorso medial do bulbo de ratos normotensos e geneticamente hipertensos**, 2013. 78 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Universidade de São Paulo, São Paulo 2013.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 3, p. 243-254, 2011.

COUTO, V. M. et al. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 348-353, 2011.

DI, G.; DE DEURWAERDÈRE, P. New therapeutic opportunities for 5-HT_{2c} receptor ligands in neuropsychiatric disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 157, p.125-162, 2016.

FIRESTEIN, G. S. et al. **Kelley's Textbook of Rheumatology**. 9.ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2013. 2292 p.

FRANÇA, N. R. M. **Estudo topográfico da analgesia induzida por estimulação elétrica transdural do córtex motor de ratos: somatotopia de resposta comportamental e perfil de ativação neuronal**. 2012. 19 f. Dissertação (Mestrado em ciências morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Research**, v. 93, n. 2, p. 96-105, 2003.

FOURNET, A. et al. 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.

GADOTTI, V. M. et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 102, p. 549-554, 2012.

GAO, X. et al. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain**, v. 131, p. 262-271, 2007.

GARLAND, E. L. Pain Processing in the Human Nervous System: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 39, p. 561-571, 2012.

GEDIZ, E. I. et al. Antinociceptive Effect of Vardenafil on Carrageenan-Induced Hyperalgesia in Rat: Involvement of Nitric Oxide/Cyclic Guanosine monophosphate/ Calcium Channels Pathway. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 1137-1143, 2015.

GIORNO, T. B. et al. Antinociceptive effect and mechanism of action of isatin, N-methyl isatin and oxopropyl isatin in mice. **Life Science**, v. 15, n. 151, p. 189-198, 2016.

GIORNO, T. B. et al. Central and peripheral antinociceptive activity of 3-(2-oxopropyl)-3-hydroxy-2-oxindoles. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 13-19, 2015.

GRASSI, L. T. **Chenopodium ambrosioides L. – erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante**, 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí 2011.

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

2016, *in press*.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Medicinas Nacionais, 2011. 1101 p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IASP. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Task Force on Taxonomy**. 2a ed. Seattle, WA: IASP Press, 1994. p. 209-214.

IANISKI, F. R. et al. Enhanced anti-inflammatory benefits of meloxicam-loaded lipid-core nanocapsules in a mouse pleurisy model: A comparative study with a free form drug. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 2, p. 105-112, 2016.

JESSELL, T.; IVERSEN, L. L. Opiate analgesic inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. **Nature**, v. 268, p. 549-551, 1977.

KLECZKOWSKA, P.; LIPKOWSKI, A. W. Neurotensin and neurotensin receptors: Characteristic, structure-activity relationship and pain modulation-A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 13, p. 177-185, 2013.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871-1882, 2014.

KUDVA, A. K.; SHAY, A. E.; PRABHU, K. S. Selenium and inflammatory bowel disease. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, p. 71-77, 2015.

KUMAR, T.; JAIN, V. Q.; LUCINDO J. Antinociceptive and anti-Inflammatory activities of methanolic fruit extract in experimental animals. **The Scientific World Journal**, p. 151-163, 2014.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 175-191, 2012.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LIPNIK-STANGELJ, M. Mediators of inflammation as targets for chronic pain treatment. **Mediators of Inflammation**, Hindawi: Eslovênia, 2013. p. 3.

LUCHESE, C. et al. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. **Inflammation Research**, v. 61, p. 1117-1124, 2012.

MANERA, C. et al. New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB2 selective agonists. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 6505-6510, 2007.

MANTOVANI, A. C. et al. Synthesis of pharmacologically active 1-amino-isoquinolines prepared via silver triflate-catalyzed cyclization of o-alkynylbenzaldoximes with isocyanates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 196-203, 2014.

MARELLA, A. et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 1-12, 2012.

MAZIERO, A. M. **Inibição da agregação de plaquetas humana humanas por eosinófilos**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

MEYER, R. A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain, **Stephen B. Mc Mahon e M. Koltzenburg**. 2 ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 34.

MIYAZAWA, K. W. R. et al. Vinpocetine Reduces Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Mice by Inhibiting Oxidative Stress, Cytokine Production and NF- κ B Activation in the Paw and Spinal Cord. **PLOS ONE**, v. 10, n.3, p. 1-18, 2015.

MITKOVSKI, M. et al. Investigations into Potential Extrasynaptic Communication between the Dopaminergic and Nitrergic Systems. **Frontiers in Physiology**. v. 3, n. 372, p. 389-404, 2012.

MOURAUX, A. et al. Unmasking the obligatory components of nociceptive event-related brain potentials. **Journal of Neurophysiology**, v. 110, p. 2312-2324, 2013.

MULEY, M. M.; KRUSTEV, E.; MCDOUGALL, J. J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, p. 88-101, 2015.

NADAL, X. et al. Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: New insights from knockout studies. **European Journal Pharmacology**, v. 14, n. 299, p. 180-185, 2013.

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.

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

PARAMESWARAN, K.; SIVAGURU, P.; LALITHA, A. Synthesis of novel bis(pyrimido[5,4-c]quinoline-2,4(1H,3H)-dione) and its derivatives: evaluation of their antioxidant properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 3873-3878, 2013.

PAVIN, N. F. et al. Antinociceptive and anti-hypernociceptive effects of Se-phenyl thiazolidine-4-carboselenoate in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 169-176, 2011.

PAYNE, J.E. et al. Discovery of dual inducible/neuronal nitric oxide synthase (iNOS/nNOS) inhibitor development candidate 4-((2-cyclobutyl-1Himidazo[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.

PETRONILHO, F. et al. Ebselen Attenuates Lung Injury in Experimental Model of Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 4, 2015.

PINHEIRO, B. G. et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 479-486, 2011.

PINHEIRO, M. M. et al. Antinociceptive esters of N-methylantranilic acid: Mechanism of action in heat-mediated pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, n. 727, p. 106-114, 2014.

PINZ, M. et al. 4-phenylselenyl-7 chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 122-128, 2016.

QUINTANS-JÚNIOR, L. et al. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, an Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 630-639, 2011.

RADMARK, O. et al. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 4, p. 331-339, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 808.

RAPOSO, C. et al. Sildenafil (Viagra) Protective Effects on Neuroinflammation: The Role of iNOS/NO System in Inflammatory Demyelination Model. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 11, 2013.

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

ROCHA, J. et al. 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.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 61-65, 2010.

ROSA, S. G. et al. 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.

ROSEMBERG, G. A. "Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier," **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, p. 1139-1151, 2012.

SARI, M. H. M. et al. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p chloro-selenosteroid. **European Journal of Pharmacology**, v. 725, p. 79-86. 2014.

SANTOS, R. C. V. et al. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Ulmoides dermestoides on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation In Vitro. **Inflammation**, v. 33, n. 3, 2010.

SANTOS, M. R. et al. 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.

SARDELLA, T. B. **Isatina, N-metil-isatina, N-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol: Perfil Antinociceptivo e Mecanismo de Ação**. 2014, 134 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SARAIVA, M. T. et al. 7-Chloroquinoline-1,2,3-triazoyl Carboxylates: Organocatalytic Synthesis and Antioxidant Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 41-53, 2016.

SASAKI, M. et al. Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain. **Anesthesia & Analgesia**, v. 96, n. 6, p. 1072-1078, 2003.

SAVEGNAGO, L. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyldiselenide in the formalin test. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1679-1686, 2008.

SAVEGNAGO, L. et al. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 40-44, 2013.

SCHAIBLE, H. G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, p. 210-216, 2011.

SCHWARTZ, E. S. et al. Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 159-168, 2009.

SHAIKH, P. Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1247-1263, 2011.

SHTRYGOL, S. et al. 2-Methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one as potential antidepressant with nootropic properties. **Eksp Klin Farmakol**, v. 75, p. 7-9, 2012.

SILVA, A. I. **Inibição da recaptação da serotonina durante o desenvolvimento: um estudo do balanço energético e da função mitocondrial**. 2014. 110 f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SILVA, G. L. et al. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 87, n. 2, p. 1397-1408, 2015.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SPATH, M. Current experience with 5-HT₃ receptor antagonists in fibromyalgia. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 319-328, 2002.

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 35-51, 2011.

SYDNEY, P. B. H. **Avaliação somatossensorial do sistema trigeminal em condições cônicas: testes quantitativos sensoriais e limiar de percepção atual**. 2013. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências odontológicas aplicadas) - Faculdade de odontologia de Bauru, Bauru, 2013.

SZOLCSÁNYI, J. et al. Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutical implications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2253-2263, 2011.

TALERO, E. et al. Anti-inflammatory effects of adrenomedullin on acute lung injury induced by carrageenan in mice. **Mediators of Inflammation**, p. 1-13, 2012.

TABAKOFF, B. et al. 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.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 823-836, 2010.

YOWTAK, J. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, v. 152, p. 844-852, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VIEIRA, E. B. M. et al. Prevalence, Characteristics, and Factors Associated With Chronic Pain With and Without Neuropathic Characteristics in São Luís, Brazil. **Journal of Pain and Symptom**, v. 44, n. 2, p. 239-251, 2012.

VINCENS, M. N.; CHYUNG, J. H.; TURNER, T. J. Principles of pharmacology. In: **Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central**. 2. ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, 2008, p.188.

VOLPICELLI, F. et al. The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 318, 2014.

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

WANG, A. et al. Stimulus novelty and not neural refractoriness explains the repetition suppression of laser-evoked potentials (LEPs). **Journal of Neurophysiology**, v. 104, p. 2116-2124, 2010.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3, p. 1-31, 2011.

WELCH, S. P.; SIM-SELLEY, L. J.; SELLEY, D. E. Sphingosine-1-phosphate receptors as emerging targets for treatment of pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1555-1562, 2012.

WERNER, J. A. T. et al. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 163-169, 2009.

WERTZ, I. E.; DIXIT, V. M. Signaling to NF-κB: regulation by ubiquitination, **Cold Spring Harbor perspectives in Biology**, v. 2, n. 3, 2010.

WHITE, K. E.; HUMPHREY, D. M.; HIRTH, F. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. **Frontiers Neuroscience journal**, v. 4, n. 205, p. 389-402, 2010.

WILHELM, E. et al. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 93, p. 419-425, 2009.

WILHELM, E. et al. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazolylcarboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, p. 4143-41445, 2014.

XIE, D. J. et al. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. **Molecular Pain**, v. 8, n. 58, 2012.

XU, L. et al. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. **Nitric Oxide**, United States, v. 17, p. 18-24, 2007.

ZASSO, F. et al. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyldiselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 283-289, 2005.

ZAITONE, S. A.; ABO-GRESHA, N. M. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF. **European Journal Pharmacology**, v. 691, n. 1-3, p. 134-142, 2012.

ANEXO

Anexo A - Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



Pelotas, 28 de novembro 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 dos mecanismos envolvidos nas ações antinociceptiva e anti-inflamatória do 7-cloro-4-(fenilseleno)quinolina em camundongos”**, processo nº23110.008997/2014-16, 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 8997).

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 09 / 12 /2014

Assinatura do(a) Professor(a) Responsável: