

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



Dissertação de mestrado

Efeito antinociceptivo do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol em camundongos

Paloma Taborda Birmann

Pelotas, 2017

Paloma Taborda Birmann

Efeito antinociceptivo do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol em camundongos

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

Orientadora: Lucielli Savegnago

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B617e Birmann, Paloma Taborda

Efeito antinociceptivo de 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1H-indolem camundongos / Paloma Taborda Birmann ; Lucielli Savegnago, orientadora. — Pelotas, 2017.

98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Dor. 2. Inflamação. 3. Selênio. 4. Indol. 5. Camundongos. I. Savegnago, Lucielli, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Paloma Taborda Birmann

Efeito antinociceptivo do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol em camundongos

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

Data da Defesa: 24/07/2017

Banca examinadora:

Lucieli Savegnago

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

César Augusto Brüning

Prof. Dr. César Augusto Brüning
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Daniela Hartwig de Oliveira

Dr.^a. Daniela Hartwig de Oliveira
Doutora em Química pela Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil.

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Eliane, a minha irmã, Paola e ao meu grupo de pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Paulo e Eliane, pela vida, pelo amor, pela educação e por serem meus exemplos. Ao meu pai, que não tenho palavras para agradecer, obrigada por acreditar em mim e me mostrar sempre que somos capazes de correr atrás dos nossos sonhos, obrigada por sempre me dar força, direção e apoio, é por você que hoje estou realizando esta etapa da minha vida, você é meu guerreiro, meu herói, sem você nada disso estaria acontecendo!! À minha mãe, que sem ela não saberia o sentido da palavra amor, obrigada por ser a mulher da minha vida, quem me deu todo carinho, aconchego, mimos e os sorrisos mais lindos, seja sempre assim, uma doce mulher! Obrigada por serem os melhores pais do mundo, amo vocês!

Gostaria de agradecer a Deus, que sempre me iluminou me amparou e me guiou no caminho certo, por sempre estar presente na minha família, nos abençoando e fazendo possíveis nossos sonhos se realizarem! Agradeço muito a minha fé depositada na sua crença!

A minha irmã Paola, que foi minha primeira melhor amiga, a quem desde pequena me inspirava e me orgulhava. Sempre foi meu porto seguro, alguém que sei que sempre vai estar ao meu lado. Obrigada por ser minha companheira e confidente, te amo muito!

A minha vó Herondina, minha segunda mãe. Obrigada por ter sido uma mulher batalhadora e ter dado exemplo de vida e superação. Obrigada pelos incansáveis dias que se dedicou a cuidar e educar o homem o qual tenho o maior orgulho, meu pai! Esse mérito também faz parte de você! Obrigada pelos carinhos, amor e todo cuidado que tivesse comigo, sei que qualquer lugar que eu vou você vai estar me acompanhando.

Ao Elton, por sempre estar me dando força e apoio. Obrigada pelo companheirismo e por dedicar um tempo a me ensinar e ajudar e por sempre presente quando preciso.

A minha orientadora Lucielli pela oportunidade e por ter acreditado em mim, obrigada por todos os ensinamentos, dedicações e pelo exemplo de profissional que com certeza és para todos. Obrigada por fazer parte desta minha caminhada!

A Fernanda, pela amizade, companheirismo e irmandade. Obrigada por ser minha família de Pelotas, alguém que sempre esteve do meu lado me apoiando e ensinando. Vai estar guardada pra sempre no meu coração!

Ao meu grupo de pesquisa GPN, por ser muito mais que apenas um grupo de pesquisa, e sim uma grande família GPN. Agradeço a vocês pela união, amizade, felicidade, companheirismo, apoio, pelas horas de descontrações e por contribuírem muito para esta minha etapa. Obrigada por fazerem parte desta minha caminhada!

Ao grupo de pesquisa LASOL, pela parceria e disponibilização de sintetizar o composto para realização deste trabalho.

Ao biotério central, pelo cuidado com os animais, pela atenção e dedicação para que tudo esteja em ordem nos experimentos.

Ao Cristian, secretário da pós, pela paciência e estar sempre disposto a ajudar.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção e a Universidade Federal de Pelotas pelo apoio e oportunidade.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir.”

(Augusto Cury)

RESUMO

BIRMANN, Paloma Taborda. **Efeito antinociceptivo do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol em camundongos**. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A dor e a inflamação são condições que afetam inúmeras pessoas diariamente em todo o mundo. Com isso a busca por novos compostos para o tratamento de dor e inflamação, que apresentem menos efeitos adversos e melhorem a qualidade de vida dos pacientes continua sendo de grande interesse para os grupos de pesquisas. Diversos estudos vêm demonstrando as propriedades promissoras dos compostos orgânicos de selênio e dos compostos heterocíclicos contendo o núcleo indol nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatórias. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do composto 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol (CMI), em camundongo *Swiss machos*. A atividade antinociceptiva do composto foi avaliada nos testes de nocicepção induzido por agentes químicos (formalina e glutamato) e térmicos (placa quente). O potencial anti-inflamatório foi avaliado no edema de pata induzido por formalina e no edema de orelha induzido por óleo de cróton. Além disso, investigou-se o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, adrenérgico e opioidérgico na ação antinociceptiva do CMI através do teste de nocicepção induzida por glutamato. O teste do campo aberto foi realizado a fim de verificar se o composto não leva a alterações locomotoras nos animais. A administração intragástrica (i.g.) do CMI (0,01-10 mg/Kg) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por glutamato e formalina em ambas as fases, e a dose de 0,1 mg/Kg, foi capaz de aumentar o tempo de latência no teste de placa quente. Além disso, o CMI foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por formalina (0,01 mg/Kg) e o edema de orelha induzido por óleo de cróton (0,1 mg/Kg). O pré tratamento dos camundongos com os antagonistas SCH23390 (antagonista do receptor D₁, 0,05 mg/Kg, intraperitoneal [i.p.]), WAY100635 (antagonista do receptor 5-HT_{1A}, 0,7 mg/Kg, i.p.), ondansetron (antagonista do receptor 5-HT₃, 0,5mg/Kg, i.p.), ketanserina (antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, 0,3 mg/Kg, i.p.), naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides 1 mg/Kg, i.p.), cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adrenérgicos, 3 mg/Kg, i.p.) e prazosin (antagonista do receptor α_1 , 0,15 mg/Kg, i.p.) bloquearam a ação antinociceptiva do CMI (0,01 mg/Kg). Desta maneira estes resultados demonstram o envolvimento do sistema dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, adrenérgico e opioidérgico na atividade antinociceptiva do CMI. As atividades locomotoras não foram alteradas no teste do campo aberto após o tratamento com o CMI. A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o CMI possui ação antinociceptiva e anti-inflamatória, desta maneira sendo uma molécula promissora no desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas para a dor e a inflamação.

Palavras-chave: Dor, inflamação, selênio, indol, camundongos.

ABSTRACT

BIRMANN, Paloma Taborda. **Antinociceptive effect of 3-(4-chlorophenylselenyl)-1-methyl-1*H*-indole in mice.** 2017. 98f. Dissertation (master's degree in biochemistry and bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Pain and inflammation are conditions that affect countless people every day around the world. With this, the search for new compounds for the treatment of pain and inflammation, which have fewer adverse effects and improve the patients' quality of life continues to be of great interest to the research groups. Several studies have shown the promising properties of the organic compounds of selenium and of the heterocyclic compounds containing the indole nucleus in antinociceptive and anti-inflammatory activities. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory action of 3-(4-chlorophenylselenyl)-1-methyl-1*H*-indole (CMI) in swiss mice. The antinociceptive activity of the compound was evaluated in the nociception tests induced by chemical agents (formalin and glutamate) and thermal (hot plate). The anti-inflammatory potential was evaluated in formalin-induced paw edema and in ear edema induced by croton oil. In addition, we investigated the involvement of the serotonergic, noradrenergic, dopaminergic, adrenergic and opioidergic systems in the antinociceptive action of CMI through the glutamate-induced nociception test. The open field test was performed to verify that the compound does not lead to locomotor changes in the animals. Intragastric (i.g.) administration of CMI (0.01-10 mg / kg) was able to reduce glutamate and formalin-induced nociception in both phases, and the dose of 0.1 mg / kg was able to increase the time on the hot plate test. In addition, CMI was able to reduce formalin-induced paw edema (0.01 mg/kg) and croton oil-induced ear edema (0.1 mg/ kg). The pre-treatment of the mice with the SCH23390 (D₁ receptor antagonist, 0.05mg/kg, intraperitoneally [i.p.]), WAY100635 (5-HT_{1A} receptor antagonist, 0.7 mg/kg, i.p.), ondansetron (5-HT₃ receptor antagonist, 0.5mg/kg, i.p.), ketanserin (5-HT_{2A/2C} receptor antagonist, 0.3 mg/kg, i.p.), naloxone (non-selective antagonist 1 mg/kg, i.p.), caffeine (non-selective antagonist, 3 mg/kg, i.p.) and prazosin (α₁ receptor antagonist, 0.15 mg/kg, i.p) blocked the nociceptive action of CMI (0.01 mg / kg). In this way, these results demonstrate the involvement of the dopaminergic, noradrenergic, serotonergic, adrenergic and opioidergic system in the antinociceptive activity of the CMI. The locomotor activities were not altered in the open field test after treatment with the CMI. From the obtained results, it can be suggested that the CMI has antinociceptive and anti-inflammatory action, thus being a promising molecule in the development of future therapeutic strategies for pain and inflammation.

Key-words: Pain, inflammation, selenium, indole, mice.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1	Classificação das fibras aferentes primárias e suas principais características.....	24
Figura 2	Representação do processo nociceptivo em relação às três categorias de neurônios (Neurônios de primeira, segunda e terceira ordem)	24
Figura 3	Organização do corno dorsal da medula espinhal em lâminas e os locais de projeções das fibras aferentes primárias.....	25
Figura 4	Lesão tecidual provocando a ação de mediadores químicos	28
Figura 5	Representação da síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor excitatório glutamato nos neurônios glutamatérgicos	29
Figura 6	Representação da síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor inibitório ácido gama aminobutírico nos neurônios gabaérgico	30
Figura 7	Representação da produção de citocinas e suas principais funções quando ligadas a receptores específicos	32
Figura 8	Produção de metabólitos do ácido araquidônico	34
Figura 9	Diferentes isoformas da enzima cicloxigenase e algumas de suas funções.....	37
Figura 10	Estrutura química ebselen	40
Figura 11	Estrutura química do disseleneto de difenila.....	40
Figura 12	Estrutura química do 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-[PSQ])	41
Figura 13	Estrutura química do α -(fenilseleno)-acetofenona (PSAP)...	41
Figura 14	Estrutura química do indol e moléculas que contêm um indol em sua estrutura	43

Figura 15	Estrutura química do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1 <i>H</i> -indol	44
-----------	--	----

Manuscrito

Figura 1	Chemical structure of 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -indole (CMI)	73
Figura 2	Effect of CMI in nociception and in paw edema induced by formalin in mice. (A) neurogenic phase (0-5 min) (B) inflammatory phase (15-30 min) (C) paw edema induced by formalina	74
Figura 3	Effect of CMI in glutamate-induced nociception	76
Figura 4	Effect of CMI in hot-plate test	77
Figura 5	Effect of CMI in ear edema induced oil croton	78
Figura 6	Effect of pre-treatment of mice with (A) SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p. D ₁ receptor antagonist) and (B) sulpiride (5 mg/kg, i.p. a D ₂ and D ₃ receptor antagonista) on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test	79
Figura 7	Effect of pre-treatment of mice with (A) WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p. a 5-HT _{1A} receptor antagonist), (B) ondansetron (0.5 mg/kg, i.p. a 5-HT ₃ receptor antagonista) and (C) ketaserin (0.03 mg/kg, i.p. a 5-HT _{2A/2C} receptor antagonista) on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test	80
Figura 8	Effect of pre-treatment of mice with naloxone (non-selective antagonist at opioid receptors, 1 mg/kg, i.p) on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test	81
Figura 9	Effect of pre-treatment of mice with caffeine (non-selective antagonist at adenosinergic receptors, 3 mg/kg, i.p) on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test	82
Figura 10	Effect of pre-treatment of mice with (A) prazosin (antagonist α_1 receptor, 0.15 mg/kg, i.p. a) and (B) yojmbine (antagonist α_2 receptor, 1 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive	

effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test	83
---	----

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1	Effect of CMI on open-field test in mice	84
Tabela 2	Effect of administration of CMI and antagonists on behavioural parameters in the open field test in mice	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-(PSQ)	4-fenilselenil-7-cloroquinolina
5-HT	Serotonina
μL	Microlitros
AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CMI	3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1 <i>H</i> -indol
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
COX-3	Cicloxigenase-3
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GRD	Gânglio da raiz dorsal
IASP	Associação internacional para estudo de dor
i.g.	Intragátrica
iGLURS	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
Kg	Quilogramas
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LTs	Leucotrienos
Lxs	Lipoxinas
Mg	Miligramas

MORF	Morfina
mGLURS	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MLX	Meloxicam
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PGs	Prostaglandinas
PSAP	α-(fenilselena) acetofenona
PTs	Prostaciclina
RVM	Medula rostroventromedial
SelP	Selenoproteína P
SelW	Selenoproteína W
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
TNF	Fatores de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRx	Tiorredoxina redutase
Txs	Tromboxanos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	DOR E NOCICEPÇÃO	21
3.2	TRANSMISSÃO DA DOR	22
3.3	MODULAÇÃO	26
3.4	MEDIADORES QUÍMICOS	27
3.4.1	NEUROTRANSMISSORES	28
3.4.2	CITOCINAS	31
3.4.3	AMINAS VASOATIVAS	33
3.4.4	METABÓLITOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	34
3.5	DOR INFLAMATÓRIA	35
3.6	FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOR E INFLAMAÇÃO	36
3.6.1	ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS	36
3.6.2	OPIOIDES	37
3.7	SÊLENIO	38
3.8	COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO COM ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.	39
3.9	INDOL	42
4.	MANUSCRITO	45
5.	CONCLUSÃO	86

6.	PERSPECTIVAS	87
7.	REFERÊNCIAS	88
	ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

A dor é caracterizada por desencadear um sentimento desagradável, constituindo um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo. Por envolver diferentes componentes como o sensorial (receptores específicos) e o afetivo-emocional (provocando reação emocional), a dor é considerada um fenômeno multifatorial (BILEVICIUS; KOLESAR; KORNELSEN, 2016).

O componente sensorial da dor é denominado de nocicepção, o qual está relacionado apenas à parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos e emocionais (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Dessa forma, a nocicepção é o processo pelo qual os estímulos nocivos, sejam eles térmicos, mecânicos ou químicos, chegam ao sistema nervoso central (SNC), como um resultado da ativação dos receptores sensoriais especializados, denominados nociceptores (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Estes se encontram dispostos em todo o corpo humano, desde a superfície (pele) até os tecidos mais profundos como, órgãos, músculos, ossos e tendões, e são responsáveis pela transmissão da dor para o SNC (FABBRO e CRESCENTINI, 2014).

A transmissão da dor ocorre através dos nociceptores das fibras aferentes primárias, mais especificamente as fibras A δ e as fibras C, que ao receberem um estímulo nocivo, são ativados e logo convertidos em impulsos elétricos. Esses impulsos são transmitidos por meio destas fibras (via ascendente), até o corno dorsal da medula espinhal (CDME). No momento em que ocorrer a integração dos impulsos elétricos no CDME, as vias nociceptivas ascendentes vão levar a informação de dor até o SNC (ALMEIDA et al, 2004; GARLAND, 2012).

Após o processamento da dor no SNC, ocorre à resposta destes estímulos dolorosos através da via descendente. Esta via modula a resposta nociceptiva através dos receptores presentes nos neurônios do CDME e das fibras primárias eferentes, além de interneurônios excitatórios e inibitórios. Além disso, há o envolvimento de diferentes sistemas de neurotransmissores e mediadores químicos que desempenham um importante papel na transmissão do sinal nociceptivo do sistema nervoso periférico (SNP) para o SNC (BRIDGESTOCK e RAE, 2013).

A dor pode ser desencadeada por diversos mecanismos distintos, podendo ser distinguida em diferentes tipos, tais como, dor nociceptiva e dor inflamatória (VASILEIOU et al., 2009). A resposta inflamatória tanto no SNC quanto no SNP,

desempenha um importante papel no desenvolvimento e na persistência de inúmeros estados patológicos de dor (WATKINS et al., 2003).

A dor inflamatória é caracterizada pelo surgimento de inchaço, vermelhidão e edema no local da lesão, fatores que são desencadeados pela ocorrência da liberação de mediadores inflamatórios e migração de células imunes (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A dor inflamatória é, portanto, um processo clínico presente em inúmeras doenças que atualmente ainda não estão recebendo um tratamento eficaz (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

As principais classes para o tratamento de dor e inflamação existentes atualmente no mercado são os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e opioides (YAKSH et al., 2015). Entretanto, essas duas classes de fármacos possuem muitos efeitos adversos, podendo vir a prejudicar o bem-estar do indivíduo, o que torna de grande interesse a busca por novos fármacos que possuem menos efeitos adversos (YAKSH et al., 2015).

Com isso, os compostos orgânicos de selênio (Se) vêm se tornando um alvo atrativo para a busca de novos fármacos. Uma vez que o Se é um micronutriente essencial para a manutenção do estado fisiológico em humanos, pois se sabe que o Se está envolvido com diversas patologias, como por exemplo, depressão, problemas musculares, alterações digestivas, doenças, cardiovasculares, alterações reumáticas, esclerose, câncer, diabetes, entre outras doenças (ROMAN et al., 2014, NOGUEIRA et al., 2004).

Sabendo da importância biológica do Se, diversos grupos de pesquisa têm desenvolvido compostos orgânicos contendo Se em sua estrutura química na tentativa de contribuir com o tratamento destas diversas patologias. Como esperado, tais estudos relatam propriedades farmacológicas promissoras, como capacidade antidepressiva (BROD et al., 2016), antioxidante (PADILHA et al., 2017), anticonvulsivante (WILHELM et al., 2014), antinociceptiva (SOUSA et al., 2017) e anti-inflamatória (PINZ et al., 2016), dentre outras, de diferentes compostos orgânicos de Se.

Além dos compostos orgânicos de Se, outra classe de moléculas com propriedades biológicas interessantes são os indóis, os quais são estruturas heterocíclicas abundantes na natureza com ação farmacológica. Portanto as moléculas contendo o núcleo indólico vêm sendo estudadas em diversas desordens neurodegenerativas e inflamatórias, além de apresentarem ação antinociceptiva,

antioxidante, antitumoral entre outras. (GUERRA et al., 2011; KARAASLAN et al, 2013; KLEIN et al., 2011; LÓPEZ-INGLESÍAS et al, 2014; SHAVETA et al., 2014).

Sendo assim, sabendo-se das propriedades promissoras tanto do Se quanto dos indóis, torna-se uma estratégia relevante à síntese de compostos contendo essa combinação em suas estruturas para o desenvolvimento de novos compostos com atividade farmacológicas mais eficientes. Com isso, o presente estudo avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol (CMI). A atividade antinociceptiva foi avaliada através de ensaios de indução químicas e térmicas de nocicepção e a atividade anti-inflamatória através dos testes edematogênicos induzidos por óleo de cróton e formalina em camundongos. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do composto.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a possível ação antinociceptiva e anti-inflamatória do CMI em camundongos, bem como investigar os mecanismos envolvidos nesta ação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do CMI na nocicepção induzido por agentes químicos;
- Verificar o efeito do CMI na nocicepção induzido por agente térmico;
- Verificar o efeito do CMI nos testes edematogênicos induzido por agentes químicos;
- Verificar o possível envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, adrenérgico e opioidérgico na ação antinociceptiva do CMI através do ensaio de nocicepção induzida por glutamato;
- Analisar o efeito do CMI sobre as atividades locomotora e exploratória;
- Analisar se os antagonistas e a interação antagonista x CMI causa alterações na atividade locomotora dos camundongos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DOR E NOCICEPÇÃO

Dentre os diversos sistemas de “vigilância” da homeostase do organismo, a dor tem um papel fundamental, pois serve como um alerta de que a integridade e o bem-estar do corpo estão em ameaça e, clinicamente, é um sintoma importante para permitir a avaliação do surgimento de diversas doenças (BILEVICIUS; KOLESAR; KORNELSEN, 2016). Apesar de seu caráter “benéfico”, em alguns casos a dor pode afetar a qualidade de vida do paciente, tendo como consequências sofrimento e estresse (BRENNAN, 2007). Desta maneira, foi definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*, IASP) que a dor é “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável, associada ou não ao dano potencial dos tecidos” (LOESER e TREEDE, 2008).

A dor abrange dois componentes principais: a percepção e a nocicepção. A percepção é uma função interativa que envolve fatores ambientais, culturais, espirituais e psicológicas, sendo modulada pela emoção, e a sua interpretação será desenvolvida por associações positivas ou negativas de cada experiência individual. Já a nocicepção se refere somente à percepção sensorial do SNC, evocada por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos, os quais são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamados nociceptores (VERRI et al, 2006; SENKOWSKI; HÖFLE; ENGEL, 2014).

Os nociceptores são heterogênicos, diferem-se quanto aos tipos de neurotransmissores que possuem, receptores e canais iônicos que expressam, velocidade de condução, propriedades de respostas aos estímulos nocivos e a capacidade de serem sensibilizados durante lesões, patologias e inflamação (STUCKY, GOLD, ZHANG, 2001). Há basicamente quatro classes de nociceptores: mecânicos, térmicos e polimodais. Os nociceptores mecânicos respondem a pressão intensa, os térmicos respondem às temperaturas extremas ($>45^{\circ}\text{C}$ e $<5^{\circ}\text{C}$) e os nociceptores polimodais respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Desta maneira, a sensação dolorosa pode ser classificada de três maneiras: transitória, aguda e crônica, conforme o tipo de nociceptores sensibilizados e tempo de duração. A dor transitória e a dor aguda são provocadas pela ativação de

nociceptores tendo um curto período de duração, porém a única diferença entre as duas é que a transitória não é acompanhada de lesão, tendo como principal função proteger o indivíduo. A dor crônica é causada por lesões ou doenças que superam a capacidade de recuperação do organismo estendendo-se de semanas a meses, perdendo o caráter protetor e vindo a comprometer a qualidade de vida do paciente (LOESER e MELZACK, 1999; LOESER, 2003).

3.2. TRANSMISSÃO DA DOR

A nocicepção consiste basicamente em quatro processos onde os estímulos nocivos são compreendidos e respondidos pelo SNC: a transdução, transmissão, percepção e modulação. A transdução é quando os estímulos nocivos são convertidos em potenciais de ação pelos nociceptores. A transmissão refere-se à transferência da informação nociceptiva através da medula espinhal ao tronco cerebral e ao tálamo. A percepção ocorre quando há integração do sinal pelo córtex cerebral e a modulação é o mecanismo pelo qual a transmissão sináptica dos sinais dolorosos é reduzida ou amplificada e, por fim desencadeando uma resposta dolorosa (BRIDGESTOCK e RAE, 2013; MERTENS et al., 2015).

Sobre a transmissão da dor, as fibras aferentes primárias detectam os estímulos nociceptivos, sejam eles mecânicos (impactos mecânicos e pressão), térmicos (frio ou calor) ou químicos (formalina, bradicinina, glutamato, etc.), e os transmitem ao sistema nervoso na forma de corrente elétrica. Para que ocorra este processo os terminais nociceptivos expressam uma variedade de receptores e canais iônicos, que uma vez ativados iniciam a transmissão do impulso nervoso. (AKOPIAN, 2011).

Dentre os diversos tipos de transdutores do sinal nocivo, podem-se destacar moléculas sinalizadoras específicas como os receptores de potencial transitórios (TRP), os quais são responsáveis por reconhecer os estímulos nocivos e os converter em impulsos elétricos. Tais impulsos são transmitidos por meio de fibras aferentes primárias, das terminações axonais dos neurônios sensoriais, até diferentes partes do nosso corpo, tais como medula espinhal e ao tronco cerebral (JULIUS E BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias, responsáveis pela condução do sinal nocivo ou não nocivos da periferia ao SNC podem ser classificadas de acordo com seus diâmetros, estruturas e velocidade de transdução. As fibras que respondem a

estímulos de luz, toque, vibrações, dentre outros estímulos que não geram, em situações normais, danos ao corpo são as fibras A α e A β , geralmente são unimodais e responde estímulos de alta e baixa intensidade. Estas fibras são caracterizadas por serem mielinizadas, com maior diâmetro (A α : 13-20 μ m e A β : 6-12 μ m), e com alta velocidade de condução (30-70 m/s). No entanto, a ativação de tais fibras está relacionada também, com o alívio da dor. Esta sensação de alívio ocorre por meio da fricção do local lesionado (MILLAN, 1999).

Em relação às fibras nociceptivas, as fibras A δ conhecidas como mecanotermo, também são mielinizadas e permitem uma rápida transmissão de estímulos (1,2 a 30 m/s) que perdura por um curto período. Estão envolvidas na dor aguda e podem responder tanto a estímulos térmicos como mecânicos. Em contraste, as fibras C, não são mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (0,5 a 2 m/s) por um período mais longo. São conhecidas como polimodais, pois elas respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos e são responsáveis pela dor crônica (Figura 1) (JULIUS e BASBAUM, 2001; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). As fibras A δ geram sensações de picadas, pontiagudas, dor aguda e bem localizada, enquanto as fibras C geram sensações de dor em queimação, mal localizada, difusa e contínua (RAJA et al., 2006).

Estas fibras aferentes primárias, mais especificamente as fibras A δ e C, as quais são consideradas nociceptivas, possuem seus centros metabólicos presentes no gânglio da raiz dorsal (GDR). Os prolongamentos axônicos saem a partir do GDR se dirigindo tanto para os tecidos periféricos, quanto para a medula espinhal ou para o tronco encefálico. Desta maneira a informação sensorial gerada após estímulos periféricos irá passar pelo GDR e irá alcançar a medula espinhal pelo seu lado dorsal, comunicando-se com o neurônio de segunda ordem em regiões específicas do CDME. Estes neurônios de segunda ordem projetam seus sinais até áreas subcorticais e corticais, onde a dor irá ser percebida (Figura 2) (MILLAN, 1999; LAMONT, 2000).

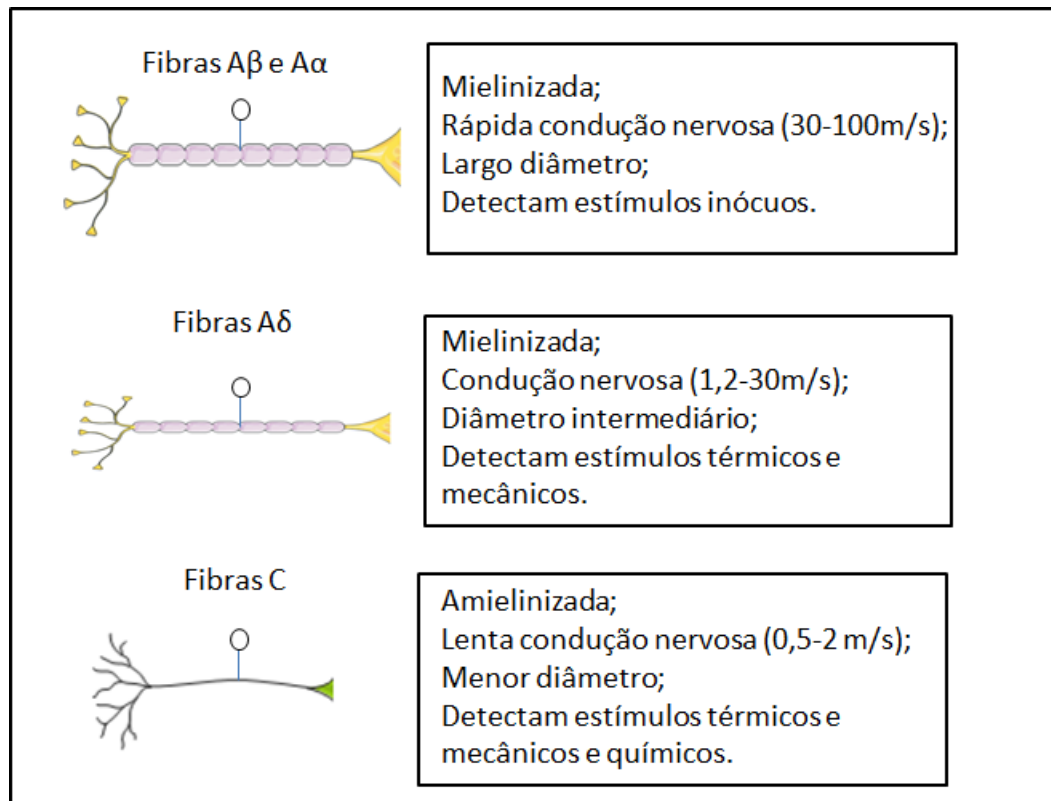


Figura 1. Classificação das fibras aferentes primárias e suas principais características.

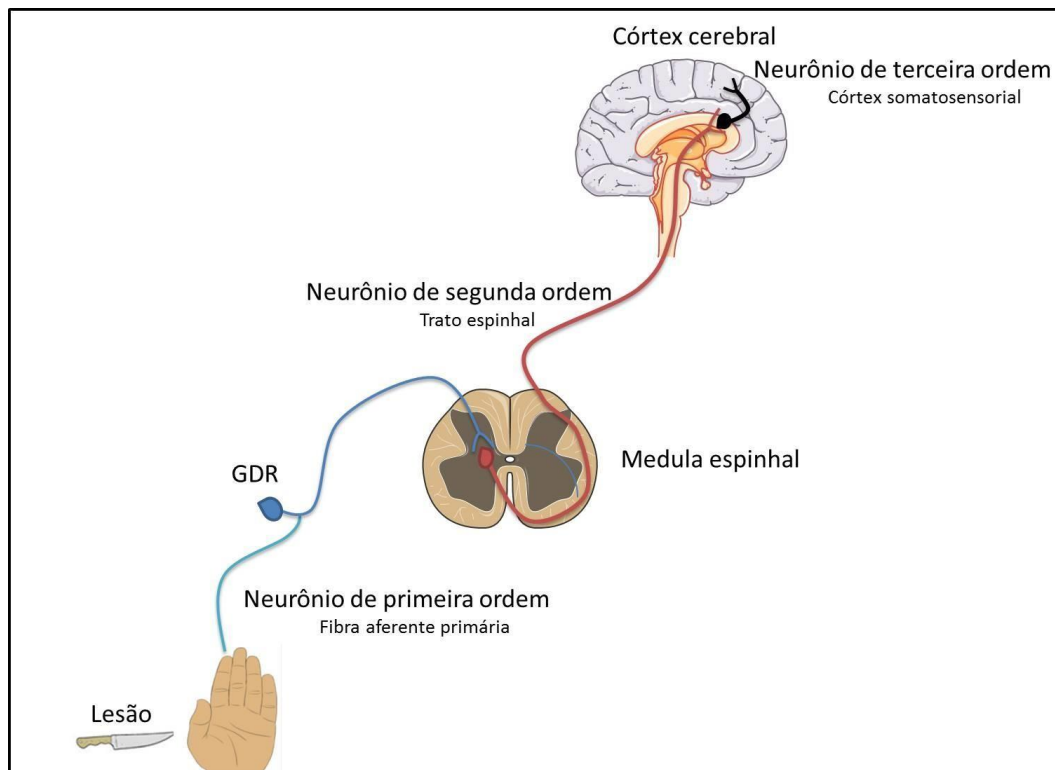


Figura 2. Representação do processo nociceptivo em relação às três categorias de neurônios (Neurônios de primeira, segunda e terceira ordem). Abreviação: GDR: Gânglio da raiz dorsal. (Adaptado de LAMONT et al., 2000).

O CDME é uma estrutura dividida em lâminas, nas quais cada lâmina é diferente anatomicamente e funcionalmente, sendo cada uma responsável por receber as diferentes fibras que trazem a informação nociceptiva. Os neurônios presentes nas lâminas I (zona marginal) e II (substância gelatinosa) respondem aos estímulos nocivos (fibras A δ e C), a parte mais interna da lâmina II é caracterizada pela presença de neurônios inibitórios e excitatórios, os quais possuem funções moduladoras na transmissão da informação nociceptiva. Os neurônios presentes nas lâminas III e IV (núcleo próprio) respondem aos estímulos inócuos (fibras A α e A β). E os neurônios localizados na lâmina V (camada profunda) recebem tanto estímulos inócuos quanto estímulos nocivos (Figura 3) (BASBAUM, 2009; BRIDGESTOCK e RAE, 2013).

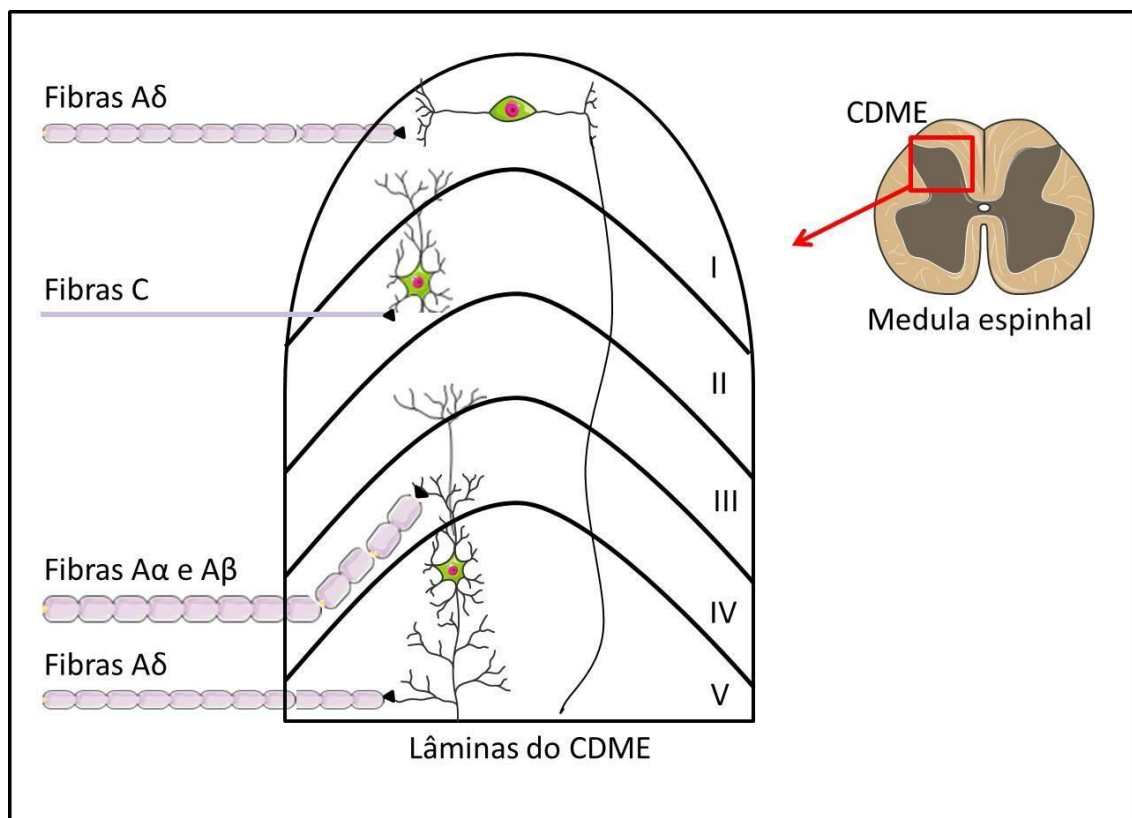


Figura 3. Organização do corno dorsal da medula espinhal em lâminas e os locais de projeções das fibras aferentes primárias. Abreviações: CDME: Corno dorsal da medula espinhal.

Portanto, o CMDE atua como um centro de controle da transmissão nociceptiva. Nesta região ocorre a comunicação entre neurônios primários e os neurônios secundários, por sua vez os neurônios primários liberam diferentes neurotransmissores como o glutamato, substância P, transmitindo o sinal nocivo aos neurônios secundários, que então formam vias ascendentes que transmitem a

informação ao tálamo e ao córtex cerebral, ocorrendo à percepção do local e a interpretação da dor (MILLAN, 2002). Esse evento de comunicação entre os componentes neuronais e consequentemente de transmissão do sinal nocivo é essencial para o processamento da informação nociceptiva pelo organismo, o qual irá gerar uma resposta apropriada e organizada à dor por meio de vias modulatórias descendentes (DREWES, 2006).

3.3. MODULAÇÃO DA DOR

Pelo fato da dor ser importante para a sobrevivência, torna-se indispensável sua modulação a partir do SNC para o SNP. Durante muitos anos pesquisadores estudaram sobre as influências modulatórias da dor, e somente em 1965, Melzack e Wall propuseram a existência de um sistema modulatório específico para a dor, a teoria de controle do “portão” da dor. De acordo com essa teoria, os interneurônios da lâmina II do CDME funcionariam como um “portão”, inibindo ou facilitando o fluxo dos neurônios aferentes promovendo a modulação do processo nociceptivo (MELZACK e WALL, 1965; PERL, 2011).

Os mecanismos de modulação descendentes permitem que as estruturas cerebrais (córtex cerebral, tálamo, hipotálamo) sinalizem para o CDME através da medula rostroventromedial (RVM) no bulbo raquidiano modular a resposta nociceptiva. Essa modulação ocorre pelos receptores presentes nos neurônios do CDME e das fibras aferentes primárias, além de interneurônios excitatórios e inibitórios (PORRECA et al., 2002). Também existem alguns núcleos supra espinhais envolvidos na modulação descendente, sendo os mais conhecidos a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o *lócus coeruleus* (LC) e o núcleo magno da rafe (BALIKI e APKARIAN, 2015).

A modulação pode ocorrer das seguintes maneiras: I) A PAG recebe entrada de diversas áreas do SNC (como do córtex cerebral, tálamo e hipotálamo) sendo, portanto, o principal local modulatório descendente da dor. Essa região contém altas concentrações de opioides e endocanabinóides que induzem efeitos analgésicos. II) O LC e a RVM são as principais fontes de noradrenalina e serotonina, respectivamente. Essas fibras descendentes projetam-se para o CDME e realizam sinapses com os neurônios aferentes primários, neurônios secundários e os interneurônios. Assim, a liberação desses neurotransmissores pode exercer ações

inibitórias ou excitatórias conforme o subtipo de receptores em que atuam (GARLAND, 2012; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

As vias modulatórias da dor controlam, portanto, a liberação de neurotransmissores dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias no CDME. A ativação das vias descendentes inibitórias bloqueia direta e indiretamente os neurônios de projeção no CDME. Diretamente, através de seus neurônios eferentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos e indiretamente através da excitação dos interneurônios inibitórios os quais contêm os neurotransmissores, ácido gama aminobutírico (GABA) e glicina, resultando na inibição da transmissão nociceptiva. O efeito contrário ocorre por meio da inibição descendente dos interneurônios inibitórios facilitando assim a transmissão nociceptiva. Além desses, os interneurônios opioidérgicos também são ativados pelas vias descendentes modulatórias e inibem tanto as fibras aferentes primárias quanto os interneurônios excitatórios (MILLAN 2002; WESTLUND, 2006).

Dessa maneira, pode-se levar em consideração que o processo modulatório da dor envolve além de diversas estruturas cerebrais, também envolve diferentes classes de mediadores químicos (MILLAN, 2002).

3.4 MEDIADORES QUÍMICOS

Toda substância produzida pelas fibras nervosas que atua como intermediárias nas transmissões de impulsos nervosos até os receptores por meios das sinapses químicas são classificadas como mediadores químicos (CALIXTO et al., 2000). Existem diferentes classes de mediadores químicos, como por exemplo, os neurotransmissores excitatórios e inibitórios (glutamato e GABA, respectivamente), quimiocinas (interleucinas), aminas vasoativas (histamina e serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas), dentre outros (MCHUGH, 2000). Portanto os mediadores químicos que são responsáveis pela ativação e sensibilização dos nociceptores e conseqüentemente a sinalização e modulação do sinal nocivo (Figura 4).

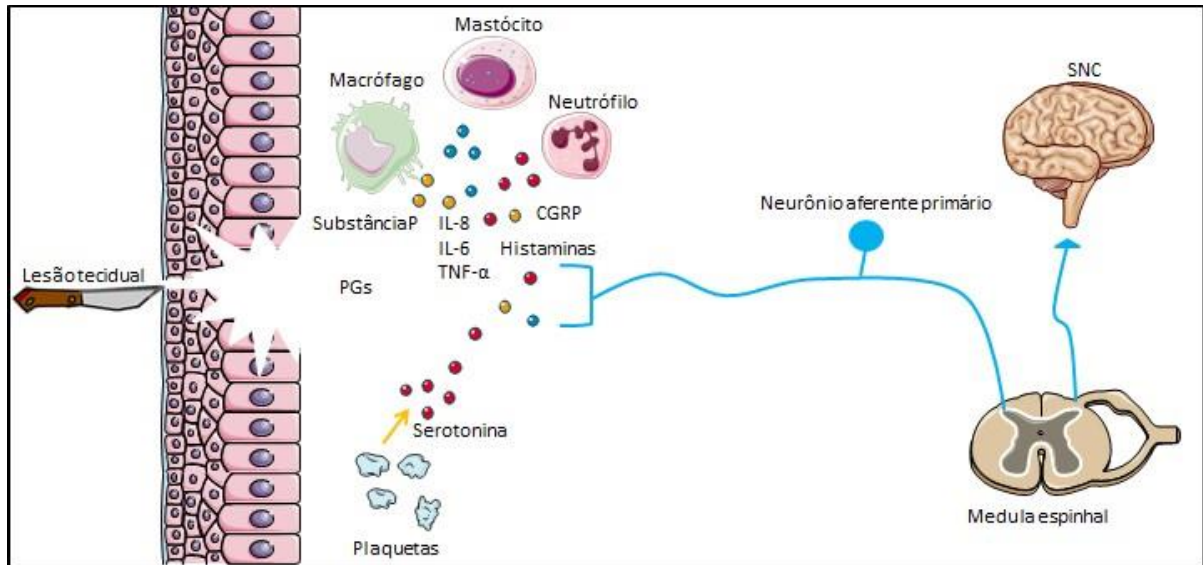


Figura 4. Lesão tecidual provocando a ação de mediadores químicos. Abreviações: IL-6: Interleucina 6, IL-8: Interleucina 8, PGs: Prostaglandinas e TNF- α : Fator de necrose tumoral- α .

3.4.1. NEUROTRANSMISSORES

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório sintetizado a partir do α -cetoglutarato e liberado pelas fibras aferentes primárias. Quando liberado para fenda sináptica, se liga aos seus receptores presentes nas membranas dos neurônios pré e pós-sinápticos, e também na membrana de células gliais, assim podendo desencadear a sua ação excitatória (Figura 5) (MAO et al., 1992; COGGESHALL e CARLTON, 1997; MILLAN, 1999). Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados em duas classes distintas, os receptores glutamatérgicos “ionotrópicos” (iGluRs) e os receptores glutamatérgicos “metabotrópicos” (mGluRs). Os iGluRs são acoplados a canais iônicos, os quais são ainda subdivididos em três tipos conforme ativação por ligantes, são eles: N-metil-Daspartato (NMDA) que medeiam a transmissão excitatória lenta e são permeáveis principalmente aos íons de cálcio (Ca^{2+}) e com menor condutância aos íons de sódio (Na^+), α -amino-3- hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) medeiam a neurotransmissão excitatória rápida e são canais com grande permeabilidade aos íons Na^+ e os íons de potássio (K^+) e com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} e o cainato, relativamente permeáveis aos íons Ca^{2+} (OZAWA et al., 1998). Já os mGluRs estão acoplados a proteínas G, promovendo a modulação da dor, que por sua vez podem ativar e/ou inibir transdução de sinal nocivo (FUNDYTUS, 2001).

Tem-se bem estabelecido na literatura que os receptores glutamatérgicos estão diretamente envolvidos na transmissão nociceptiva, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta nociceptiva. Isso torna as substâncias que são capazes de bloquear estes receptores de grande interesse para a área da farmacologia, os quais podem vir se tornar um fármaco, com efeito, antinociceptivo (NEUGEBAUER, 2002; WIECH et al., 2004).

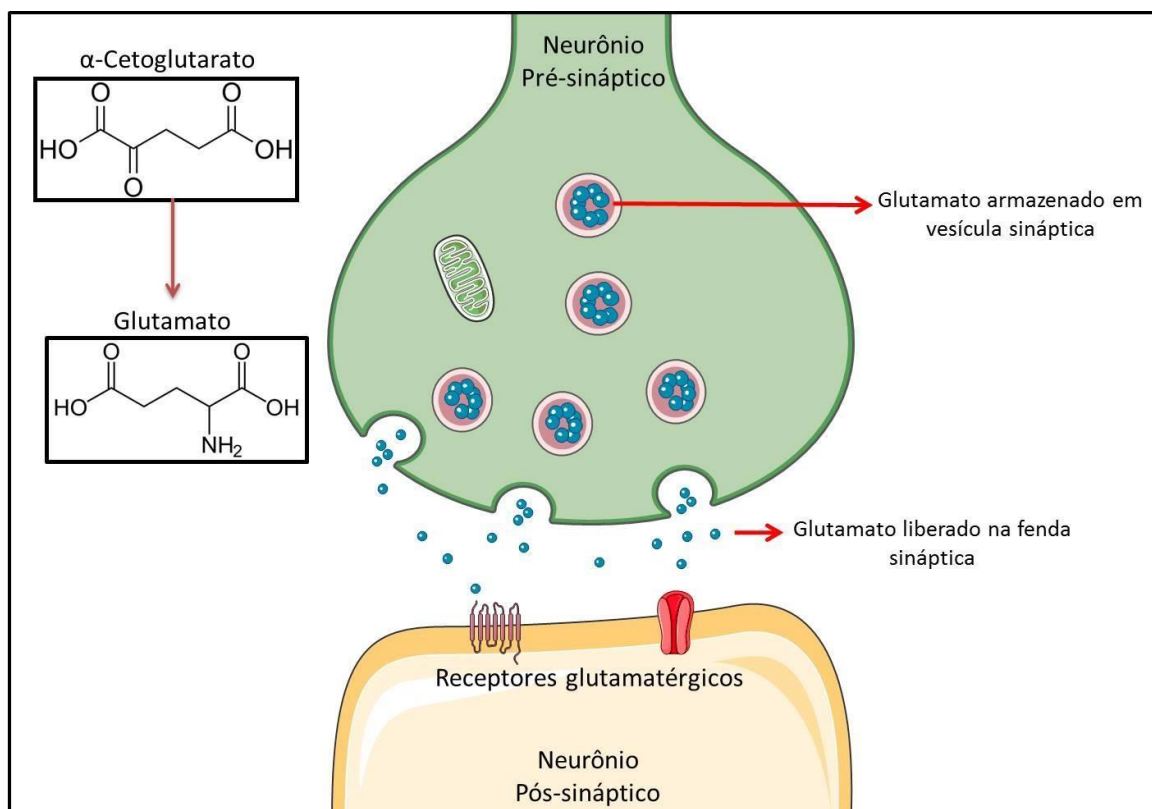


Figura 5. Representação da síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor excitatório glutamato nos neurônios glutamatérgicos.

Outro neurotransmissor envolvido com a transmissão da nocicepção é o GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Ele é sintetizado nos neurônios gabaérgicos a partir do glutamato, por um processo de descarboxilação mediado pela enzima glutamato descarboxilase. Assim como o glutamato, o GABA possui dois tipos de receptores. Os ionotrópicos GABA_A e GABA_C, consistem em proteínas de membrana de múltiplas subunidades que se ligam ao GABA e que abrem um canal iônico de cloreto intrínseco (Cl⁻), e os metabotrópicos GABA_B são acoplados a proteína G que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros, ambos estão amplamente distribuídos no CMDE. Este

neurotransmissor age de maneira a inibir a transmissão do estímulo nociceptivo através da ligação aos seus receptores (Figura 6) (MILLAN, 2002).

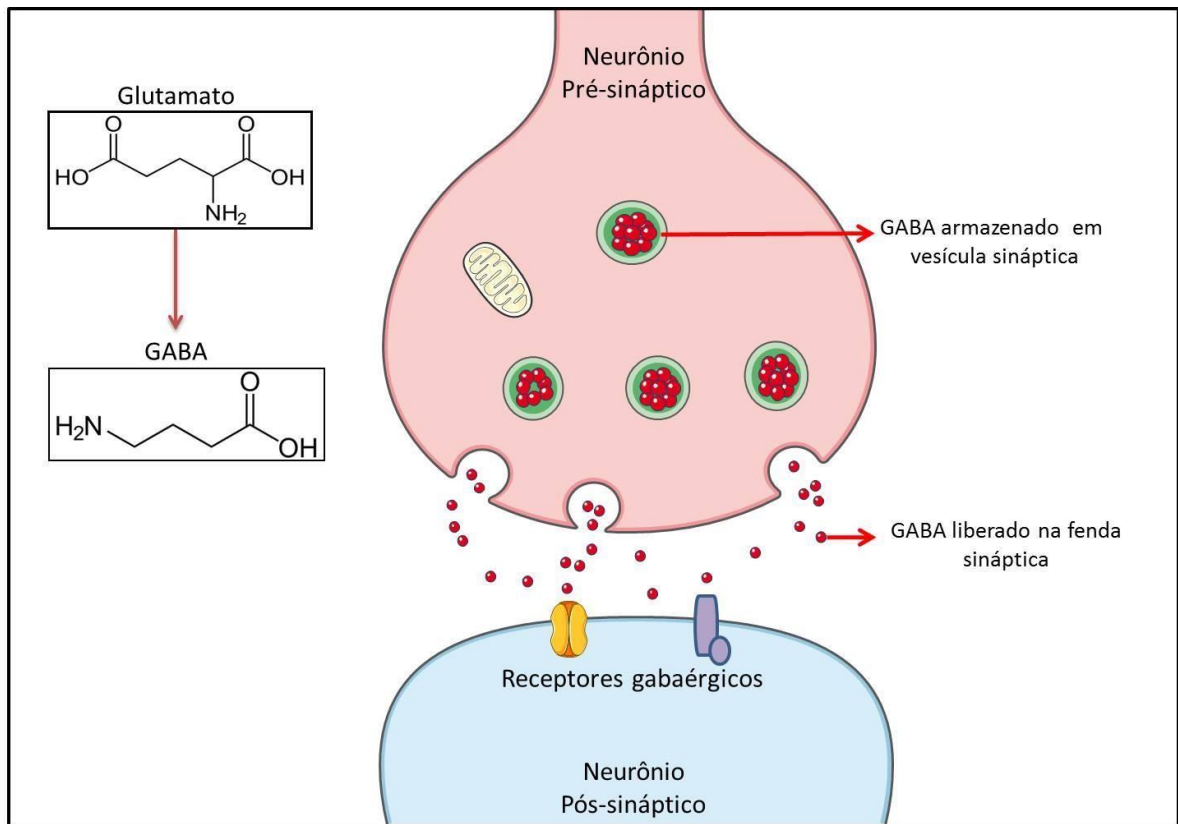


Figura 6. Representação da síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor inibitório ácido gama aminobutírico nos neurônios gabaérgico. Abreviações: GABA: Ácido gama aminobutírico.

Os neuropeptídeos são outra classe de neurotransmissores liberados após a estimulação dos nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias. Estes, por sua vez, podem atuar sobre as próprias células nervosas, regiões medulares específicas ou sobre os tecidos adjacentes. São os principais exemplos dessa classe a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (JULIUS e BASBAUM, 2001).

A SP é sintetizada pelos neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal e liberado pelas fibras C em resposta à lesão ou estimulação intensa (JULIUS e BASBAUM, 2001). É encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinhal, atuando como um mediador da primeira sinapse da transmissão dolorosa, ela está envolvida com a nocicepção tanto a nível periférico quanto central. A sua ação ocorre através da ativação dos receptores periféricos (NK₁ e NK₂) o que

acarreta ao surgimento do comportamento de nocicepção (GOUDET et al., 2008; ZHANG et al., 2009).

Quando ocorre alguma lesão tecidual, a mesma desencadeia a síntese de SP, que irá produzir no tecido periférico algumas ações vasculares pró-inflamatórias, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, atração de células do sistema imune para o local da lesão e degranulação dos mastócitos com liberação de diversos neuromediadores. Desta forma, a SP contribui para a expansão do processo inflamatório, aumentando do campo receptivo para fibras nervosas adjacentes à área lesionada, contribuindo para o processo de nocicepção (FERREIRA 1995; JANG et al., 2014).

Assim como a SP, o CGPR é sintetizado e liberado pelas fibras aferentes primárias, possuindo ações modulatórias na transmissão da nocicepção a nível central e periférico. A ativação dos seus receptores CGPR₁ e CGPR₂ desencadeia uma série de eventos intracelulares, como a fosforilação dos receptores de glutamato do tipo AMPA e isso irá acarretar no aumento da excitação neuronal, contribuindo para o estabelecimento da nocicepção. Também é responsável por retardar o metabolismo da SP e aumentar a liberação de SP e de glutamato nas terminações das fibras aferentes primárias (OLIVEIRA, 2010). PerifERICAMENTE atua como um potente vasodilatador, contribuindo para o processo inflamatório (RANG, 2007).

3.4.2. CITOCINAS

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas sintetizadas por diversos tipos de células como os macrófagos, monócitos e, principalmente pelos linfócitos através da ativação de proteínquinases ativadas por mitógenos e do fator de transcrição nuclear NF kappa B (NF-κB), por exemplo. Elas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta nociceptiva e inflamatória (Figura 7) (CONTRAN et al, 2006; RANG et al, 2007).

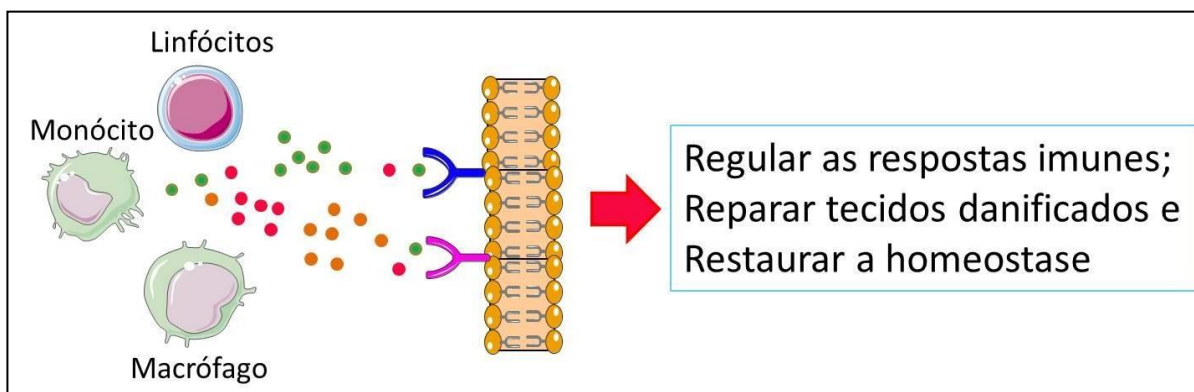


Figura 7. Representação da produção de citocinas e suas principais funções quando ligadas a receptores específicos.

As quimiocinas são consideradas citocinas de um grupo particular, com propriedades químicas e funcionais específicas e importantes que promovem a quimiotaxia leucocitária, evento que dirige as células leucocitárias para o local da lesão. As interleucinas (IL) e os fatores de necrose tumoral (TNF) são as superfamílias que compreendem as citocinas (RANG et al, 2007).

Existem mais de 30 tipos de IL, suas nomenclaturas são numeradas de acordo com a ordem cronológica de seus descobrimentos. As principais IL e outras citocinas envolvidas com o desenvolvimento da dor e da inflamação são as interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (VERRI et al., 2006).

A IL-1 β e o TNF- α , foram os primeiros a serem descritos. Ambos são produzidos pelos macrófagos ativados e participam das reações pró-inflamatórias agudas e crônicas e nos processos de reparo tecidual (RANG et al., 2007). A IL-1 β é capaz de estimular o recrutamento de leucócitos e a liberação de proteínas de fase aguda além de promover o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Além de estimular a expressão da enzima cicloxigenase 2 (COX-2), que por consequência estimula a formação e liberação de prostaglandinas (PGs) (COMMINS et al., 2010). O TNF- α , após a lesão tecidual, interagem com as células alvos através da ligação com seus receptores TNFR₁ (receptor TNF, tipo 1), estimulando a migração de neutrófilos para o local da injúria, e com os receptores TNFR₂ (receptor TNF, tipo 2), que influencia a apoptose celular e a necrose (VERRI et al, 2006; COMMINS et al, 2010).

A IL-6 é produzida pelos linfócitos e macrófagos. É uma citocina com várias células alvos, sendo capaz de estimular o fígado na produção de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR), estando envolvida principalmente na

regulação das respostas inflamatória e imune (DE JONGH et al, 2003; COMMINS et al, 2010). Outra IL importante na resposta de estímulos inflamatórios e na lesão tecidual é a IL-8, que também é secretada pelos linfócitos e macrófagos, assim que liberadas é capaz de atrair células imunes para o foco infeccioso (CUI et al, 2012).

3.4.3. AMINAS VASOATIVAS

As aminas são compostos básicos nitrogenados, geralmente de baixo peso molecular, e sua formação é essencialmente resultado da descarboxilação enzimática de aminoácidos livres e da transaminação de aldeídos e cetonas (LINARES et al, 2011). Elas estão presentes nas células e nos tecidos como compostos essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo. Elas podem desempenhar diferentes funções fisiológicas dos seres humanos e animais, entretanto também possuem diversos efeitos tóxicos. Com base no modo de ação, as aminas podem ser classificadas como aminas vasoativas ou psicoativas. (CARDOSO et al, 2014).

As aminas vasoativas são liberadas imediatamente após a lesão tecidual, tendo ação direta ou indiretamente sobre o sistema vascular. As principais aminas vasodilatadoras são as histaminas e a serotonina (5-HT) (RANG et al, 2007).

A histamina é considerada o principal mediador na fase imediata após um estímulo, como lesão tecidual, reações imunes e na presença de citocinas. Ela é sintetizada principalmente pelos mastócitos e quando liberadas promove o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, e consequentemente facilitando a passagem de leucócitos para o sítio da lesão. Além de participar no mecanismo de formação de edema (COTRAN et al, 2006; RANG et al, 2007).

A 5-HT é o segundo mediador vasoativo, encontradas nas plaquetas e no SNC. Assim como a histamina, a 5-HT possui ação vasodilatadora e de aumento da permeabilidade celular. Sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo (COTRAN et al, 2006; RANG et al, 2007).

3.4.4. METABÓLITOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Os metabólitos do ácido araquidônico, também chamados de eicosanoides, são formados a partir do ácido araquidônico (AA) quando as células são danificadas. O AA é um ácido graxo de cadeia longa e está presente de forma esterificada nas membranas celulares. Após algum estímulo físico ou químico o AA é liberado dos fosfolípidios de membranas através da enzima fosfolipase A₂, podendo ser substrato para duas vias enzimáticas, a via da ciclooxigenases, dando a origem as PGs, prostaciclina (PTs) e aos tromboxanos (TXs), ou ainda pela via das lipoxigenases, levando a síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs) (Figura 8) (ISHII et al, 1994; YAMAMOTO et al, 2000; YEDGAR, 2007).

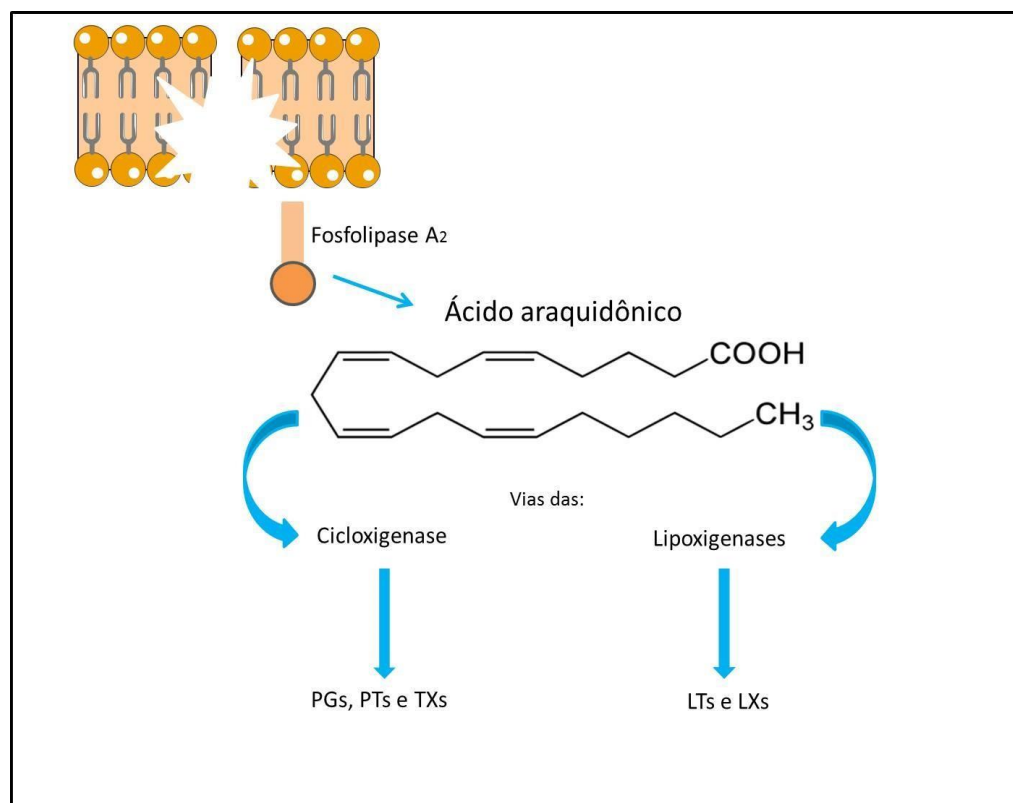


Figura 8. Produção de metabólitos do ácido araquidônico. Abreviações: LTs: Leucotrienos, LXs: Lipoxinas, PGs: Prostaglandinas, PTs: Prostaciclina e TXs: Tromboxanos.

Portanto na via das ciclooxigenases, a partir da enzima ciclooxigenase (COX) as PGs são produzidas. A síntese das PGs inicia-se com as enzimas COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, o PGG ou prostaglandina PG₂. No outro lado da membrana, as enzimas COX atuam como peroxidases, reduzindo a PG₂ a PGH₂. Por sua vez,

estas PGs primárias dão origem as PGs biologicamente ativas (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGI_2), as quais desempenham um importante papel na inflamação e na dor (ZEILHOFER, 2007). Desta forma, as PGs poderão estar sendo produzidas a partir do AA em praticamente todos os tecidos do organismo, sempre que necessário.

Os TXs também estão presentes no processo inflamatório, porém sua função de mediador inflamatório ainda não está bem esclarecida. Porém sabe-se que os TXs são responsáveis pela vasoconstrição e pela agregação plaquetária e formação dos trombos (WILES, 1991). A síntese de Txs e de PTs deve ser de maneira equilibrada (BOTTING, 2006).

3.5. DOR INFLAMATÓRIA

A dor inflamatória tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido que sofreu lesão através da ativação de mediadores inflamatórios específicos com os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos. Estes mediadores ativam vias de sinalização intracelular sensibilizando estes nociceptores, podendo desencadear uma resposta dolorosa (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; VERMA; SHEIKH; AHMED, 2015).

Desta maneira o estímulo inflamatório induz a formação e a liberação de mediadores químicos ativos capazes de gerar mudanças fisiológicas no tecido injuriado promovendo a alteração do fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular, a vasodilatação e a quimiotaxia de células leucocitárias, levando ao aparecimento dos cinco sinais clínicos da inflamação: dor, calor, rubor, edema e perda da função (LIPNIK-STANGELJ, 2013). Em situações normais as células endoteliais servem como uma barreira semipermeável, que após o estímulo inflamatório, elas perdem esta função promovendo o aumento da permeabilidade vascular e o aumento do fluxo sanguíneo, levado à vermelhidão e ao calor (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Com o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos permite a saída de fluídos plasmáticos dos vasos para o interstício, provocando o aumento da pressão oncótica intersticial e consequentemente um aumento do volume local caracterizado como edema. Quando o processo inflamatório não é combatido desencadeia a destruição do tecido agredido e fibrose do mesmo, neste sentido a dor inflamatória deixa de ser um constituinte de proteção do corpo e passa a ser considerado como uma patologia (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

3.6. FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOR E INFLAMAÇÃO

A farmacoterapia existente atualmente compreende principalmente duas classes de fármacos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os opioides, porém os efeitos adversos apresentados por ambas as classes muitas vezes limitam a sua utilidade (YAKSH et al., 2015).

3.6.1. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS (AINEs)

Os AINEs encontram-se entre os medicamentos mais prescritos e utilizados em todo o mundo, principalmente para o tratamento da inflamação, dor e edema devido suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética (BOZIMOWSKI, 2015). O mecanismo de ação desta classe é através da inibição da enzima COX, como descrito anteriormente, esta enzima é responsável pela biossíntese de PGs (BOZIMOWSKI, 2015).

Em 1991, evidenciou-se a existência de duas isoformas de COX, que embora sejam muito semelhantes quanto às estruturas protéicas, desempenham diferentes funções fisiológicas no organismo, são elas a COX-1 e a COX-2 (VANE; BOTTING, 1998). A COX-1 é considerada constitutiva e está presente, com exceção dos eritrócitos, em todos os tipos de células, levando a formação de PGs, as quais estão relacionadas com ações fisiológicas como a proteção gástrica e agregação plaquetária. Desta maneira, a COX-1 faz parte da constituição do trato gastrointestinal, estando relacionada com a produção do muco protetor e a inibição da secreção ácida gástrica, sendo assim fármacos que inibem essa isoforma podem causar diversos distúrbios no trato digestivo e risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (VANE e BOTTING, 1998; KING et al 2009; BOZIMOWSKI, 2015). Por outro lado, a COX-2 é considerada indutiva levando a formação de PGs, as quais participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos, por tanto com o objetivo de minimizar os efeitos no trato gastrointestinal causados pelos AINEs não seletivo foram desenvolvidos os COXIBs, os quais possuem seletividade pela inibição desta isoforma (Figura 9) (VANE; BOTTING, 1998; KUMMER; COELHO, 2002). Apesar de seu carácter seletivo, os inibidores de COX-2 também apresentam efeitos adverso. Com base em experimentos animais, observação de registros e ensaios clínicos, propôs-se que as principais consequências da inibição seletiva da COX-2 são em relação ao coração com a propensão à trombose, pelo desvio do

balanço pró-trombótico/antitrombótico na superfície endotelial (MKHERJEE, 2006; ABRAHAM et al., 2007)

Desta maneira os AINEs podem ser divididos em subclasses como os AINEs que são não seletivos, os quais atuam inibindo tanto a enzima COX-1 quanto a COX-2 e os AINEs inibidores seletivos da COX-2, que inibem somente a COX-2 (MCCARBERG e GIBOFSKY, 2012).

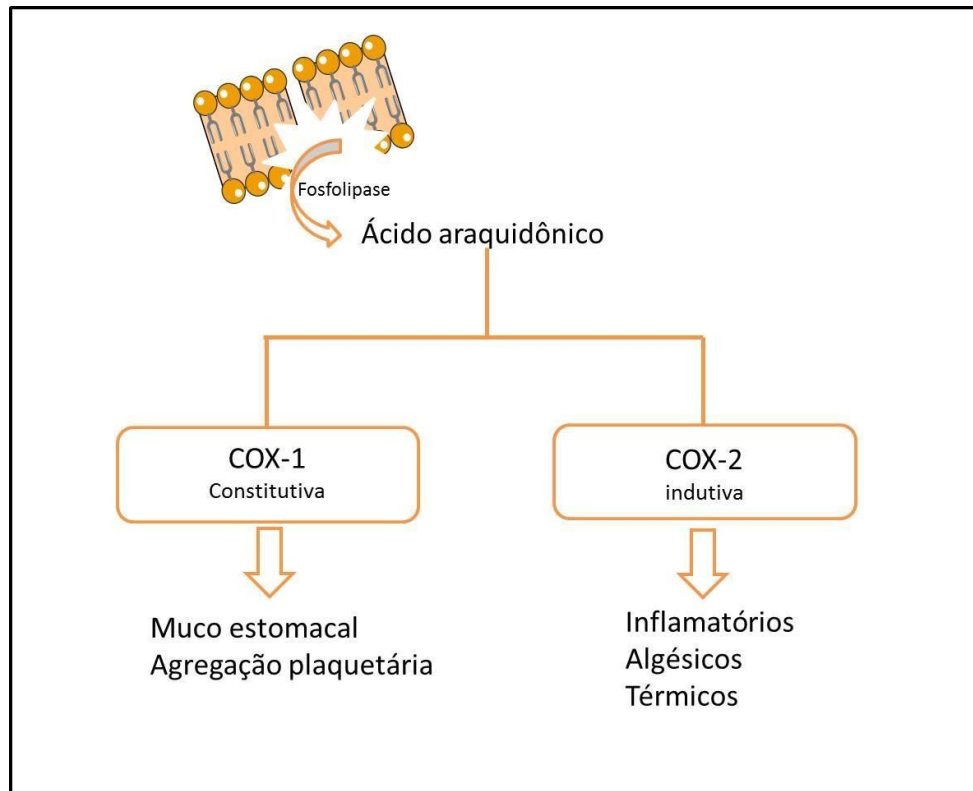


Figura 9. Diferentes isoformas da enzima cicloxigenase e algumas de suas funções. Abreviações: COX-1: cicloxigenase 1. COX-2: cicloxigenase 2.

3.6.2. OPIOIDES

Outra classe utilizada para o tratamento de dor são os derivados do ópio, conhecidos por opioides. Os opioides produzem analgesia através da sua ação sobre seus receptores encontrados ao longo do SNC. Existem basicamente três tipos de receptores opioides designados como μ , δ e κ , os quais estão acoplados a proteína G. As principais ações quando os opioides atuam sobre seus receptores são inibir a liberação pré-sináptica de neurotransmissores e reduzir as respostas neuronais pós-sinápticas a neurotransmissores excitatórios (GOLAN, 2009; STEIN, 2013).

Apesar de esses medicamentos serem analgésicos muito eficazes, eles possuem muitos efeitos adversos perigosos. Através de receptores no centro de controles respiratórios medulares e no trato gastrointestinal, os opioides podem provocar depressão respiratória, náuseas e vômitos. Além disso, também podem causar sedação, confusão, tonturas e euforia. (HAYHURST; DURIEUX, 2016; WARNER, 2012).

O uso de opioides está associado também ao desenvolvimento de tolerância, em que o uso repetido de uma dose constante de fármaco resulta na diminuição de seu efeito terapêutico e à dependência física, de modo que a interrupção abrupta do tratamento ou a redução rápida da dose resulta no desenvolvimento de uma síndrome de abstinência característica (GOLAN, 2009; HAYHURST e DURIEUX, 2016).

Tendo em vista que, os analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis no mercado apresentam efeitos adversos e uma eficácia nem sempre satisfatória, é de extrema importância a busca por novos agentes farmacológicos, os quais apresentem menos efeitos adversos no tratamento de dor e inflamação.

3.7. SELÊNIO

O Se é um calcogênio, que faz parte do grupo 16 da tabela periódica e que pode ser encontrado em diferentes formas, como o seleneto, selenito e selenato (NOGUEIRA et al., 2004; ROCHA et al., 2008). Foi descoberto em 1817 pelo pesquisador Jöns Jakob Berzelius, que ao realizar uma análise de uma amostra descobriu um novo elemento, o qual o chamou de Se. A partir desta data permitiu-se que muitos estudos pudessem ser realizados para avaliar a influência do Se nos organismos vivos (KIELISZEK e BLAZEJAK, 2016).

Anos mais tarde, em 1980 a importância do Se foi elucidada quando uma cardiomiopatia endêmica na China foi detectada pelos baixos níveis de Se no sangue dos pacientes e, então o Se passou a ser considerado como um micronutriente essencial da dieta (ZHOU et al., 2003). As principais fontes de Se são castanha do Pará, atum, salmão, cereais, carnes, ovos, laticínios, cebola e alho. Porém, uma ingestão exacerbada de Se pode vir a causar toxicidade (KIELISZEK; BLAZEJAK, 2016).

É importante salientar que apesar de sua característica tóxica quando ingerido em grandes quantidades, desempenha um papel fundamental para a

manutenção do organismo, sendo indispensável em razão de formar as selenoproteínas. Essa classe de proteínas engloba a selenoproteína P (SelP), selenoproteína W (SelW), glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TRx) (SANMARTÍN et al., 2011; KUDVA et al., 2015).

Sabe-se também que a carência de Se pode estar envolvida com diversas patologias, como por exemplo, depressão, problemas musculares, doenças cardiovasculares, alterações reumáticas, esclerose, câncer, diabetes, entre inúmeras outras doenças (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2010). Portanto, o Se despertou interesse para os grupos de pesquisa, que passaram a incorporá-lo em moléculas químicas (MORO et al., 2005). Desta maneira, inúmeros estudos relatam as propriedades promissoras obtidas dos compostos orgânicos de Se, como atividade antioxidante (PADILHA et al., 2017), antidepressiva (CASARIL, et al., 2017) antinociceptiva (SOUSA et al., 2017), anti-inflamatória (PINZ, 2016), dentre outras.

3.8. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO COM ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA

O ebselen (Figura 10) é o composto orgânico de Se mais estudado nos últimos tempos. Ele é caracterizado por mimetizar a atividade da GPx e é considerado um composto multifuncional, o qual catalisa várias reações essenciais para a proteção de componentes celulares contra danos oxidativos e excesso de radicais livres. Com base em uma série de estudos *in vitro* e *in vivo*, sabe-se que ele modula cofactores enzimáticos, expressão gênica, defesas antioxidantes e sistemas imunológicos (KADE et al., 2013; AZAD e TOMAR, 2014). Devido a estas propriedades, o ebselen está atualmente em testes clínicos de fase II para a prevenção e tratamento da desordem de bipolaridade (AZAD e TOMAR, 2014).

Na literatura, já se tem amplamente descrito a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do ebselen, por ter a capacidade em neutralizar o peroxinitrito e inibir a proteína quinase C, a 5-lipoxigenase, óxido nítrico sintase e enzimas envolvidas com o desencadeamento da inflamação em diferentes tecidos, tais como a inibição de algumas lipoxigenases, PGs entre outras (SCHEWE, 1995; TAKASAGO et al., 1997; MUGESH et al., 2001; BOSCH-MORELL et al., 2002).

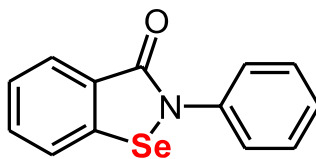


Figura 10. Estrutura química do ebselen.

O disseleneto de difenila (Figura 11), assim como o ebselen, vem sendo muito estudado nas ultimas décadas. Nogueira e colaboradores (2003) demonstraram que o disseleneto de difenila age de maneira similar aos AINES, através da inibição das COX, e que este composto, diferentemente do ebselen, demonstrou-se eficiente em reduzir a nocicepção nas doses de 10-20 mg/kg no ensaio de indução por formalina.

Savegnago e colaboradores (2007) adicionam resultados, comprovando que este composto possui sua ação antinociceptiva mediada pelo envolvimento com as vias glutamatérgicas (receptores NMDA), adenosinérgica (receptores A_{2B}), serotoninérgica, com a via do óxio-nítrico/L-arginina e com canais de potássio.

Outros estudos enriquecem os promissores resultados do disseleneto de difenila na ação antinociceptiva. Rosa e colaboradores (2015) investigaram o efeito antinociceptivo do composto induzido por glutamato monossódico em ratos recém-nascidos em testes de nocicepção por induções térmicas (teste da placa quente e teste da imersão da cauda) e mecânicas (teste do Von Frey). Os resultados demonstraram um potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do disseleneto de difenila neste modelo de nocicepção.

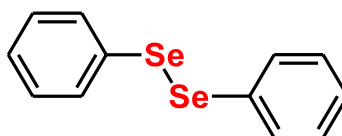


Figura 11. Estrutura química do disseleneto de difenila.

Recentemente foi demonstrado a ação antinociceptiva do 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-[PSQ]) (Figura 12). O PSQ, quando administrado pela via intragástrica (i.g.), apresenta ação antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos de nocicepção em camundongos. Este estudo relata a ação antinociceptiva através do teste de nocicepção induzido por formalina, no qual o composto foi capaz de causar inibição no tempo de lambida na fase neurogênica e na fase inflamatória na dose de 1 mg/Kg (i.g.), além disso reduziu o edema formado pela injeção de formalina na

dose de 0,1 mg/Kg (i.g.). Também foi realizado o teste de nocicepção por indução térmica através da placa quente, em que o composto demonstrou atividade na dose de 0,1 mg/Kg (i.g.) (PINZ et al, 2016).

Para verificar a possível ação anti-inflamatória, foi realizado o teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton, em que o 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-[PSQ]) foi capaz de reduzir o edema de orelha na dose de 0,1 mg/Kg (PINZ et al, 2016).

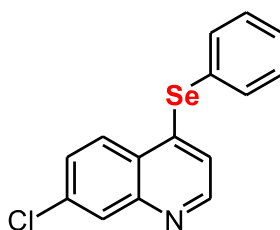


Figura 12. Estrutura química do 4-fenilselenil-7-cloroquinolina (4-[PSQ]).

Sousa e colaboradores (2017) demonstraram o efeito antinociceptivo de outro composto orgânico de Se, o α -(fenilseleno)-acetofenona (PSAP) (Figura 13). Neste estudo, avaliou-se a atividade antinociceptiva do PSAP administrado por via i.g. em modelos de nocicepção por indução química (formalina e glutamato) em camundongos. Este estudo demonstrou que o PSAP diminui o tempo de lambida induzido pela formalina nas fases neurogênica (10 e 50 mg/Kg, i.g.) e inflamatória (1-50 mg/Kg, i.g.). Paralelamente, este composto também reduziu o edema de pata induzido pela formalina na dose de (10 e 50 mg/Kg, i.g.). O mesmo foi observado no teste do glutamato, no qual houve uma redução no tempo de lambida quando o PSAP (0,1 mg/Kg, i.g.) foi administrado 30 min antes do teste. O efeito antinociceptivo deste composto parece estar envolvido com os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico.

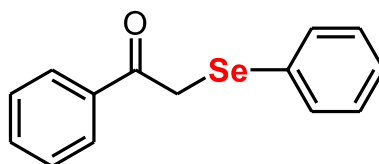


Figura 13. Estrutura química do α -(fenilseleno)-acetofenona (PSAP).

A busca constante por compostos com ação antinociceptiva e anti-inflamatória é baseada na necessidade de compostos mais eficientes em menores doses, sem apresentar toxicidade. Dessa maneira, as propriedades promissoras do

Se explica o motivo de testar diferentes compostos orgânicos de Se nestas duas ações.

3.9. INDOL

Além dos compostos orgânicos de Se, outra classe de moléculas com propriedades biológicas promissoras são os indóis. Em particular, moléculas que possuem um núcleo indólico são uma subclasse extremamente desejável de heterociclos devido a uma ampla gama de atividades biológicas associadas a eles, como a atividade anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, anti-hiperplasia, dentre outras (SHARMA, 2010). Além disso, são encontrados, por exemplo, na estrutura do aminoácido triptofano, do hormônio melatonina e do neurotransmissor 5-HT (Figura 14) (KAUSHIK et al., 2013).

Um estudo realizado por Guerra e colaboradores (2011), demonstrou que duas moléculas contendo um núcleo indol em sua estrutura, o 5-(1*H*-Indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona e o 3-(4-Bromo-benzil)-5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (Figura 14), representam promissores anti-inflamatórios e protótipos de drogas antinociceptivas que agem inibindo a migração celular em vários modelos de inflamação aguda e exsudação plasmática. Estes efeitos podem estar relacionados à modulação do sistema imunológico através das reduções nas concentrações de TNF- α e IL-1 β , por tanto esses dois compostos atuam também na dor inflamatória.

Nesse sentido, seria uma estratégia relevante a síntese de compostos contendo tanto Se quanto o núcleo indólico em suas estruturas, já que ambos possuem efeitos farmacológicos promissores. Com isso Vieira e colaboradores (2015) desenvolveram moléculas que contiam essas características em suas estruturas, sendo uma destas o CMI.

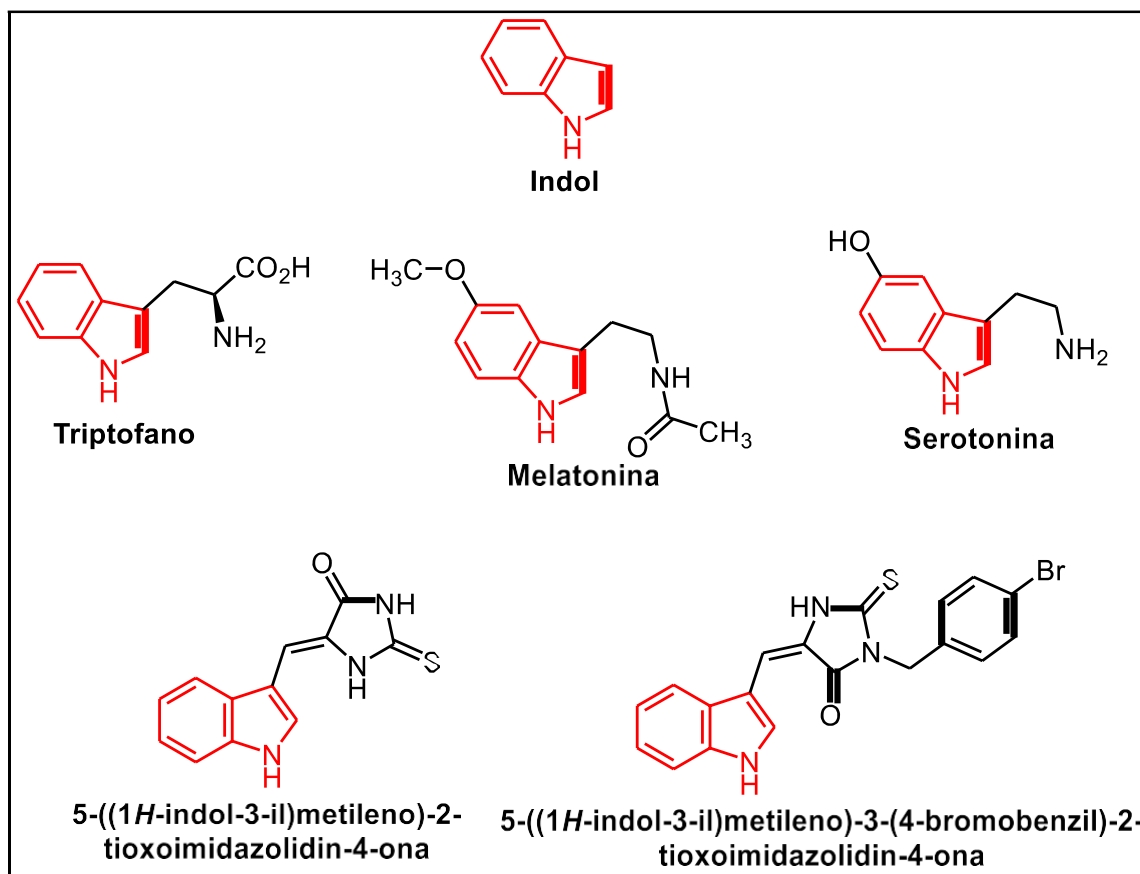


Figura 14. Estrutura química do indol e moléculas que contêm um indol em sua estrutura.

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade antidepressiva acompanhada de uma redução da neuroinflamação e do estresse oxidativo do composto CMI (Figura 15), molécula estudada neste trabalho (CASARIL et al., 2017).

A dor desempenha um papel significativo na qualidade de vida do paciente, tornando muitas vezes, impossível de realizar suas atividades diárias. Deste modo, a dor tem como comorbidade distúrbios psiquiátricos, especialmente a depressão maior. Ambas as condições são muitas vezes tratadas de forma inadequada o que resulta em incapacidade significativa do paciente e redução da qualidade de vida, o que aumenta consideravelmente o uso de outros medicamentos e os custos com a saúde. Portanto seria de grande interesse uma molécula eficaz para o tratamento de ambas patologias (CUNHA et al, 2008; BLAIR, 2008).

Desta maneira, sabendo que a dor e a depressão podem estar associadas, e que o selênio e o indol possuem propriedades farmacológicas promissoras, nosso grupo de pesquisa buscou investigar a possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do CMI em camundongos.

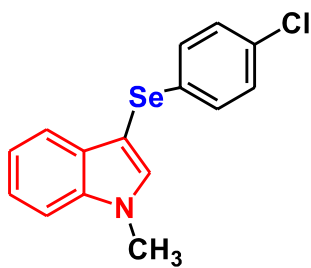


Figura 15. Estrutura química do 3-(4-clorofenilselenil)-1-metil-1*H*-indol (CMI)

4. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra assim organizado: Resumo, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências.

3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole: a multi-target anti-inflammatory and antinociceptive compound

Paloma T. Birmann^a, Fernanda S. S. Sousa^a, Daniela H. de Oliveira^b, Micaela Domingues^c, Beatriz M. Vieira^b, Eder J. Lenardão^b, Lucielli Savegnago^{a,c}.

^a Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil

^b Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil

^c Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGB), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil

*Correspondence should be sent to:

Lucielli Savegnago

Universidade Federal de Pelotas- UFPel

CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

Fone: +55 (53)3275-7350

e-mail: luciellisavegnago@yahoo.com.br

Abstract

Several pathologies, such as pain and inflammation, are modulated by different pathways, becoming necessary to develop multi-target drugs. Based on that, we investigated the antinociceptive and anti-inflammatory effect of 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole (CMI), as well as the systems involved in these actions. This study evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of CMI [0.001-10 mg/kg administered intragastrically (i.g.)] in the formalin, glutamate, hot plate, ear edema induced by croton oil and paw edema induced by formalin tests. In addition, to investigate the mechanism of action, mice were pre-treated with antagonists of adenosinergic, monoaminergic and opioid systems before administration of CMI. The selenium-containing compound decreased the paw licking and biting time in the formalin and glutamate tests, increased the response latency in hot plate test, without ambulatory changes, evaluated in the open field test. CMI was able to reduce both paw and ear edema induced by formalin and croton oil, respectively. Additionally the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg) was blocked when mice were pretreated with the antagonists: SCH23390 [D_1 -receptor antagonist, 0.05 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)], WAY100635 (5-HT_{1A}-receptor antagonist, 0.7 mg/kg, i.p.), ondansetron (5-HT₃-receptor antagonist, 0.5 mg/kg, i.p.), ketanserin (5-HT_{2A/2C}-receptor antagonist, 0.3 mg/kg, i.p.), naloxone (non-selective antagonist 1 mg/kg, i.p.), caffeine (non-selective antagonist, 3 mg/kg, i.p.) and prazosin (α_1 -receptor antagonist, 0.15 mg/kg, i.p.). These results demonstrate that the antinociceptive effect of CMI is mediated by monoaminergic, opioidergic and adenosinergic modulations and can be a promising multi-target molecule for the treatment of pain and inflammation.

Keywords: antinociceptive; anti-inflammatory; indole; organoselenium; multi-target drug.

1. Introduction

Pain is an unpleasant sensation that affects around of 30% of people worldwide during some time of life (SBED, 2017). Currently, the drugs for the treatment of this condition have many side effects, which induce the patients to discontinue the treatment (Yaksh et al., 2015). In this way the greatest challenge of the research groups is to find a drug that has fewer side effects and improves the quality of life of the patients.

In the past few years, with advances in biochemistry and neuropharmacology, the development of effective medicines represents a new paradigm, once the available therapies are focused on the generation of compounds that possess selectivity and potency only for a single target, which makes it often insufficient to prevent disease progression. Therefore, research groups have focused in the development of novel compounds which will simultaneously modulate more targets, known as multi-targeted designed drugs (MTDD), or multi-target drugs (Geldenhuys et al., 2013).

It is known that downward modulation of the nociception response, in addition to involving various brain structures, also involves different neurotransmitter systems, such as the neuropeptidergic, monoaminergic, opioidergic, adenosinergic and gabaergic ones (Millan, 2002). Considering that, the experimental studies in animal models involving induction of nociception pursuit new drugs capable of modulating two or more of these pathways, as the MTDD.

Thus, organic compounds of selenium (Se) have received more attention, since such compounds present promising pharmacological characteristics, such as antioxidants, anti-inflammatories and antidepressants (Nogueira et al., 2004; Roman et al, 2014; Brod et al, 2016). Selenium is essential for human health, and it is part of selenocysteine, which is present in several protective mammalian enzymes, including glutathione peroxidase (GPx)

and thioredoxin reductase (TrxR) (Reich and Hondal, 2016). Over the years, selenium has been used in the chemical structures for the development of new drugs (Wrobel et al., 2016).

Another important class of compounds is the indole and derivatives. Indoles are heterocyclic compounds abundant in nature with pharmacological actions (Kaushik et al., 2013). They are found in the structure of tryptophan, an essential amino acid, in the hormone melatonin and in the neurotransmitter serotonin (5-HT) (Kaushik et al., 2013). This nitrogenated scaffold is present in the structure of many bioactive molecules, with antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory actions (Sharma et al., 2010). Molecules containing the indole moiety have been employed as therapeutic agents in various neurodegenerative and inflammatory disorders (Guerra et al., 2011; López et al., 2014). The anti-inflammatory and antinociceptive actions of several indole-derivatives have been described, such as 3-[(2-imidazolyl,benzimidazolyl]indol (Verma et al., 1994), 5-(1*H*-indol-3-yl-methylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one (Guerra et al., 2011) and 3-(4-bromo-benzyl)-5-(1*H*-indol-3-yl-methylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one (Guerra et al., 2011).

Thus, it is interesting to explore novel Se-containing indoles as a strategy for the development of novel multi-target drugs. In this sense, the molecular hybridization has been used as an attractive strategy to prospect molecules which have fewer adverse effects and are more effective for the treatment of pain and inflammation (Choi, 2004; Viegas-Junior et al., 2007). In this premise, recently our group demonstrated the antidepressant-like activity of 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole (CMI), which was accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress (Casaril et al., 2017).

Therefore, considering that CMI already showed anti-inflammatory action in a mouse model of depression, we decided to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of this compound in models of nociception in mice. We used chemical (formalin and glutamate, ear edema induced by croton oil and paw edema induced by formalin tests) and

thermal (hot-plate test) models of nociception in order to further validate the biological activity of this compound. In addition, the possible involvement of neurotransmitters systems in the antinociceptive activity of CMI was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted in male adult Swiss mice (25 - 35 g). The animals were kept in a separate animal room, on a 12 h light/dark cycle, at room temperature (22 ± 1 °C) with free access to water and food. All manipulations were carried out between 08:00 a.m. and 05:00 p.m. The experiments were performed on separate groups. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources at the Federal University of Pelotas, Brazil (CEEAA 1873-2016). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

2.2. Drugs

CMI (Fig. 1) was prepared and characterized as previously described by Vieira et al. (2015), dissolved in canola oil and administered i.g. An analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The antagonist compounds naloxone, prazosin, ondansetron, WAY100635, ketanserin, sulpiride, yohimbine, caffeine and SCH23390 were dissolved in saline solution and were administered by intraperitoneally route (i.p.). The positive control meloxicam (1-10 mg/kg, i.g.) and morphine [2.5 mg/kg, subcutaneously (s.c.)] were dissolved in saline solution and were obtained with the highest available commercial purity. Mice received CMI and antagonists in a constant volume of 10 mL/kg of body weight. Formalin was dissolved in saline solution, sodium *L*-glutamate 1-hydrate (20 μmol) was dissolved in distilled water and

croton oil (2.5%) was dissolved in acetone (20 μ L/ear). All drugs were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

[Please insert Figure 1 here]

2.3. Behavioral tests

2.3.1 Nociception and paw edema induced by formalin

The formalin test was carried out as described previously Hunskaar and Hole, 1987. Animals received the interplantar (i.pl.) administration of formalin (2.5%, v/v; 20 μ L/paw) into the ventral right hind paw and saline solution (0.9%, v/v; 20 μ L/paw) into the left paw. After formalin injection, mice were individually placed in separate boxes and observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and 15 to 30 min (inflammatory phase). The time spent licking and biting or biting the injected paw was recorded with a chronometer and considered as indicative of nociception. Pre-treatment with the compound at doses of 0.0001-10 mg/kg (i.g.), vehicle (canola oil, 10 mL/kg, i.g.) or meloxicam (10 mg/kg, i.g.) given 30 min before the test. Meloxicam was used as positive control.

After the test, animals were euthanized by inhalation of isoflurane, and both paws were cut out at the ankle joint and immediately weighed. The paw edema was measured by comparing the difference between the weight of the formalin-treated and the weight of vehicle-treated paw, respectively (Hunskaar and Hole, 1987)

2.3.2. Glutamate-induced nociception

Mice were pretreated with CMI (0.0001-10 mg/kg, i.g.), meloxicam (10 mg/kg, i.g.) or vehicle (canola oil, 10 mL/kg, i.g.) 30 min before injection of glutamate i.pl. (20 μ mol, 20 μ L/paw) into the ventral right hind paw. Mice were observed individually for 15 min and the time spent licking and biting the injected paw was considered as a nociceptive behavior (Beirith et al., 2002).

2.3.3. *Hot-plate test*

The hot-plate test was carried out according to the method described by Woolfe and MacDonald (1944). Mice were placed inside an acrylic cylinder on the surface of a preheated metal plate at 55 ± 1 °C (hot plate apparatus). The time of latency was defined as the period between the zero point when the animal was placed on the hot plate surface and the time when the animal licked or jumped its back paw. The maximum allowed time of stay was 30 seconds to avoid tissue damage.

In the experiment day, the mice were pretreated with CMI (0.1-1 mg/kg i.g.), vehicle (canola oil, 10 mL/kg, i.g.) or morphine (2.5 mg/kg, s.c.). The delta of latency (Δt) was determined according to the following equation: Δt (s) = post-treatment latency – pre-treatment latency (Aanonsen and Wilcox, 1987).

2.3.4. *Ear edema induced by croton oil*

To evaluate the anti-inflammatory action of the CMI, the ear edema induced by croton oil test was used, according described by Tubaro et al., (1986). Mice were pretreated with CMI (0.01-10 mg/kg, i.g.), meloxicam (50 mg/kg, i.g.) or vehicle (canola oil, 10 mL/kg, i.g.) before the application of the croton oil 2.5% croton oil diluted in acetone (20 μ L/ear). According to previous studies (Woolfe and MacDonald, 1944) it was applied croton oil in the right ear and acetone in the left ear. After 4 hours of application, the animals were euthanized and the ears were removed and weighed difference between the control ear (left) and the croton oil-treated ear (right) for analysis of edema formation (Swingle et al., 1981)

2.3.5. *Mechanisms involved in the anti-nociceptive action of CMI*

The possible contribution of the dopaminergic, serotonergic, opioidergic, adenosinergic and adrenergic systems to the antinociceptive action of CMI was assessed using different groups of animals, which received a pre-treatment with antagonists of each system.

The antagonists were diluted in saline and administered intraperitoneally 15 min before administration of CMI (0.01 mg/kg, i.g.).

The antagonists used were SCH23390 (selective antagonist at dopamine D₁ receptor, 0.05 mg/kg), sulpiride (antagonist at dopamine D₂ and D₃ receptors, 5 mg/kg), ondansetron (selective antagonist at 5-HT₃ receptor, 0.5 mg/kg), WAY100635 (selective antagonist at 5-HT_{1A} receptor, 0.7 mg/kg), ketanserin (selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} receptors, 0.3 mg/kg), naloxone (non-selective antagonist at opioid receptors, 1 mg/kg), caffeine (non-selective antagonist at adenosinergic receptors, 3 mg/kg), prazosin (selective antagonist at α_1 , 0.15 mg/kg) and yohimbine (selective antagonist at α_2 receptor, 1 mg/kg, i.p.).

2.3.10. Open field test

In order to verify that the results obtained in the above mentioned tests did not occur due to changes in the motor activity of mice, the animals were analyzed in the open field test. After 30 min of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) administration, each animal was immediately placed at the center of the apparatus (30 x 30 x 15 cm) and observed for 5 min to record locomotor activity (number of segments crossed with the four paws) (Walsh and Cummins, 1976).

To examine whether the administration of CMI with antagonists impaired motor abilities, mice were pre-treated with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.), sulpiride (5 mg/kg, i.p.), ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.), WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p.), ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.), naloxone (1 mg/kg, i.p.), caffeine (3 mg/kg, i.p.), prazosin (0.15 mg/kg, i.p.) and yohimbine (1 mg/kg, i.p.) 15 before administration of CMI (0.01 mg/kg, i.g.). After 45 min the open-field test was carried out.

2.4. Statistical analysis

All experimental results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls when appropriate (CMI treatment), or two-way

ANOVA (naloxone, prazosin, ondansetron, WAY100635, ketanserin, sulpiride, yohimbine, caffeine and SCH23390 $\times$ CMI) followed by Bonferroni's test for post hoc comparison. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Effect of CMI in the formalin test and paw edema induced by formalin

The treatment with CMI (0.01, 1 and 10 mg/kg) decreased the licking and biting time in the neurogenic phase (first phase) [$F_{(6,42)} = 21.7$, $P < 0.001$] when compared to control group 42.8%, 62.7% and 89.6% respectively (Fig. 2A). In the inflammatory phase (second phase) [$F_{(6,38)} = 17.9$, $P < 0.001$] the CMI (0.01, 1 and 10 mg/kg) decreased the licking and biting time 41.7%, 87.7% and 99.7%, respectively, when compared to control group (Fig. 2B), showing significant antinociceptive activity in the test. Meloxicam (10 mg/kg), a reference drug, significantly decreased licking and biting time in the neurogenic phase 85.5% and inflammatory phase 49.1% when compared to control group.

The effect of CMI on formalin induced paw edema (0.01, 1 and 10 mg/kg) reduced the edema [$F_{(6,37)} = 40.1$, $P < 0.001$], 34.1%, 94.8% and 95.8% respectively, showing significant anti-inflammatory activity. Meloxicam (10 mg/kg) also reduced the paw edema 40.2% when compared to control group (Fig. 2C).

[Please insert figure 2 here]

3.2. Effect of CMI in the glutamate test

In the glutamate test, the treatment with CMI (0.01, 1 and 10 mg/kg) revealed decreased paw licking and biting times [$F_{(5,35)} = 47.9$, $P < 0.001$], 74.2%, 89.1% and 95.2%, respectively when compared to control group (Fig.3). This result confirms the antinociceptive activity obtained in the formalin test. Meloxicam (10 mg/kg) decreased paw licking and biting time 51% when compared to control group.

[Please insert figure 3 here]

3.3. Effect of CMI on the hot-plate test

Fig.4 shows that CMI (0.1 and 1 mg/kg) caused a significant increase response latency to thermal stimulus when compared to control group [$F_{(4,25)} = 33.1$, $P < 0.001$]. Morphine (2.5 mg/kg, s.c.), a reference drug, also increase response latency to thermal stimulus when compared to control group.

[Please insert figure 4 here]

3.4. Effect of CMI in the ear edema induced by croton oil

The Fig.5 show the effect of CMI on ear edema induced by croton oil. This test treatment with CMI (0.1, 1 and 10 mg/kg) reduced the edema in [$F_{(5,42)} = 5.89$, $P < 0.001$], 59.6%, 78% and 82.7%, respectively when compared to control group. Meloxicam reduced the edema 84.9 % when compared to control group.

[Please insert figure 5 here]

3.5. Open field test

The treatment with CMI (0.001-10 mg/kg) in mice did not cause significant change in the number of crossings in the open-field test [$F_{(4,35)} = 0.71$, $P = 0.59$] (Table 1).

[Please insert Table 1 here]

3.6. Involvement of the dopaminergic system

Fig. 6A shows that the pre-treatment with SCH23390 (selective antagonist at dopamine D_1 receptor, 0.05 mg/kg, i.p.) produced a significant inhibition of the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Two-way ANOVA revealed a significant effect of CMI alone [$F_{(1,22)} = 54.1$, $P < 0.001$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (SCH23390 $\times$ CMI) [$F_{(1,22)} = 7.69$; $P = 0.01$], but did not show alterations

in the pre-treatment with SCH23390 [$F_{(1,22)} = 6.07$; $p = 0.02$]. No significant effect of treatments in locomotor activity in the open-field test was observed (Table 2). No significant effect for CMI treatment [$F_{(1,20)} = 3.41$, $P = 0.08$], SCH23390 treatment [$F_{(1,20)} = 1.48$, $P = 0.24$] or CMI $\times$ SCH23390 interaction [$F_{(1,20)} = 0.398$, $P = 0.54$] was observed.

The pre-treatment with sulpiride (dopamine D_2 and D_3 receptors, 5 mg/kg, i.p.) did not produce a significant inhibition of the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in glutamate test (Fig. 6B). Two-way ANOVA revealed a significant effect of CMI alone [$F_{(1,24)} = 28.3$, $P < 0.001$], but not of the pre-treatment with sulpiride [$F_{(1,24)} = 0.374$, $P = 0.55$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (sulpiride $\times$ CMI) [$F_{(1,24)} = 2.19$, $P = 0.15$]. No significant effect of treatments in locomotor activity on the open-field test was observed (Table 2). No significant effect for CMI treatment [$F_{(1,20)} = 1.73$, $P = 0.20$], sulpiride treatment [$F_{(1,20)} = 0.229$, $p = 0.64$] or CMI $\times$ sulpiride interaction [$F_{(1,20)} = 1.73$, $P = 0.20$].

[Please insert Figure 6 here]

[Please insert Table 2 here]

3.7. Involvement of the serotonergic system

The results presented in Fig. 7A showed that the pre-treatment with WAY100635 (selective antagonist at 5-HT_{1A} receptor, 0.7 mg/kg, i.p.) was able to decrease licking and biting of the paw elicited by CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in glutamate test. Two-way ANOVA revealed a statistically significant effect of treatment with CMI alone [$F_{(1,21)} = 19.7$, $P < 0.001$], and pre-treatment $\times$ treatment interaction (WAY100635 $\times$ CMI) [$F_{(1,24)} = 8.94$, $P = 0.007$], but not of the pre-treatment with WAY100635 [$F_{(1,21)} = 8.3$, $P = 0.009$]. The treatments did not show any significant effect on the locomotor activity in the open-field test (Table 2). No significant effects of CMI treatment [$F_{(1,20)} = 1.51$, $P = 0.70$], WAY100635 treatment [$F_{(1,20)} = 1.15$, $P = 0.30$] or CMI $\times$ WAY100635 interaction [$F_{(1,20)} = 1.51$, $P = 0.70$] were observed.

The pre-treatment with ondansetron (a selective antagonist of 5-HT₃ receptors, 0.5 mg/kg, i.p.) produced a significant inhibition on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg) in glutamate test (Fig. 7B). Two-way ANOVA revealed a significant effect of CMI alone [$F_{(1,24)} = 51.5$, $P < 0.001$], and pre-treatment $\times$ treatment interaction (ondansetron $\times$ CMI) [$F_{(1,24)} = 10.8$, $P = 0.003$], but not on the pre-treatment with ondansetron [$F_{(1,24)} = 6.02$, $P = 0.02$]. No significant effect of treatments in locomotor activity in the open-field test was observed (Table 2). No significant effect of CMI treatment [$F_{(1,20)} = 0.559$, $P = 0.46$], ondansetron treatment [$F_{(1,20)} = 0.681$, $P = 0.42$] or CMI $\times$ ondansetron interaction [$F_{(1,20)} = 0.192$, $P = 0.67$] was observed.

Fig. 7C shows that the pre-treatment of mice with ketanserin (a selective antagonist at 5-HT_{2A/2C} receptors) prevented the antinociceptive effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test. The two-way ANOVA revealed significant differences of CMI pre-treatment [$F_{(1,22)} = 62.4$, $P < 0.001$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (ketanserin $\times$ CMI) [$F_{(1,22)} = 4.92$, $P = 0.04$], but not on the pre-treatment with ketanserin [$F_{(1,22)} = 4.05$, $P = 0.06$]. No significant effect of treatments in locomotor activity in the open-field test was observed (Table 2). No significant effect of CMI treatment [$F_{(1,20)} = 0.953$, $P = 0.34$], ketanserin treatment [$F_{(1,20)} = 0.813$, $P = 0.38$] or CMI $\times$ ketanserin interaction [$F_{(1,20)} = 2.4$, $P = 0.14$] was observed.

[Please insert figure 7 here]

3.8. Involvement of the opioidergic system

Fig. 8 shows that the pre-treatment with naloxone (non-selective antagonist at opioid receptors, 1 mg/kg, i.p.) was capable of decreasing the licking and biting of the paw elicited by CMI (0.01 mg/kg) in the glutamate test. Two-way ANOVA revealed a significant effect of CMI alone [$F_{(1,20)} = 75.8$, $P < 0.001$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (naloxone $\times$ CMI) [$F_{(1,20)} = 17.8$, $P < 0.001$], but not the pre-treatment with naloxone [$F_{(1,20)} = 0.665$, $P =$

0.42]. No significant effect of treatments in locomotor activity on the open-field test was observed (Table 2). No significant effect of CMI treatment [$F_{(1,26)} = 0.518$, $P = 0.48$], naloxone treatment [$F_{(1,26)} = 0.266$, $P = 0.61$] or CMI $\times$ naloxone interaction [$F_{(1,26)} = 0.064$, $P = 0.80$] was observed.

[Please insert Figure 8 here]

3.9. Involvement of the adenosinergic system

Fig. 9 shows that the pre-treatment with caffeine (non-selective antagonist at adenosinergic receptor, 3 mg/kg, i.p.) was able to decrease licking and biting of the paw elicited by CMI (0.01 mg/kg) in glutamate test. Two-way ANOVA revealed a significant effect of CMI alone [$F_{(1,19)} = 76.3$, $P < 0.001$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (caffeine $\times$ CMI) [$F_{(1,19)} = 8.27$, $P = 0.01$], but not the pre-treatment with naloxone [$F_{(1,19)} = 5.07$, $P = 0.04$]. No significant effect of treatments in locomotor activity on the open-field test was observed (Table 2). No significant effects of CMI treatment [$F_{(1,24)} = 0.049$, $P = 0.83$], caffeine treatment [$F_{(1,24)} = 3.86$, $P = 0.06$] or CMI $\times$ caffeine interaction [$F_{(1,24)} = 2.82$, $P = 0.11$] were observed.

[Please insert Figure 9 here]

3.10. Involvement of the adrenergic system

The pre-treatment of mice with prazosin (selective antagonist at α_1 , 0.15 mg/kg, i.p.) was able to decrease licking and biting of the paw elicited by CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in glutamate test (Fig. 10A). Two-way ANOVA revealed a statistically significant effect of treatment with CMI alone [$F_{(1,24)} = 77.8$, $P < 0.001$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (prazosin $\times$ CMI) [$F_{(1,24)} = 19.9$, $P < 0.001$], but not the pre-treatment with prazosin [$F_{(1,24)} = 8.24$, $P = 0.008$]. No significant effect of treatments in locomotor activity on the open-field test was observed (Table 2). No significant effect of CMI treatment [$F_{(1,20)} = 0.12$, $P = 0.73$],

prazosin treatment [$F_{(1,20)} = 1.17$, $P = 0.29$] or CMI $\times$ prazosin interaction [$F_{(1,20)} = 0.12$, $P = 0.73$] was observed.

On the other hand, pre-treatment with yoimbine (selective antagonist at α_2 receptor, 1 mg/kg, i.p.) was not able to decrease licking and biting of the paw elicited by CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in glutamate test (Fig. 10B). Two-way ANOVA revealed a statistically significant effect of treatment with CMI alone [$F_{(1,23)} = 24.5$, $P < 0.001$], but not the pre-treatment with yoimbine [$F_{(1,23)} = 0.271$, $P = 0.61$] and pre-treatment $\times$ treatment interaction (yoimbine $\times$ CMI) [$F_{(1,23)} = 3.38$, $P = 0.08$]. No significant effect of treatments in locomotor activity on the open-field test was observed (Table 2). No significant effect of CMI treatment [$F_{(1,20)} = 0.14$, $P = 0.70$], yoimbine treatment [$F_{(1,20)} = 2.46$, $P = 0.13$] or CMI $\times$ yoimbine interaction [$F_{(1,20)} = 0.49$, $P = 0.49$] was observed.

[Please insert figure 10 here]

4. Discussion

Pain is produced by several different mechanisms, and can be classified as physiological, inflammatory or neuropathic, therefore the ideal is that the treatment be directed to specific mechanisms and not only for the symptoms relief (Campbell and Richard, 2006). In this sense, we used different animal models of nociception to mimic the mechanisms of pain: chemical (formalin and glutamate test), thermal (hot plate test) and inflammatory (ear edema induced by croton oil and paw edema induced by formalin). The results demonstrated that CMI produced a significant antinociceptive effect at the doses tested (0.01-10 mg/kg, i.g.) in all models of nociception in mice without modifying locomotor activity. Moreover, it was demonstrated the involvement of several mediators in the antinociceptive effect of CMI.

It is important to highlight that a lower dose of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) was able to present a significant antinociceptive effect when compared to other organoselenium

compounds, such as m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide (1-100 mg/kg; i.g.) (Bruning et al., 2010), diphenyl diselenide (1-100 mg/kg; i.g.) (Savegnago et al., 2007), 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline (0.1-25mg/kg; i.g.) (Pinz et al., 2016) and α -(phenylselanyl) acetophenone (0.1-10 mg/kg, i.g.) (Sousa et al., 2017).

It is known that some chemical agents, such as formalin, excite and sensitize the peripheral nerve endings, which respond to these chemical signals inducing a nociceptive response (Millan, 2002; Julius and Basbaum, 2001). The interplantar injection of formalin induces a pain-related behaviour with two distinct phases (Martins et al., 2006). The first phase (0-5 min) is considered neurogenic or acute pain, being related to the direct chemical stimulation of afferent fibers type C and A δ is associated with the release of substance P, excitatory amino acids and nitric oxide. The second phase (15-30 min) is related to the release of several pro-inflammatory mediators (Hunskar and Hole, 1987; Ji and Woolf, 2001). The results showed that CMI was able to reduce the harmful stimulus caused by formalin in the first and second phases at the doses tested (0.01-10 mg/kg).

According to Mujumdar and Misar (2004), glutamate participates in the modulation of pain. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter and is known to be involved in nociceptive transmission through fibers, as well as in development and maintenance of pain response (Pereira et al., 2010). The CMI also had activity in reducing glutamate-induced nociception, further emphasizing its antinociceptive activity in chemical models of nociception.

In addition, CMI (0.1-1 mg/kg) reduced the nociceptive behavior from the thermal stimulus on the hot-plate test. The proteins transient receptor potential cation channels (TRPV) produce action potentials at temperatures above 42 °C. When animals are subjected to temperatures higher than 50 °C, the TRPV2 type receptors are activated and heat stimuli are transduced through TRPV3 and TRPV4 channels causing nociception (Caterina et al.,

1999). TRPV heat sensitive ion channels are targets for new drugs development, intend to interfere with the peripheral sensation of heat (Huang et al., 2011).

The anti-inflammatory effect of CMI was assessed by paw edema induced by formalin and ear edema induced by croton oil tests. Both tests had anti-inflammatory effect at the doses tested (0.01-10 mg/kg). As previously described formalin elicits a biphasic response, the mediators of inflammation, consequently the inflammation are produced after 15 minutes of formalin application (second phase), forming the edema in the paw of the mice (Yang et al., 2012). The CMI was able to reduce the paw edema of caused by formalin, thus demonstrating its anti-inflammatory activity.

The croton oil is composed of phorbol esters, especially 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), the component attributed to promoting inflammatory activity (Gábor, 2000). When applied subcutaneously in the mice's ears, TPA mobilizes the phospholipids of the plasma membrane, resulting in the formation of arachidonic acid (AA). AA may undergo oxidation by producing inflammatory mediators via the cyclooxygenase pathway (Furstenberger et al., 1994). The CMI was able to reduce the ear edema of caused by croton oil. Our results demonstrate that CMI also has anti-inflammatory activity.

In order to assess the possible CMI mechanisms, its antinociceptive effect was determined in mice pre-treated with different antagonists using the glutamate test. Taking into account these results, we observed that the antinociceptive effect of CMI is probably due to modulation of the dopaminergic, adrenergic, opioid, serotonergic and noradrenergic systems, which make the CMI a multi-target molecule.

Previous studies have shown that the activation of dopaminergic neurotransmission induces antinociceptive effects (Ílkaya et al., 2014; Sari et al., 2014; Sousa et al., 2017). Thereby, antagonists of dopaminergic auto receptors have been proposed as drugs for the treatment of pain (Weil-Fugazza and Godefroy, 1993). According to Weil-Fugazza and

Godefroy (1993) and Tricklebank and Hutson (1984), when a noxious stimulus occurs, it accelerates dopamine turnover in the dorsal horn, with an increase in the dopaminergic activity descending pathways therefore the pain modulation occurs with the activation of dopaminergic receptors. Treatment with SCH23390 (a selective D₁ receptor antagonist) interacted in the CMI antinociceptive effect, suggesting the involvement of the dopaminergic system.

In addition to the inhibitory amino acids (GABA and glycine), acetylcholine and histamine, the monoamines (noradrenaline and 5-HT) are also related to thalamocortical excitability, being inhibitory modulators of descending pain. The activation of these descending pathways from the raphe nucleus to the dorsal horn, mediated by NA and 5-HT, are able to inhibit the transmission of pain (Fields and Basbaum, 1994; Bruning et al., 2014). Therefore, antidepressant compounds that modulate the serotonergic system, such as imipramine, are widely used in the treatment of pain (Fishbain et al., 2000; Duman et al., 2004). Our results are in agreement with this, since ondasetron (a selective 5-HT₃ serotonergic receptor antagonist), ketanserin (a selective 5-HT_{2A/2C} serotonergic receptor antagonist), WAY 100635 (a selective 5-HT_{1A} serotonergic receptor antagonist) and prazosin (a α_1 -adrenoreceptor antagonist) interacted in the antinociceptive effect of CMI in the glutamate test, suggesting the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems.

Adenosine also has an inhibitory effect on the central nervous system (CNS). Activation of this mechanism inhibits neuronal activity in many areas of the CNS, and consequently, can modulate the nociceptive descending pathway (Sawynok, 2011; Sawynok, and Liu, 2003). In the study, treatment with caffeine (a non selective antagonist at adenosine receptor) interacted in the antinociceptive effect of CMI. It suggests that the supposed action is related to a modulation of the adenosinergic system.

In parallel, involvement of the opiodergic system is also suggested in the pathophysiology of pain. The main commercial analgesic drugs have actions on the opioid receptors. Opioid analgesics activate opioid receptors, which stimulate cells to increase potassium conductance in postsynaptic neurons and decrease calcium input in presynaptic neurons (Jamison, 2015). By these mechanisms, the postsynaptic excitability and the presynaptic release of transmitters are reduced, so the sensation of pain is not transmitted (Golan et al., 2009). In the present study, treatment with naloxone (a non selective antagonist of opiod receptor) interacted in reversed the antinociceptive effect of CMI. It suggests that the antinociceptive action of CMI may be related with the modulation of the opiodergic system.

Moreover, the CMI alone and in combination with antagonists did not impair locomotor activity in the open-field test. This data is important since the alterations in the locomotor activity can interfere in the results of nociception tests (Walsh and Cummins, 1976; Capim et al., 2012).

The main classes of drugs indicated for the treatment of pain and inflammation are non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids (Woodcock et al., 2007). Thus, this is of great interest to seek a new multi-target drug, which is capable to interact simultaneously with these mechanisms. Overall, our results indicate that CMI is a multi-target compound, which is extremely relevant because single-target drugs may not always induce the desired effect to the entire biological system even if they successfully inhibit or activate a specific target. Thus, scientists have proposed the multi-target drug design concept (Csermely et al., 2005; Boran and Iyengar, 2010).

5. Conclusion

In summary, CMI presents antinociceptive and anti-inflammatory activities through the involvement of serotonergic, dopaminergic, noradrenergic, adenosinergic and

opioidergic systems. Also, this compound did not cause changes in the locomotor activity of animals. Suggesting that the CMI may be a new multi-target compound for the treatment of pain and inflammation.

Conflict of interest

No conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are gratefully acknowledged the financial support by Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Aanonsen, I.M., Wilcox, G.L., 1987. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243, 9-19.
- Bair, M.J., Wu, J., Damush, T.M., Sutherland, J.M., Kroenke, K., 2008. Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patient. *Psychosom Med.* 70, 890-7.
- Beirith, A., Santos, A.R., Calixto, J.B., 2002. Mechanism underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate in to the mouse paw. *Brain Res.* 924, 219-228.
- Boran, A.D., Iyengar, R., 2010. Systems approaches to polypharmacology and drug Discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 13, 297-309.
- Brod, L.M., Fronza, M.G., Vargas, J.P., Ludtke D.S., Luchese, C., Wilhelm, E.A., Savegnago, L., 2016. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside in the mouse tail suspension test. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.* 65, 201-207.
- Bruning, C.A., Prigol, M., Roehrs, M., Zeni, G., Nogueira, C.W., 2010. Evidence for the involvement of l-opioid and d-opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. *Behavioural Pharmacology.* 21, 621-626.
- Bruning 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. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 125, 15-20.
- Campbell, J.N., Richard, A.M., 2006. Mechanisms of Neuropathic Pain Review. *Neuron.* 55, 77-92.

- Capim, S.L., Carneiro, P.H.P., Castro, P.C., Barros, M.R.M., Marinho, B.G., Vasconsellos, M.L.A.A., 2012. Design, Prins-cyclization reaction promoting diastereoselective synthesis of 10 new tetrahydropyran derivatives and in vivo antinociceptive evaluations. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 58, 1-11.
- Casaril, A.M., Domingues, M., Fronza, M., Vieira, B., Begnini, K., Lenardão, E.J., Seixas, F.K., Collares, T., Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2017. Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice. *Journal of Psychopharmacology*. In Press.
- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D., 1999. Capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 398, 436-441.
- Choi, S.K., 2004. *Synthetic Multivalent Molecules: Concepts and Biomedical Applications*. Wiley-interscience. 44, 418-433.
- Cunha, A.C., Burke, T.N., Franca, F.J, Marques, A.P., 2008. Effect of global posture reeducation and of static stretching on pain, range of motion, and quality of life in women with chronic neck pain: a randomized clinical trial. *Clinics*. 63, 763-70.
- Csermely, P., Agoston, V., Pongor, S., 2005. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol Sci*. 26, 178-182.
- Duman, E.N., Kesim, M., Kadioglu, M., Yaris, E., Kalyoncu, N.I., Erciyes, N., 2004. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *Journal of Pharmacological Sciences*. 94, 161-165.
- Fields, H.L., Basbaum, A.I., 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation. Wall PD, Melzack R ed , Edinburgh. *Textbook of pain*. 3ed, Edinburgh.

- Fishbain, D.A., Cutler R.R., Rosomoff, H.L., Rosomoff, R.S., 2000. Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. *Pain Medicine*. 1, 310-316.
- Furstenberger, G., Csuk-Glanzer, B.I., Marks, F., Keppker, D., 1994. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis*. 15, 2823-2827.
- Gábor, M., 2000. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. Akadémia Kiadó. Methods in Molecular Biology, Budapest.
- Geldenhuys, W.J., Van der Schyf, C.J., 2013. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Drug Discov.* 8, 115-129.
- Golan, E. D., Ehrin, J.A., APRIL, W.A., Tashjian, A.H., 2009. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Guerra, A.S., Malta, D.J., Laranjeira, L.P., Maia, M.B., Colaço, N.C., Lima, M.C., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Silva, T. G., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1816-1822.
- Huang, S.M., Xiaoxin, L., Yu, Y.Y., Wand, J., Caterina, M.J., 2011. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Molecular Pain*. 7, 37-48.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 30, 103-114.
- Ílkaya, F., Bilge, S.S., Bozkurt, A., Duygu, B., Erdal, A., Çiftçioğlu, E., Kesim, Y., 2014. The antinociceptive effect of intravenous imipramine in colorectal distension-induced visceral pain in rats: The role of serotonergic and noradrenergic receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 122, 1-6.
- Jamison, R., 2015. Opioid Analgesics. *Clinic Proceedings*. 90, 957-968.

- Ji, R.R., Woolf, C.J., 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis.* 8, 1-10.
- Julius, D., Basbaum J., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413, 203-210.
- Junior-Viegas, C., Danuello, A., Silva, B., V., Barreiro, E.J., Fraga, C.A., 2007. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem.* 14, 1829-1852.
- Kaushik, N.K., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C.H., Verma, A.K., Choi, E.H., 2013. Biomedical importance of indoles. *Molecules.* 18, 6620-6662.
- López, I., Pérez, J.A., Garcia, S.M., Gil, A.A., Pérez, A.C., Romero, M.G., López, M., Villarroja, S., Conde, M.I., 2014. New melatonin-N,N-dibenzyl(N-methyl)amine hybrids: potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 57, 3773-3785.
- Martins, M.A., Bastos, L.C., Tonussi, C.R., 2006. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain.* 7, 100-107.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66, 355-474.
- Mujumdar, A.M., Misar, A.V., 2004. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 90, 1-5.
- Nogueira, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews.* 104, 6255-6285.
- Pereira, S.S., Lopes, L.S., Marques, S.B., 2010. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. *J Ethnopharmacol.* 129, 227-231.
- Pinz, M., Reis, A.S., Duarte, V., Rocha, V., Goldani, B.S., Alves, D., Savegnago, L., Luchese, C., Wilhelm, E.A., 2016. 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative

containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *European Journal of Pharmacology*. 780, 122-128.

Reich, H.J., Hondal, R.J., 2016. Why nature chose selenium. *ACS Chemical Biology*. 11, 821-841.

Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C., 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 6, 25-54.

Savegnago, L., Pinto, L.G., Cristiano, J.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 555, 129-138.

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

Sawynok, J., 2011. Caffeine and pain. *Pain*. 152, 726-729.

SBED, 2017. Pain impacts in the worldwide. [http://www.sbed.org.br/lermais_materias.php?cd_materias=171&friurl=_-Impactos-_\(accesed 04.07.17\)](http://www.sbed.org.br/lermais_materias.php?cd_materias=171&friurl=_-Impactos-_(accesed 04.07.17))

Sharma, V., Kumar, P., Pathaka, D., 2010. Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review. 47, 491-507.

Sousa, F.S.S, Anversa, R.G., Birmann, P.T, Souza, M.N., Balaguez, R., Alves, D., Luchese, C., Wilhelm, E.A, Savegnago, L., 2017. Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of α -(phenylalanyl) acetophenone. *Pharmacological Reports*, In Press.

Swingle, K.F., Reiter, M.J., Schwartzmiller, D.H., 1981. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 254, 168-176.

- Tricklebank, M.D., Hutson, M.D., Curzon, G., 1984. Involvement of dopamine in the antinociceptive response to footshock. *Psychopharmacology*. 82, 185-188.
- Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C., Dellaloggia, R., 1986. The croton-oil ear test revisited. *Agents Act*. 117, 347-349.
- Verma, M., Tripathi, M., Saxena, A.K., Shanker, K., 1994. Anti-inflammatory activity of novel indole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 29, 941-946.
- Vieira, B.M., Thurow, S., Brito, J.S., Perin, G., Alves, D., Jacob, R.G., Santi, C., Lenardão, E.J., 2015. Sonochemistry: An efficient alternative to the synthesis of 3-selanylindoles using CuI as catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*. 27, 192-199.
- Yang, A., Su S., Wang, H., Wang, N., Chen, Q., 2012. Neuronostatin induces hyperalgesia in formalin test in mice. *Neuroscience Letters*. 506, 126-130.
- Yaksh, T.L; Woller, S.A; Ramachandran, R.; Sorkin, L.S., 2015. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *Fprime Reports*. 7, 1-27.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull*. 83, 482-504.
- Weil-Fugazza, J., Godefroy, F., 1993. Dorsal and ventral dopaminergic innervation of the spinal cord: functional implications. *Brain Res. Bull*. 30, 319-324.
- Woodcock, J., Witter, J., Dionne, R.A., 2007. Stimulating the development of mechanism based, individualized pain therapies. *Nature Reviews*. 6, 703-710.
- Wood, P.B., 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother*. 8, 781-97.
- Woolfe, G., MacDonald, A.D., 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther*. 80, 300-307.
- Wrobel, J.K., Power, R., Toborek, M., 2016. Biological activity of selenium: Revisited. *UBMB Life*. 62, 97-105.

Legend of figures

Fig. 1. Chemical structure of 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole (CMI).

Fig. 2. Effect of CMI in nociception and in paw edema induced by formalin in mice. (A) neurogenic phase (0-5 min) (B) inflammatory phase (15-30 min) (C) paw edema induced by formalina. Values were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n=6-7) Abbreviations: (C) Control, (MLX) Meloxicam, (CMI) 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (One way ANOVA followed by Newman Keuls test).

Fig. 3. Effect of CMI in glutamate-induced nociception. Values were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6-7) Abbreviations: (C) Control, (MLX) Meloxicam, (CMI) 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole. (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (One way ANOVA followed by Newman Keuls test).

Fig. 4. Effect of CMI in hot-plate test. Values were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n= 6-7) Abbreviations: (C) Control, (MOR) Morphine, (CMI) 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole. (*) $P < 0.05$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (One way ANOVA followed by Newman Keuls test).

Fig. 5. Effect of CMI in ear edema induced oil croton. Values were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 6-7) Abbreviations: (C) Control, (MLX) Meloxicam, (CMI) 3-(4-chlorophenylselanyl)-1-methyl-1*H*-indole. (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (One way ANOVA followed by Newman Keuls test).

Fig. 6. Effect of pre-treatment of mice with (A) SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p. D₁ receptor antagonist) and (B) sulpiride (5 mg/kg, i.p. a D₂ and D₃ receptor antagonist) on the antinociceptive effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. (n=7). (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (control); (#) $P < 0.05$ when compared to CMI pretreated with vehicle.

Fig. 7. Effect of pre-treatment of mice with (A) WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p. a 5-HT_{1A} receptor antagonist), (B) ondansetron (0.5 mg/kg, i.p. a 5-HT₃ receptor antagonist) and (C) ketanserin (0.03mg/kg, i.p. a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist) on the antinociceptive effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. (n=7). (*) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (control); (##) $P < 0.01$ and (#) $P < 0.05$ when compared to CMI pretreated with vehicle.

Fig. 8. Effect of pre-treatment of mice with naloxone (non-selective antagonist at opioid receptors, 1mg/kg, i.p) on the antinociceptive effect of CMI (0.01 mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. (n=7). (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (control); (#) $P < 0.05$ compared to CMI pretreated with vehicle.

Fig. 9. Effect of pre-treatment of mice with caffeine (non-selective antagonist at adenosinergic receptors, 3 mg/kg, i.p) on the antinociceptive effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. (n=7). (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (control); (#) $P < 0.05$ when compared to the CMI pretreated with vehicle.

Fig. 10. Effect of pre-treatment of mice with (A) prazosin (antagonist α_1 receptor, 0.15 mg/kg, i.p.) and (B) yohimbine (antagonist α_2 receptor, 1 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive effect of CMI (0.01mg/kg, i.g.) in the glutamate test. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. (n=7) (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared to the vehicle treated group (control); (###) $P < 0.001$ when compared to CMI pretreated with vehicle.

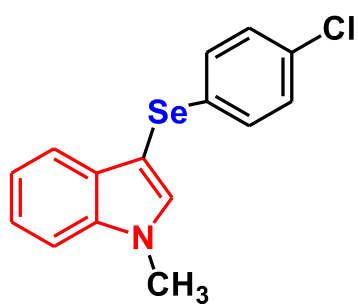
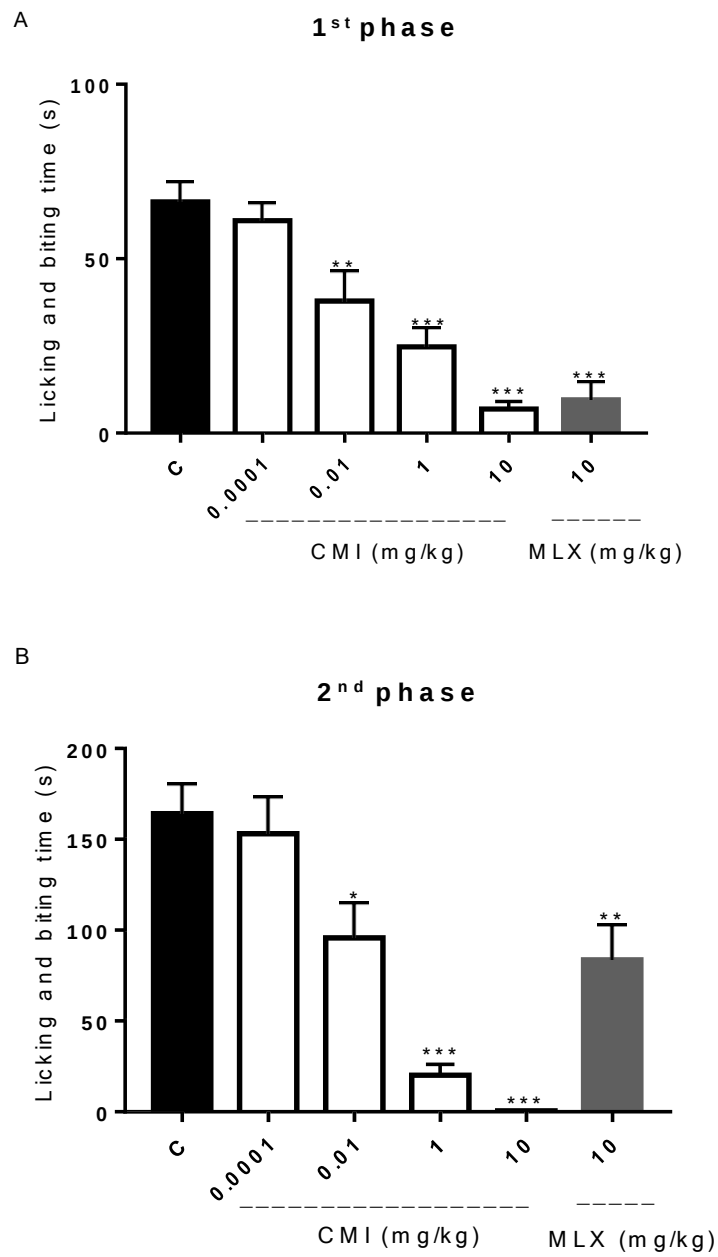
Figures**Figure 1.**

Figure 2.

C

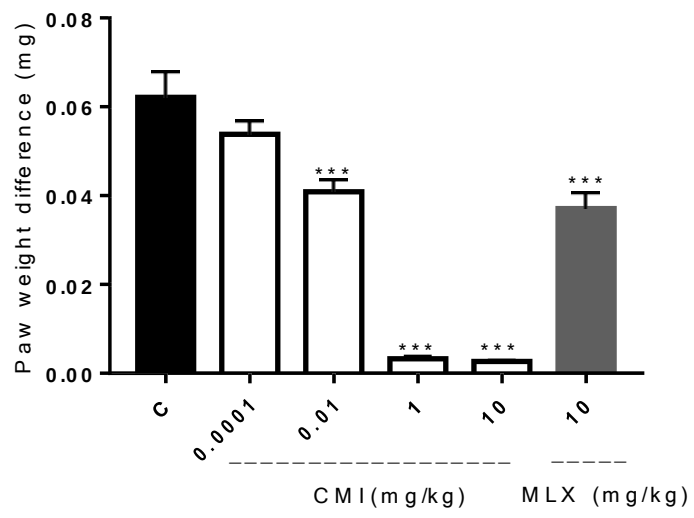


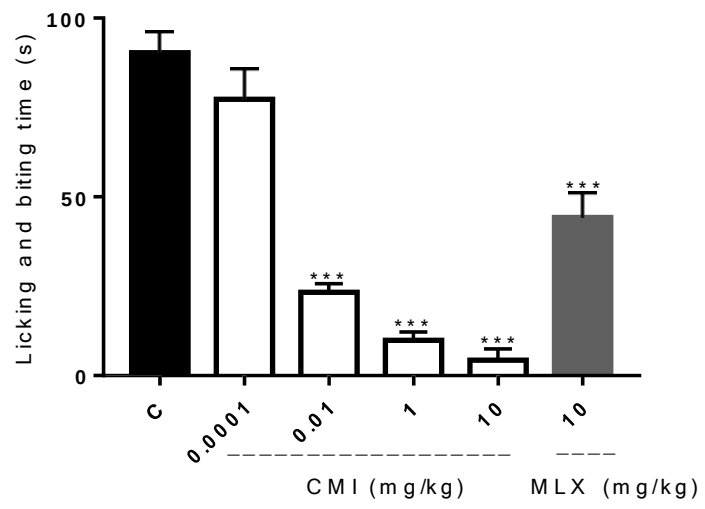
Figure 3.

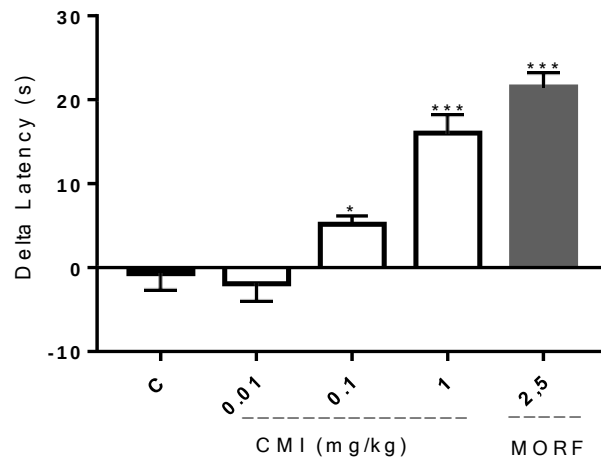
Figure 4.

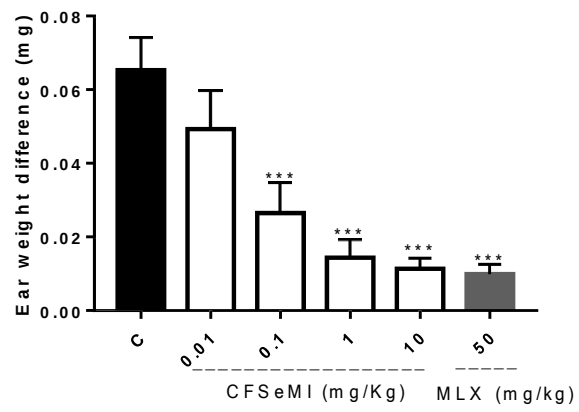
Figure 5.

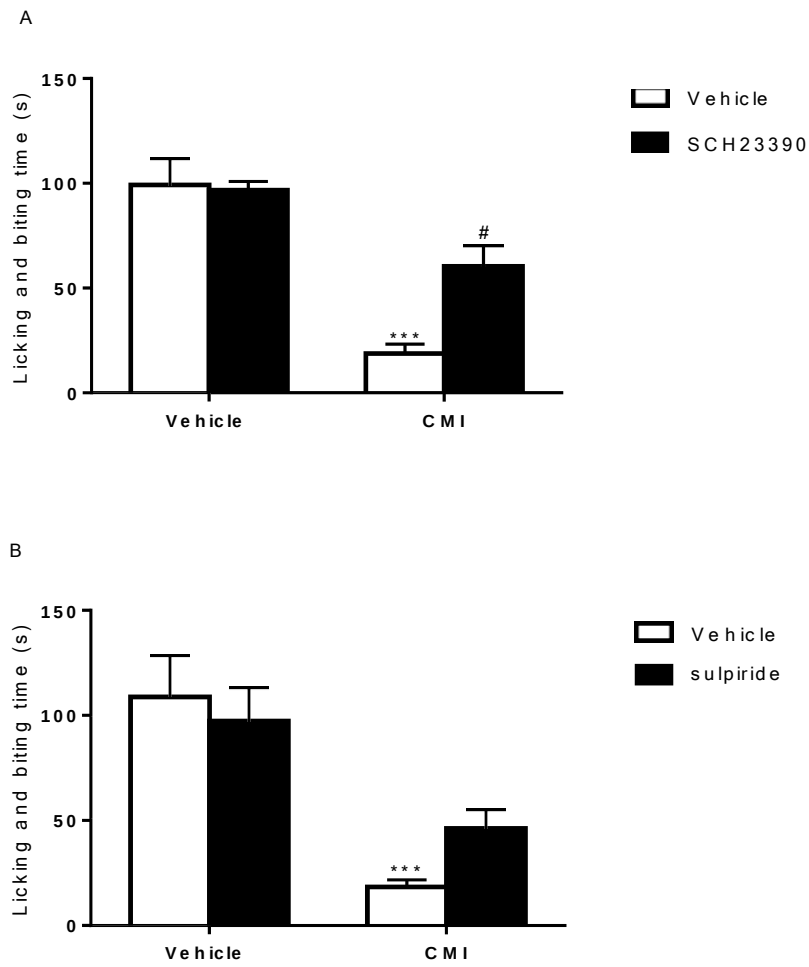
Figure 6.

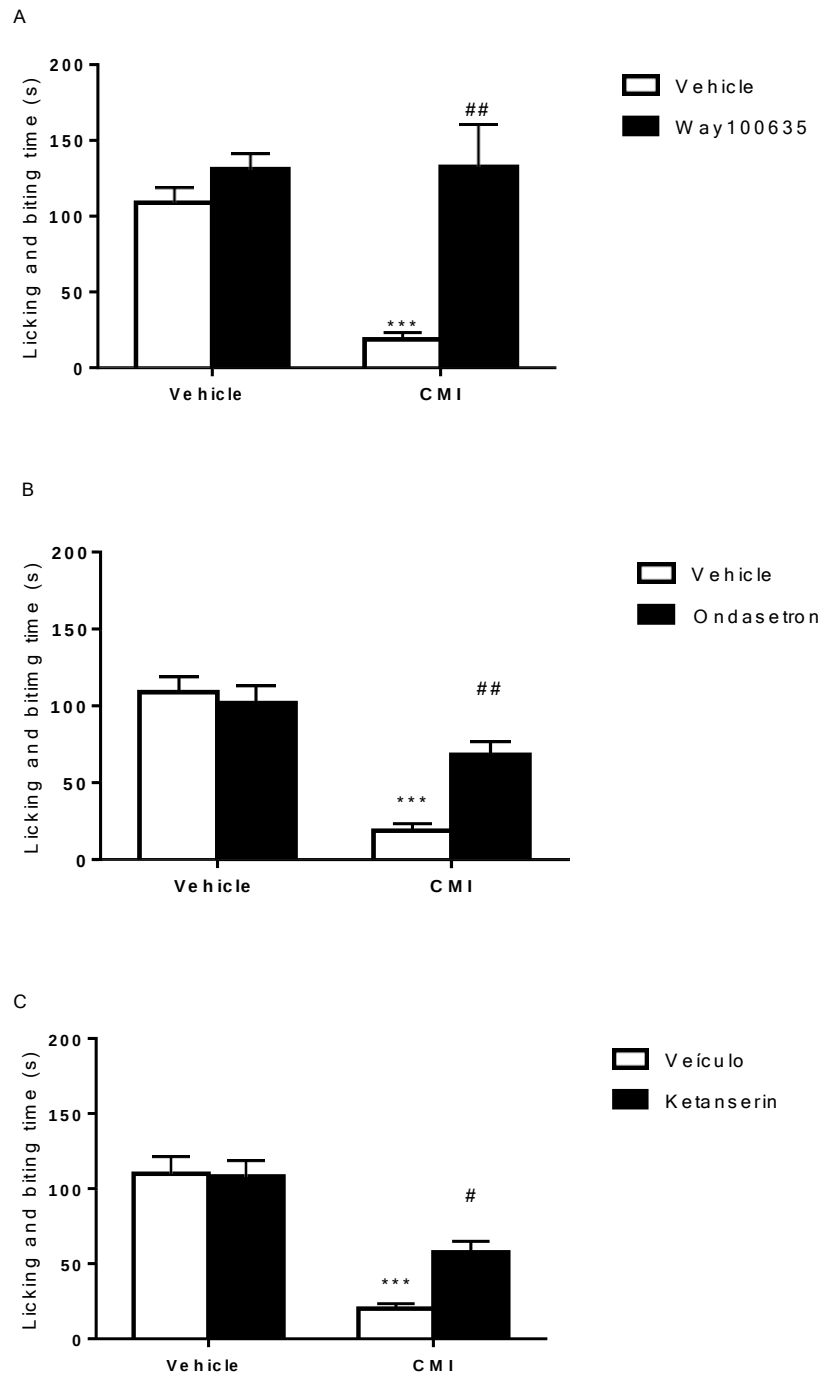
Figure 7.

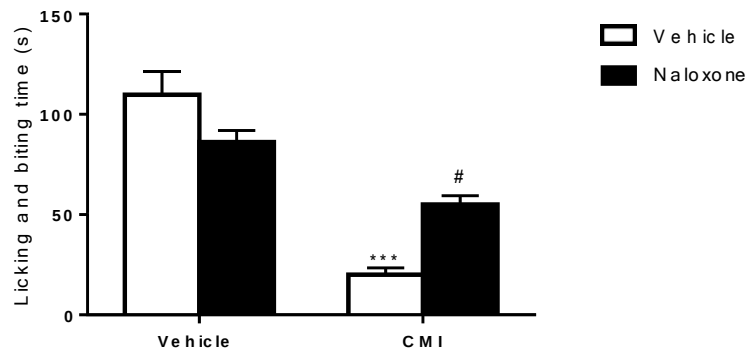
Figure 8.

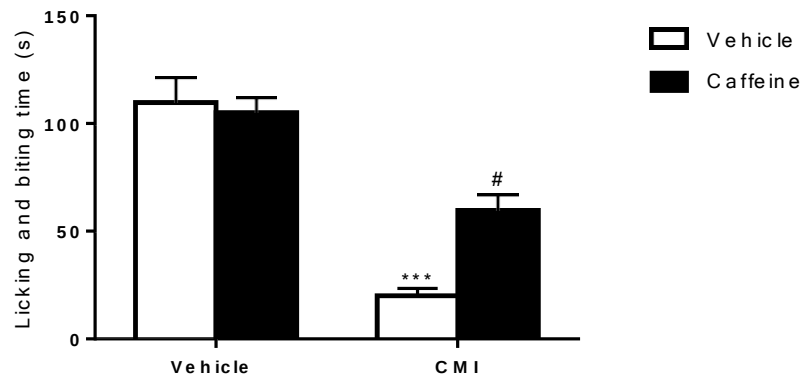
Figure 9.

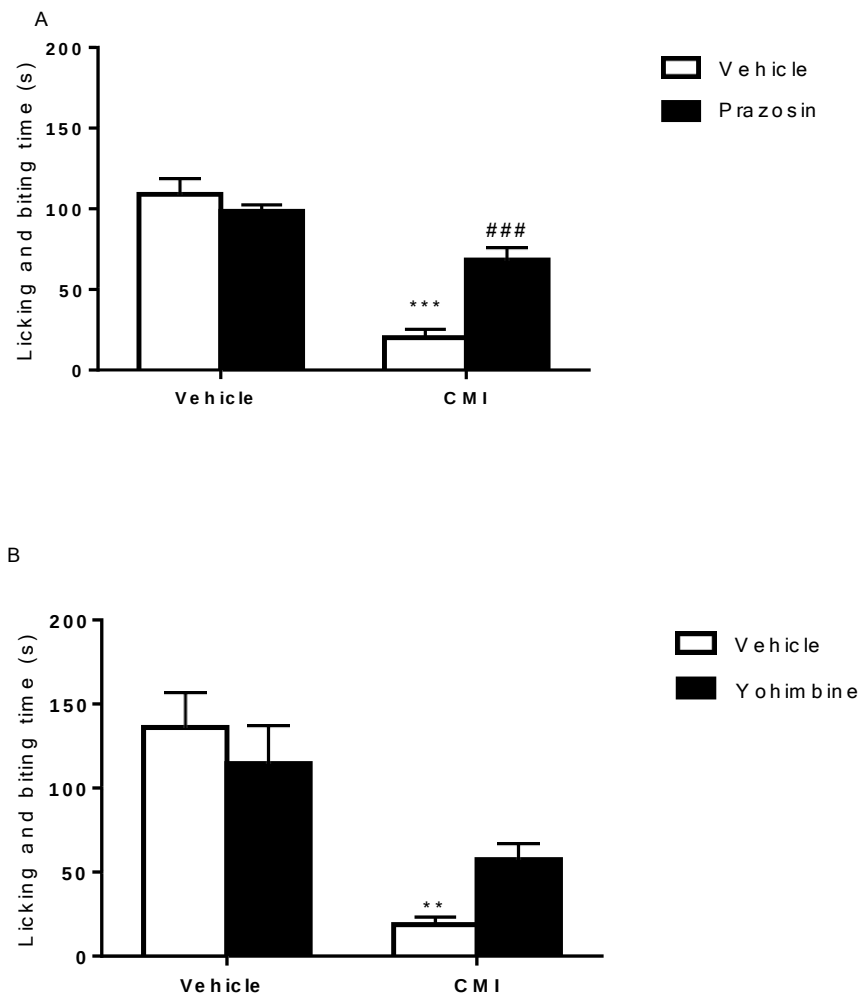
Figure 10.

Table 1. Effect of CMI on open-field test in mice.

Experimental groups	Number of crossings
Control	69.5 ± 11.4
CMI (0.0001 mg/kg)	69.5 ± 21.1
CMI (0.01 mg/kg)	75.8 ± 11.9
CMI (1 mg/kg)	77.1 ± 8.0
CMI (10 mg/kg)	76.5 ± 7.1

The effect of treatment with CMI behavior of mice in the open-field test, was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. Data presented are mean values ± S.E.M. (n= 8).

Table 2. Effect of administration of CMI and antagonists on behavioural parameters in the open field test in mice.

Experimental groups	Number of crossings
CMI (0.01 mg/kg)	75.8 ± 11.9
Vehicle (saline 0.9%)	81.0 ± 8.6
Ketanserin (0.3 mg/kg)	83.3 ± 20.0
Ketanserin + CMI	69.6 ± 10.6
Caffeine (3 mg/kg)	97.7 ± 17
Caffeine + CMI (0.01 mg/kg)	105.0 ± 8.05
Naloxone (1 mg/kg)	76.4 ± 12.0
Naloxone + CMI (0.01 mg/kg)	85.2 ± 7.8
Ondansetron (0.5 mg/kg)	86.8 ± 20.4
Ondansetron + CMI (0.01 mg/kg)	84.8 ± 8.7
Prazosin (0.15 mg/kg)	84.6 ± 16.0
Prazosin + CMI (0.01 mg/kg)	89.6 ± 19.5
SCH23390 (0.05 mg/kg)	71.1 ± 9.8
SCH23390 + CMI (0.01 mg/kg)	75.6 ± 9.8
Sulpiride (5 mg/kg)	100.0 ± 12.9
Sulpiride + CMI (0.01 mg/kg)	82.8 ± 17.9
Way 100635 (0.7 mg/kg)	84.6 ± 15.3
Way + CMI (0.01 mg/kg)	90.1 ± 18.6
Yoimbine (0.05 mg/kg)	72.3 ± 8.5
Yoimbine + CMI (0.01 mg/kg)	76.3 ± 13.6

The effect of mice behavioural on the open field test was determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Data presented are mean values ± S.E.M. (n= 6-8).

5. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos para avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de um composto contendo Se e núcleo indólico em sua estrutura, podem-se fazer algumas considerações.

Sendo assim, foi possível verificar o promissor efeito farmacológico avaliado de acordo com ensaios comportamentais em camundongos, onde se pode observar que o pré-tratamento realizado com o CMI nas doses de 0,01 a 10 mg/Kg apresentou ação antinociceptiva. Nesse contexto, resultados significativos foram obtidos, a partir da dose de 0,01 mg/Kg quando os animais foram submetidos aos testes de nociceptção induzido por agentes químicos (formalina e glutamato). Já quando considerado o teste da placa quente, o CMI apresentou efeito significativo no experimento, a partir da concentração de 0,1mg/Kg.

A atividade anti-inflamatória do CMI foi avaliada de acordo com modelos de indução de edema de pata induzido por formalina, e de orelha induzido por óleo de cróton. De acordo com os resultados obtidos, foram evidenciados que a partir da dose de 0,01 mg/Kg o CMI reduziu o edema de pata induzido por formalina. Já quando considerado o experimento de indução do edema de orelha por óleo de cróton, o composto na dose de 0,1 mg/Kg, apresentou efeito significativo.

Além disso, credita-se que o CMI seja uma molécula multi-alvo por envolver diferentes sistemas na sua ação antinociceptiva, como os sistemas dopaminérgico, serotoninérgicos, noradrenérgicos, adrenérgicos e opioidérgicos.

Nesse sentido, tendo em vista no que foi exposto, pode-se concluir que o CMI pode vir a se tornar uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de dor e inflamação.

6. PERSPECTIVAS

Levando-se em considerações os resultados promissores obtidos neste presente trabalho, outros estudos serão realizados com o CMI, como:

- Investigar a ação antialodínica e antihiperalgésica na dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático em camundongos;
- Verificar a ação antidepressiva em camundongos com dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático;

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM N.S.; EL-SEREG H.B.; HARTMAN C.; RICHARDSON P.; DESWAL A. Cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of myocardial infarction and cerebrovascular accident. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v. 25, p. 913-924, 2007.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZEZBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v. 1000. p. 40-56, 2004.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T.M. Em: Principles of Neuroscience. **New York**, p. 472-491, 2000.
- AKOPIAN, A.N. Regulation of the nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 12, p. 45-94, 2011.
- AZAD, G.K; TOMAR, R.S.; Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. **Molecular Biology Reports**. v.41, p. 4865-4879, 2014.
- BASBAUM, A.I; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, p. 267-284, 2009.
- BILEVICIUS, E.; KOLESAR, T.A.; KORNELSEN, J. Altered Neural Activity Associated with Mindfulness during Nociception: A Systematic Review of Functional MRI. **Brain Science**. v. 6, p. 1-12, 2016.
- BAIR, M.J.; WU, J.; DAMUSH, T.M.; SUTHERLAND, J.M.; KROENKE, J.M. Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patient. **Psychosomatic Medicine**. v.70, p. 890-897, 2008.
- BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesthesia e Analgesia**, v.105, p. 205-221, 2007.
- BRIDGESTOCK, C.; RAE, P.R. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v. 14, p. 480-483, 2013.
- BOSCH-MORELL, F.; ROMÁ, J.; MARÍN, N.; ROMERO, B.; RODRIGUEZ-GALITERO, A. Role of oxygen and nitrogen species in experimental uveitis: anti-inflammatory activity of the synthetic antioxidant ebselen. **Free Radical Biology and Medicine**. 33. p. 669-675, 2002.

- BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. **Journal of Thermal Biology**. v.31, p.208-219, 2006.
- BOURNE, S.; MACHADO, A.G.; NAGEL, S.J. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**. v. 25, p. 629-638, 2014.
- BOZIMOWSKI, G. A Review of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **AANA Journal Course**. v. 83, p. 425-433, 2015.
- BRIDGESTOCK, C.; RAE, P.R. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v. 14, p. 480-483, 2013.
- BROD, L.P.; FRONZA, M.G.; VARGAS, J.; LUDTKE, D.; BRUNING, C.; SAVEGNAGO, L. Modulation of PKA, PKC, CAMKII, ERK 1/2 pathways is involved in the acute antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside (OSX) in mice. **Psychopharmacology**. v. 234, p.717-726, 2017.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. v. 87, p. 1-5, 2000.
- CARDOSO, M.; SOUZA, S.P.; SANTOS, LIMA, K.S.C; OLIVEIRA, A.A.; REZENDE, C.M., FRANÇA, T.C.C.; LIMA, A.L.S. Degradation of phenylethylamine and tyramine by gamma radiation process and docking studies of its radiolytes. **Journal of the Brazilian chemical society**. v. 25, p. 1226-1236, 2014.
- CASARIL, A.M.; DOMINGUES, M.; FRONZA, M.; VIEIRA, B.; BEGNINI, K.; LENARDÃO, E.J.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice. **Journal of Psychopharmacology**. In Press, 2017.
- COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Review**. v. 24. p. 28-66, 1997.
- COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **Journal Allergy Clinical Immunologic**. v. 125, p. 53-72, 2010.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Estrutural e Funcional. 7ª ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2006.
- CUI, G.B.; AN, G.Z.; ZHANG, N.; ZHAO, M.G.; LIU, S.B, JI, L. Elevated interleukin-8 enhances prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. **Molecular Pain**. v. 12, p. 8-11, 2012.

- CUNHA, A.C.; BURKE, T.N.; FRANCA, F.J.; MARQUES, A.P. Effect of global posture reeducation and of static stretching on pain, range of motion, and quality of life in women with chronic neck pain: a randomized clinical trial. **Clinics**. v.63, p. 763-770, 2008.
- DE JONGH, R.F.; VISSERS, K.C.; MEERT, T.F.; BOOJI, L.H.; DE DEYNE, C.S.; HEYLEN, R.J. The role of interleukin-6 in nociception and pain. **Anesthesia and Analgesia**. v. 96, p. 1096-1103, 2003.
- DREWES, A.M, The physiology of pain. **Ugeskrift Laeger**. v. 168, p. 1941-1943, 2006.
- DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, p. 3760-3772, 2010.
- FABBRO, F.; CRESCENTINI, C. Facing the experience of pain: A neuropsychological perspective. **Physics of Life Reviews**. v.11, p. 540-552, 2013.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.; BAO, Y.; BROADLEY, M.R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J.E.; HURST, R. Selenium in human health and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 14, p.1337-1383, 2010.
- FERREIRA, S.H. Hiperalgesia inflamatória, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Revista Latino Americana de Dolor**. v.12, p. 6-17, 1995.
- FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**. 15. p. 29-58, 2001.
- GARLAND, E.L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care**. v. 39, p. 561-571, 2012.
- GUERRA, A.S.H.S.; MALTA, D.J.N.; LARANJEIRA, L.P.M.; MAIA, M.B.S.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; SILVA, T.G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. v. 11, p.1816-1822, 2011.
- GOLAN, David E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.
- GOUDET, C.; CHAPUY, E.; ALLOUI, A.; ACHER, F.; PIN, J. P.; ESCHALIER, A. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. **Pain**. v.137, p.112-124, 2008.
- HAYHURST, C.J.; DURIEUX, M.E. Differential Opioid Tolerance and Opioid-induced Hyperalgesia: A Clinical Reality. **Anesthesiology**. v. 124, p. 483-488, 2016.

- ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v.65, p.297-303, 1994.
- JANG, J.H.; NAM, T.S.; PAIK K.S.; LEEM, J.W. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. **Neuroscience Letters**. v. 360, p. 129-132, 2004.
- KADE, I.J.; BALOGUN, B.D.; ROCHA J.B. In vitro glutathione peroxidase mimicry of ebselen is linked to its oxidation of critical thiols on key cerebral sphydriyl proteins-a novel component of its GPx-mimic antioxidant mechanism emerging from its thiol-modulated toxicology and pharmacology. **Chemico Biological Interactions**. v. 206, p. 27-36, 2013.
- KARAASLAN, C.; KADRI, H.; COBAN, T.; SUZEN, S.; WESTWELL, A. D. Synthesis and antioxidant properties of substituted 2-phenyl-1*H*-indoles. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, p. 2671-2674, 2013.
- KAUSHIK, N. K.; KAUSHIK, N.; ATTRI, P.; KUMAR, N.; KIM, C. H.; VERMA, A. K.; CHOI, E. H. Biomedical importance of indoles. **Molecules**. v. 18, p. 6620-6662, 2013.
- KIELISZEK, M.; BLAZEJAK, S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. **Molecules**, v. 21, p. 1-16, 2016.
- KING, J.N.; DAWSON, J.; ESSER, R.E.; FUJIMOTO, R.; KIMBLE, E.F.; MANIARA, W.; MARSHALL, P.J.; O'BYRNE, L.; QUADROS, E.; TOUTAIN, P.L.; LEE, P. Preclinical pharmacology of rofecoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v.32, p.1-17, 2009.
- KLEIN Jr, L. C.; PASSOS, C. S.; MORAES, A. P.; WAKUI, V. G.; KONRATH, E. L.; NURISSO, A.; CARRUPT, P. A.; OLIVEIRA, C. M.; KATO, L.; HENRIQUES, A. T. Indole alkaloids and semisynthetic indole derivatives as multifunctional scaffolds aiming the inhibition of enzymes related to neurodegenerative diseases--a focus on Psychotria L. Genus. **Currents Topics in Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 1056-1075, 2011.
- KUDVA, A. K.; SHAY, A. E.; PRABHU, K. S. Selenium and inflammatory bowel disease. **American Journal of Physiologic Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 309, p. 71-77, 2015.

- KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.5, p. 1-6, 2002.
- LAMONT, L.A.; TRANQUILLI, W.J.; KURT, A.G. Physiology of pain. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, p.703-728, 2000.
- LINARES, D.M.; MARTÍN, M.C.; LADERO, V.;ALVAREZ, M.A.; FERNÁNDEZ, M. Biogenic amines in dairy products. **Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 51, p. 691-703, 2011.
- LIPNIK-STANGELJ, M. Mediators of Inflammation as Targets for Chronic Pain Treatment. **Mediators of Inflammation**. v. 13, p. 1-3, 2013.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. Protocol of IASP Basic Pain Terminologia. **Pain**. v.137, p.473-477, 2008.
- LOESER, J.D. What's to be done? Comments on Grabow. **The Clinical Journal of Pain**. v. 19, p. 384, 2003.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Pain**. v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- LÓPEZ-IGLESIAS; PÉREZ, J. A.; MORALES-GARCIA, S.; ALONSO-GIL, A.;PÉREZ-CASTILLO, A.; ROMERO, M. G.; LÓPEZ, M.; VILLARROYA, S.; CONDE, M. I. New melatonin-N,N-dibenzyl(N-methyl)amine hybrids: potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 57, p. 3773-3785, 2014
- JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v.413, p. 203-210, 2001.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Research**. v. 598, p. 271-278, 1992.
- MCHUGH, J.M.; MCHUGH, W.B. Pain: neuroanatomy, chemical mediators and clinical implications. **AACN Clinical Issues**. v.11, p. 168-178, 2000.
- MERTENS, P.; BLOND, S.; DAVID, R.; RIGOARD, P. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: A focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**. v. 61, p. 22-34, 2015.
- MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ Research**. v. 94, p. 276-82, 2004.

- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57. p. 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v.66, p. 355-474, 2002.
- MKHERJEE D. Does a coxib-associated risk limit the clinical use of the compounds as analgesic anti-inflammatory drugs? Arguments in favor. **Thromb Haemost.** v. 96, p. 407-412, 2006.
- MORO, A.V.; NOGUEIRA, C.W.; BARBOSA, N.B.V.; MENEZES, P.H.; ROCHA, J.B.T.; ZENI, G. Highly stereoselective one-pot producers to prepare bis- and trischalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. **Jounal of Organic Chemistry**. v. 70, p. 5257-68, 2005.
- MUGESH, G.; DU MONT, W.W.; SIES, H. Chemistry of biologically important Organoselenium compounds. **Chemical Reviews**. 101. p. 2125-2179, 2001.
- NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors -important modulators of nociception and pain behaviour. **Pain**. v.98, p. 1-8, 2002.
- NOGUEIRA, C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology.**Chemical Reviews**. v.104, p. 6255-6285, 2004.
- OLIVEIRA, C.M.B.; ISSY, A.M.; SAKATA, R.K. Fisiopatologia da dor pós operatória. **Revista Brasileira de Medicina**. v.11, p.415-418, 2010.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**. v.54 p. 581-618, 1998.
- PADILHA, G.; BIRMANN, P.T; DOMINGUES, M.; KAUFMAN, T.S; SAVEGNAGO, L.; SILVEIRA, C.C. Convenient Michael addition/ β -elimination approach to the synthesis of 4-benzyl- and 4-aryl-selenyl coumarins using diselenides as selenium sources. **Tetrahedron Letters**. v. 58, p. 985-990, 2017.
- PINZ, M.; REIS, A. S.; DUARTE, V.; DA ROCHA, M. J.; GOLDANI, B.S.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-Phenylselenyl-7chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive ad anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**. v. 780, p.122-128, 2016.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neuroscience**. v. 25, p. 319-325, 2002.

- RAJA, S; MEYER, R.A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL AND MELZACK'S **Textbook of Pain**. Stephen RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2007.
- ROCHA, J.B.T.; FRANCO, J.; DOS SANTOS, D.; RIGON, A.; FARINA, M.; DAFRE, A.; LEAL, R. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**. v. 1199. p. 138-147, 2008.
- ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**. v. 6, p. 25-54, 2014.
- SANMARTIN, C.; PLANO, D.; FONT, M.; PALOP, J. A. Selenium and Clinical Trials: New Therapeutic Evidence for Multiple Diseases. **Currents Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 4635-4650, 2011.
- SAVEGNAGO, L.; PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; ALVES, D.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyldiselenide: Evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, p. 129-18, 2007.
- SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; SANTOS, A.R.S.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyldiselenide in the formalin test. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.60. p. 1679-1686, 2008.
- SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAKA, D. Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review. **InterScience**. v. 47, p. 491-507, 2010.
- SHAVETA, P. SINGH, Structural optimization of indole based compounds for highly promising anti-cancer activities: Structure activity relationship studies and identification of lead molecules. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 74, p. 440-450, 2014.
- SOUSA, F.S.S.; ANVERSA, R.G.; BIRMANN, P.T.; SOUZA, M.N.; BALAGUEZ, R.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A.; SAVEGNAGO, L. Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of α -(phenylalanyl) acetophenone. **Pharmacological Reports**. In Press, 2017.
- SENKOWSKI, D.; HÖFLE, M.; ENGEL, A.K. Crossmodal shaping of pain: a multisensory approach to nociception. **Trends in cognitive sciences**, v. 18, p. 319-327, 2014.

- STEIN, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 179-189, 2013.
- STUCKY, C.L.; GOLD, M.S.; ZHANG, X. Mechanism of pain. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 98, p. 118745-11860, 2001.
- SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen - an anti-inflammatory antioxidant. **General Pharmacology**. v. 26, p. 1153-1169, 1995.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal antinflammatory drugs. **American Journal of Medicinal**. v. 104, p. 2-8, 1998.
- VASILEIOU, I.; GIAGINIS, C.; KLONARIS, C.; THEOCHARIS, S. Insight into pain-inducing and -related gene expression: a challenge for development of novel targeted therapeutic approaches. **Fundamental e Clinical Pharmacology**. v. 25, p. 48-62, 2011.
- VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & Therapeutics**. v.112, p.116-138, 2006.
- TAKASAGO, T.; PETERS, E.E.; GRAHAM, D.I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I.M. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with antiinflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **British Journal of Pharmacology**. 122. p. 1251-1256, 1997.
- VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A.S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**. v. 115, p. 213-220, 2015.
- VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & Therapeutics**. v.112, p.116-138, 2006.
- ZEILHOFER, H.U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**. v. 73. p. 165-174, 2007.
- ZHANG, B.; LI, B.J.B.; ZHANG, D.M.; DING,Y.; DU, G.H. Analgesic and antiinflammatory activities of a fraction rich in Gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.30, p.465-469, 2007.
- ZHOU, B. F.; STAMLER, J.; DENNIS, B.; MOAG-STAHLEBERG, A.; OKUDA, N.; ROBERTSON, C.; ZHAO, L.; CHAN, Q.; ELLIOTT, P. Nutrient intakes of middle-

aged men and women in China, Japan, United Kingdom, and United States in the late 1990s: the INTERMAP study. **Journal of Human Hypertension**.v. 17, p. 623-630, 2003.

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

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D; MAIER, S.F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 521, p.1-21, 2003.

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

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

WILES, M.E; WELBORN, R.; GOLDMAN, G.;HECHTMAN, H.B; SHEPRO, D. Tromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and ortic endothelium is regulated by CD18. **Inflammation**. v. 15, p. 181-197, 1991.

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

YAMAMOTO, T.; SAKASHITA, Y.; OZAKI-TAGUCHI, N. Anti-allodynic effects of oral COX-2 selective inhibitor on postoperativepain in the rat. **Canadian Journal Anesthesiology**. v.47, p.354-360, 2000.

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

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibiton: a double-edged sword? **Pharmacological Sciences**. v.28, p.459-464, 2007.

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO



Pelotas, 16 de maio de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo da ação antinociceptiva do 3-4(clorofenilselenil)l-metil-1H-indol em camundongos machos**", registrada com o nº23110.001873/2016-63, sob a responsabilidade de **Ethel Antunes Wilhelm e Lucielli Savegnago** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 09/05/2016. **Porém, indicamos a necessidade de prorrogação do prazo de execução por, pelo menos, mais um ano, considerando o número de animais e a disponibilidade de fornecimento pelo Biotério Central da UFPeI.**

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	17/05/2016 a 17/05/2017	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss	
Nº de animais	728	
Idade	60 dias	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central - UFPeI	

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 1873-2016).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____

ANEXO B - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

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

De: The European Journal of Pharmacology <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para: luciellisavegnago@yahoo.com.br

Enviadas: Terça-feira, 8 de Agosto de 2017 14:40

Assunto: Submission Confirmation for 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole: a multi-target anti-inflammatory and antinociceptive compound

Dear Dr. Lucielli Savegnago,

Your submission entitled "3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole: a multi-target anti-inflammatory and antinociceptive compound"(Research Paper) has been received by journal European Journal of Pharmacology

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

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.