

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIANA JUSSARA DO NASCIMENTO MALTA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE
DERIVADOS TIAZOLIDINÔNICOS
3,5-DISSUBSTITUIDOS

RECIFE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIANA JUSSARA DO NASCIMENTO MALTA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE
DERIVADOS TIAZOLIDINÔNICOS
3,5-DISSUBSTITUIDOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biologia Química para a Saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2011

Malta, Diana Jussara do Nascimento

Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos / Diana Jussara do Nascimento Malta. – Recife: O Autor, 2011.

131 folhas : fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Farmacologia 2. Química farmacêutica 3. Agentes anti-inflamatórios I. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

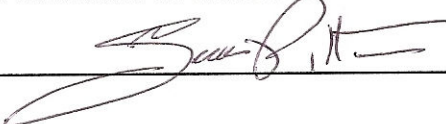
UFPE/CCB-2011-229

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGCB)

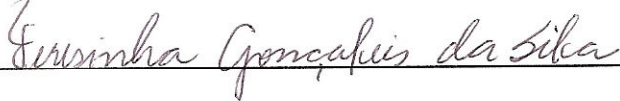
TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR DIANA JUSSARA DO NASCIMENTO MALTA **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

DEFENDIDA EM 02 DE MARÇO DE 2011 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta (orientador)
Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:  _____

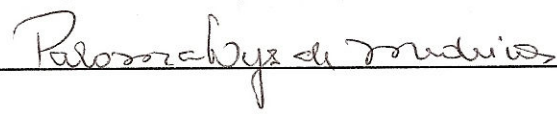
Examinador Externo: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (co-orientadora)
Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:  _____

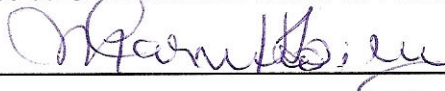
Examinador Externo: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:  _____

Examinador Externo: Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:  _____

Examinador Externo: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima
Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:  _____

Dedicatória

A minha Mãe Maria Regina do Nascimento Malta e ao meu Pai João Ramos Malta, pelo seu amor e
por terem sempre acreditado em mim.

A minha irmã Daniele do Nascimento Malta e minha sobrinha Luana Maria M. Malta Macêdo, por
tudo que elas representam para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos LPSF/UFPE – pela orientação e incentivo, além das oportunidades que me foram dadas para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (LBPF) por todo incentivo e ajuda. Por ter aberto as portas de seu Laboratório, para que fosse possível o desenvolvimento desse trabalho e principalmente por ter sempre acreditado em mim.

A Prof^a. Dr^a. Suely Lins Galdino do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos LPSF/UFPE pela oportunidade, disponibilidade e orientação

A Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos LPSF/UFPE pela disponibilidade e orientação.

A Adenilda Eugênia de Lima, secretária da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio, incentivo e dedicação.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos da (LBPF) e Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF).

A toda minha família, pelo amor, carinho e compreensão, principalmente pelo apoio que me foi dado.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, no qual sem eles esse projeto não teria avançado.

RESUMO

A reação inflamatória caracteriza-se como um mecanismo de defesa frente a agentes lesivos. No entanto, os processos de inflamação e reparo podem ser potencialmente danosos ao organismo quando sua intensidade ou duração ultrapassam o limite necessário para conter o agente agressor. O aumento na prevalência de doenças inflamatórias na população traz a necessidade contínua de novos e melhores fármacos que sejam tão potentes quanto os atuais e acarretem menos efeitos adversos, desta forma, inúmeros compostos tem sido alvo de estudo visando o desenvolvimento de novos fármacos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva de cinco derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos: LPSF/GQ-115 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona, LPSF/GQ-120 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilbenzilideno)tiazolidina-2,4-diona, LPSF/GQ-122 3-(2-bromo-benzil)-5-(2-cloro-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona, LPSF/GQ-125 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona, LPSF/GQ-192 3-(2,6-difluor-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona. Os derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos foram testados por via oral na dose de 3mg/kg. Para o estudo da atividade anti-inflamatória foi avaliado o potencial destes compostos em inibir a o edema, migração celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias, utilizando os testes de edema de pata, peritonite e bolsão de ar induzidos por carragenina. Os resultados obtidos no teste do edema de pata apresentaram-se entre 42% a 69%, para o teste do bolsão de ar a inibição da migração leucocitária variaram entre 70% a 60% e para o teste da peritonite induzida entre 51% a 67%. Os compostos que apresentaram melhores resultados quanto à inibição de TNF- α e IL-1 β foram LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192. No teste do bolsão de ar as concentrações de TNF- α no exsudato obtido foram às seguintes: controle (1096,47 pg/mL), LPSF/GQ-192 (239,88 pg/mL), LPSF/GQ-125 (416,86 pg/mL). A dosagem de IL-1 β indicou as seguintes concentrações: controle (870,96 pg/mL), LPSF/GQ-125 (691,83 pg/mL), LPSF/GQ-192 (338,84 pg/ml). Os exsudatos oriundos do teste da peritonite apresentaram os seguintes resultados referentes à concentração de TNF- α : controle (794,32 pg/mL), LPSF/GQ-192 (26,30 pg/mL), LPSF/GQ-125 (44,66 pg/mL). A dosagem de IL-1 β indicou as seguintes concentrações: controle (891,25 pg/mL), LPSF/GQ-125 (120,22 pg/mL), LPSF/GQ-192 (70,79 pg/mL). Para o estudo da atividade antinociceptiva realizou-se o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1%) e o teste da placa quente. O fármaco utilizado como padrão no teste de contorções abdominais foi o diclofenaco (10mg/Kg), enquanto que o fentanil (0,2 mg/Kg) foi utilizado no teste da placa quente. Os resultados para o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético foram: LPSF/GQ-115 (64%), LPSF/GQ-120 (58%), LPSF/GQ-122 (41%), LPSF/GQ-125 (58%) e LPSF/GQ-192 (51%). Os resultados obtidos no teste da placa quente indicaram que os compostos testados não apresentam ação central na inibição da dor. Desta forma, os resultados indicam que os derivados tiazolidinônicos testados apresentam atividades anti-inflamatória, e antinociceptiva promissoras, provavelmente através da modulação do sistema imune com a diminuição das principais citocinas pró-inflamatórias. Sugere-se que a atividade antinociceptiva dos derivados seja decorrente de mecanismos periféricos, atuando apenas na dor inflamatória.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória, atividade antinociceptiva, derivados tiazolidinônicos

ABSTRACT

Inflammatory reaction may be characterised as a defense mechanism against lesive ager Nevertheless both inflammatory processes and repair may be potentially harmful to the organism whenever its intensity or duration period exceeds the necessary limits to repress the aggressive agent. The increase of the prevalence of inflammatory diseases among populations conveys the continuous necessity for new and better medicines which tend to be even more powerful and cause even less adverse effects; hence countless compounds have been target of research aiming the development of new drugs. In this manner this article has had as main goal to analyze the anti-inflammatory and antinociceptive properties of five 3,5-disubstituted thiazolidinics derivatives: LPSF/GQ-115 3-(2-bromobenzyl)-5-(4-fluorobenzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, LPSF/GQ-120 3-(2-bromobenzyl)-5-(4-methylbenzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, LPSF/GQ-122 3-(2-bromobenzyl)-5-(2-chlorbenzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, LPSF/GQ-125 3-(2-bromobenzyl)-5-(4-methylsulfonylbenzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, and LPSF/GQ-192 3-(2,6-difluorbenzyl)-5-(4-methylsulfonylbenzyliden)-thiazolidine-2,4-dione. The anti-inflammatory action has been evaluated through different models: carrageenin-induced paw edema, air pouch and carrageenin-induced peritonitis. The results of the test paw edema induced by carrageenan showed values 42% to 69%, for air pouch test inhibition of leukocyte migration ranged from 70% to 60% and to test the carrageenan-induced peritonitis 51% to 67%. The compounds that showed better results regarding the inhibition of TNF- α and IL-1 β were LSPF/GQ-125 and LPSF/GQ-192. To the air pouch test concentrations of TNF- α in the exudates obtained were the following: control group (1096.47 pg / mL), LPSF/GQ-192 (239.88 pg / mL), LPSF/GQ-125 (416, 86 pg / ml). The dosage of IL-1 β indicated the following concentrations: control (870, 96 pg / ml), LPSF/GQ125 (691, 83 pg / mL), LPSF/GQ-192 (338,84 pg /mL).The exudates from the test peritonitis induced by carrageenan showed the following results for the concentration of TNF- α : control (794.32 pg / mL), LPSF/GQ-192 (26.30 pg / mL) e LPSF/GQ-125 (44.66 pg / mL). The dosage of IL-1 β indicated the following concentrations: control (891.25 pg / ml), LPSF/GQ-125 (120.22 pg / ml), LPSF/GQ 192 (70.79 pg / ml). The antinociceptive activity was evaluated trough the writhing test, induced by acetic acid 1% and the hot plate test. To the evaluation of the antinociceptive activity, the writhing test the results were: LPSF/GQ-115 (64%), LPSF/GQ-120 (58%), LPSF/GQ-122 (41%), LPSF/GQ-125 (58%) e LPSF/GQ-192 (51%). The results obtained in the hot plate test showed that both the compounds have no central action in pain inhibition. Thus, the results indicate that thiazolidinics derivatives tested exhibit activities antiinflammatory, antinociceptive and promising, probably through modulation of the immune system leading to a decrease in proinflammatory cytokines. It is suggestedthat the antinociceptive activity of the derivatives is due to peripheral mechanisms, acting only on inflammatory pain.

Keywords: Anti-inflammatory activity, antinociceptive activity, thiazolidinics derivatives.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptanina
5-LOX	5-Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BH4	Tetrahidrobiopterina
BK	Bradicinina
Ca	Cálcio
Cg	Carragenina
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
COX	Ciclooxigenase
DCs	Células Dendríticas
DMSO- <i>d6</i>	Dimetil sulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPCR	Receptores de Membrana Ligados À Proteína G
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
IC	Imunocomplexos
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitonal
KC	Quimiocinas

LB	Linfócitos B
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
LTs	Leucotrienos
LT	Linfócitos T
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MIP 2	Proteína Inflamatória de Macrófago-2
mL	Mililitro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NANC	Não-Adrenérgico-Não-Colinérgico
NK	Células Natural Killer
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PA	Pressão Arterial
PAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBS	Solução tampão fosfato
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaciclina
PMNLs	Leucócitos Polimorfonucleares
PPAr	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos
PPRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
SC	Sistema Complemento
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF	Fator Transformador de Crescimento
TLR	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2
TXS	Enzima Tromboxano Sintetase

TZDs

Tiazolidinadionas

v.o.

Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histamina	19
Figura 2: Serotonina	21
Figura 3: Produção de Prostanóides	23
Figura 4: Regulação Mediada por Cicloxigenase Via Ação Parácrina e Autócrina	24
Figura 5: 5-(4-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona	35
Figura 6: Tiazolidinadionas	37
Figura 7: 5-(2-cloro-arilideno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (1) e 5-(2-fluor-arilideno)-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona, apresentaram (2)	38
Figura 8: 5-arilideno-3-(4-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (3) e 5-arilideno-3-(4-bromo-fenacil)-tiazolidina-2,4-diona (4)	38
Figura 9: Derivado tiazolídínico 2-[4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno) metil] fenoxi]-N-[3-(triflurometil)- fenil] acetamida	39
Figura 10: 2-metil-3- <i>p</i> -toloil-tiazolidin-4-ona	39
Figura 11: 5-(4-metil-sulfonil-arilideno)- 3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-23)	40
Figura 12: (5Z,E)-3-2[-(4-clorofenil-2-oxoetil]-5-(1H-indol-3 ilmetileno)-tiazolidina-2 ,4-diona (PG-15)	41
Figura 13: 5-(3-metoxifenilideno)-2-3-fenilaminopropil-4-tiazolidinona	41

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 A Inflamação	18
3.1.1 Mediadores Químicos da Inflamação	19
3.2 Imunidade no Contexto da Resposta Inflamatória	28
3.2.1 Resposta Imune e Inflamação	28
3.3 Dor	30
3.3.1 Padrões e Tipos de Dor	31
3.3.4 Classificação de Dor por seu Mecanismo Fisiopatológico	31
3.4 Papel das Citocinas na Dor	32
3.5 PPAR	33
3.6 Atividade Biológica das Tiazolidinadionas	34
3.6.1 Atividade Hipoglicemiante	35
3.6.2 Efeitos Cardiovasculares das Tiazolidinadionas	36
3.6.3 Atividade Antimicrobiana	37
3.5.4 Atividade Antitumoral <i>in vitro</i>	38
3.6.5 Atividade Anti-Histamínica (Antagonista-H1)	39
3.6.6 Atividade Anti-inflamatória	39
REFERÊNCIAS	42

CAPITULO II

4 MANUSCRITO I

Thiazolidinics Derivatives 3,5-dissubstituted: Synthesis and Biological Activity *in vivo* and *in vitro*

57

5 MANUSCRITO II

Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects by the thiazolidinics derivatives 3,5-dissubstituted

71

6 MANUSCRITO III

Effects evaluation of the thiazolidinics derivatives 3,5-dissubstituted against carbon tetrachloride-induced liver injury

86

7. CONCLUSÕES

94

ANEXO A – Material e Métodos

95

ANEXO B– Resultados Complementares

102

ANEXO C – Normas do Periódico Molecules

119

ANEXO D – Normas do Periódico Archives of Pharmacal Research

126

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas eficazes, porém a incidência dos efeitos adversos em decorrência do seu uso crônico é alta. Entretanto, à medida que a fisiologia dos processos inflamatórios é elucidada surgem diversas estratégias para descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios, dirigidos ao controle de mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória.

O processo inflamatório é uma resposta vital provocada por patógenos, danos físicos, isquemia, injúrias tóxicas ou desordens autoimunes com o objetivo de proteger o organismo. A inflamação é um processo complexo, incluindo atividades conjuntas e freqüentemente opostas de vários tipos de células e dezenas de mediadores protéicos e lipídicos. A fase inicial da inflamação inclui mudanças no fluxo sanguíneo local e acumulação de várias células inflamatórias (neutrófilos, células dendríticas, monócitos, mastócitos e linfócitos). Posteriormente, patógenos e células inflamatórias precisam ser removidas e a integridade e funcionamento normal do tecido restaurado. No entanto, quando o equilíbrio entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocasionará o desenvolvimento de desordens inflamatórias crônicas e autoimunes, tais como doenças inflamatórias intestinais, artrite ou asma (SZÉLES et al., 2007).

Na busca de um novo candidato a agente terapêutico podemos destacar moléculas contendo o anel 4-tiazolidinona. Compostos que apresentam esse anel heterocíclico em sua estrutura, possuem grande interesse científico, pois diversos estudos descritos na literatura demonstram um amplo espectro de atividades biológicas dos seus diferentes derivados. Sugere-se que as diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas a grupos substituintes nas posições 2, 3 e 5 do anel, onde promovem modificações nos parâmetros físico- químicos e estruturais das moléculas (LIESEN et. al., 2008; VERMA; SARAF, 2008).

As tiazolidinas são um importante “scaffold” conhecidas por diversas atividades biológicas, como: atividade antimicrobiana, antituberculose, antihiperglicêmica, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, entre outras (VERMA; SARAF, 2008; GOUVEIA, et. al., 2009).

Uns dos alvos biológicos estudados intensamente nos últimos anos são os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR α). Esses formam uma subfamília da superfamília de receptores nucleares. Três isoformas codificadas por genes separados foram

identificados com PPAR α , PPAR γ e PPAR δ . Vários estudos demonstram que o receptor ativador de proliferação de peroxissomo gama (PPAR γ), desempenha um papel importante nos processos inflamatórios. Um dos ligantes sintéticos do PPAR são as tiazolidinadionas (troglitazona, ciglitazona, pioglitazona, rosiglitazona), os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (indometacina, fenoprofeno, ácido flufenâmico) e outros (ROMEIRO et al., 2007; SZÉLES et al., 2007).

Podemos destacar outros alvos biológicos como alternativa para a busca de novos fármacos. Segundo McChulloch et al (2006), fármacos que são capazes de bloquear as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na fisiopatologia de desordens inflamatórias como artrite reumatóide, oferecem outro caminho para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios.

Destacam-se também como uma nova classe de fármacos anti-inflamatórios os inibidores duais da lipoxigenase/cicloxigenase LOX/(COX), que bloqueiam simultaneamente a síntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. A inibição dos leucotrienos aumenta a eficácia anti-inflamatória em doenças reumáticas ao mesmo tempo em que se reduzem os danos gástricos (CHARLIER; MICHAUX, 2003).

Atualmente o processo inflamatório crônico pode ser tratado por diferentes intervenções terapêuticas, porém a busca de novos fármacos, tão eficazes quanto os atuais e com menos efeitos adversos, mostra-se justificável uma vez que a clínica médica não dispõe de substâncias terapêuticas com baixos efeitos colaterais para modificar e controlar os sinais e sintomas da inflamação, o que inclui melhoria da qualidade de vida da população acometida por doenças que envolvem processos inflamatórios crônicos.

Diante do exposto, este trabalho visa avaliar as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva de derivados tiazolidinônicos vislumbrando o desenvolvimento de novos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos derivados tiazolidínicos 3-5-dissubstituídos LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 e contribuir para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos eficazes para tratamento dos processos inflamatórios.

2.2. Específicos

- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192, utilizando modelos experimentais de inflamação aguda como bolsão de ar, peritonite e pleurisia induzidos por carragenina;
- Avaliar a atividade antiartrítica no modelo da artrite induzida por adjuvante completo de Freund;
- Determinar as concentrações do TNF α e IL-1 β no exsudato inflamatório de animais tratados com os derivados tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados tiazolidínicos 3-5-dissubstituídos LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192, utilizando os modelos experimentais de nocicepção induzida por ácido acético e teste da placa quente;
- Avaliar a toxicidade hepática dos derivados LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Inflamação

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares à lesão celular induzida por agentes biológicos, químicos ou mecânicos. O primeiro passo da inflamação é proteger o organismo com o objetivo de remover o estímulo lesivo, bem como iniciar o processo de reparação tecidual. Durante a inflamação tecidual normalmente há vasodilatação, aumento transitório da permeabilidade capilar, extravasamento de proteínas plasmáticas e edema. Envolve interações entre vários tipos de células e mediadores químicos (CUZZOCREA et al., 2005; PAULINO et al., 2009).

A inflamação pode ser de origem aguda ou crônica. O processo inflamatório agudo pode durar minutos, horas ou dias, independe da natureza do agressor e apresenta resposta semelhante a estímulos distintos (SIQUEIRA-JÚNIOR; DANTAS, 2000). A resposta inflamatória aguda é dividida em duas fases: a que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo é referida como primeira fase (0-1 hora), e se caracteriza pela liberação de histamina e serotonina; já a segunda fase, denominada fase tardia da inflamação aguda (1-6 horas após a lesão), é definida pela liberação de bradicinina e prostaglandinas onde as células inflamatórias se acumulam no local lesado ocasionando migração de neutrófilos e formação de fluidos protéicos (exsudato), sendo finalizado assim que o estímulo causador da injúria for removido e a liberação de mediadores químicos envolvidos no processo seja inibida (GARCIA-PASTOR et al., 1999; CRUZZOCREA, 2006; ZHANG, 2008). Deste modo, o objetivo da inflamação aguda é servir como aporte de defesa para o organismo, localizando a região agredida, para assim eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação, além de envolver uma série de eventos celulares e vasculares dinâmicos, bem coordenados que dependem da chegada de leucócitos inflamatórios para o local da lesão (KIRVESKARI, et al., 2003).

Porém, quando a resposta inflamatória escapa aos mecanismos de controle, desencadeando desordens inflamatórias, o processo passa a possuir características sistêmicas e provocar a disfunção de diversos órgãos e sistemas (GILROY, 2010). O processo inflamatório crônico tem duração prolongada que podem variar de semanas a meses, na qual há inflamação ativa, destruição tecidual, além de tentativas de reparo ocorrendo simultaneamente o que acarretará proliferação de fibroblastos e formação de granulomas. A inflamação crônica origina-se de infecções persistentes

por certos microrganismos, por exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos e de doenças auto-imunes (Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico) (GEPDIREMEN et al., 2004).

As desordens inflamatórias crônicas são uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos, assim, os processos envolvidos na defesa do hospedeiro na inflamação foram e continuam a ser objeto de vários estudos experimentais. Há uma complexa variedade de células envolvidas, tais como: neutrófilos, macrófagos, células mononucleares e diversas moléculas inflamatórias, tais como o óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ) e quimiocinas. O papel de vários mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, citocinas e óxido nítrico foram avaliados, e foi proposta uma contribuição para cada um desses mediadores (KEY et al., 1982; ADAMS e HAMILTON., 1984; MIYAZAKI et al., 2000; CUZZOCREA et al., 2005).

3.1.1 Mediadores Químicos da Inflamação

3.1.1.1 Aminas Vasoativas

- Histamina

A histamina é um mediador de baixo peso molecular cujas funções biológicas são mediadas por quatro receptores de superfície celular: H1, H2, H3 e H4 (Figura1). Destes, H1, H2 e H4 estão relacionados com o processo inflamatório e outras respostas imunes (ZHANG; THURMOND; DUNFORD, 2007). Esta amina é sintetizada por basófilos, mastócitos, linfócitos, neurônios e células gástricas (BOCHNER, 2000; AKDIS e SIMONS, 2006), cuja atuação ocorre nas fases iniciais da inflamação e apresenta um importante papel na inflamação alérgica (MACDONALD, 1996).

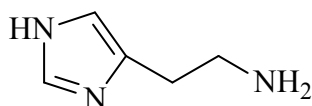


Figura 1: Histamina

No caso da inflamação alérgica, em resposta a um antígeno, serão gerados anticorpos da imunoglobulina E (IgE) que se ligam ao seu receptor na superfície de mastócitos. Esta ligação

desencadeará uma cascata de reações intracelulares culminando na desgranulação dos mastócitos, com a liberação de histamina armazenada nos grânulos, juntamente com triptase, leucotrienos e prostaglandinas, bem como outros mediadores (SANTOS et al., 2010; MAHDY, WEBSTER, 2008). Sua liberação pode ocorrer também devido a agentes desgranuladores, como componentes do sistema complemento, citocinas e neuropeptídeos (IDZKO et al., 2002). De acordo com Grega et al (1981), a histamina aumenta a permeabilidade vascular, atuando sobre as vênulas, levando ao aumento de extravasamento de proteínas plasmáticas por meio da abertura de lacunas endoteliais, sendo H1 o principal receptor envolvido no aumento da permeabilidade nos capilares. Os receptores H1 e H2 arteriulares estão envolvidos com a vasodilatação arteriolar (XAVIER; RIGHI; BERNANARDI, 2007). O receptor H4 apresenta uma elevada expressão na medula óssea, células hematopoiéticas periféricas, neutrófilos, eosinófilos e células T; expressão moderada no baço, timo, pulmão, intestino delgado, cólon e coração, de modo que sua ativação pela histamina promove o acúmulo de células inflamatórias, em particular eosinófilos e mastócitos, na área inflamada (NAKAMURA et al., 2000).

- Bradicinina

Dentre as cininas, peptídeos originados pela ação da enzima calicreína sobre o cininogênio, destacaremos um mediador produzido no plasma e em tecidos periféricos, denominado bradicinina (BK) (MEKI et al, 1995). Os receptores da bradicinina são divididos em dois tipos, o receptor B1 e o B2. O receptor B1 é característico em casos de dano tecidual e inflamação, tendo sua expressão regulada por fatores como as citocinas IL-12 e IL-1 β , enquanto o segundo é expresso de modo constitutivo (MARCEAU, 1995; ZHANG et al, 2007).

O receptor B2, apesar de ser constitutivo, também tem importante função nas fases iniciais da inflamação. A bradicinina atua sobre este receptor acarretando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua estimulação ocasiona também a produção de mediadores como o óxido nítrico e prostaglandinas como a PGE2. A bradicinina tem efeito algogênico ao agir estimulando tanto o receptor B1 como o B2 (GORLACH e WAHL, 1996; POMPERMAYER; ASSREUY; VIEIRA, 2002; EISENBARTH et al, 2004; JENKINS et al, 2003). O receptor B1 está envolvido na proliferação de eosinófilos na medulas óssea e sua migração para as vias aéreas na asma (VASQUEZ-PINTO et al, 2009). De acordo com Zhang e colaboradores (2007), a interleucina 1 β atua estimulando a expressão deste receptor.

- Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptanina, 5-HT) é sintetizada pelo L-triptofano nas células enterocromafins da mucosa intestinal é formada pela hidroxilação e descarboxilação do triptofano (GYERMEK, 1996). A serotonina é um neurotransmissor responsável pelo humor e pela ansiedade, e, quando é liberada na fenda sináptica, se liga a seus receptores localizados tanto na fibra pré-sináptica quanto na fibra pós-sináptica. A serotonina ligada aos seus receptores promove efeito através da abertura dos canais de Ca^{++} relacionados a essas proteínas (Figura 2). É um dos mais importantes mediadores vasoativos por aumentarem a permeabilidade vascular, dilatando os capilares e produzindo contração vascular no músculo liso. A maior parte da serotonina é armazenada no trato gastrintestinal e SNC (SIKANDER et al, 2009).

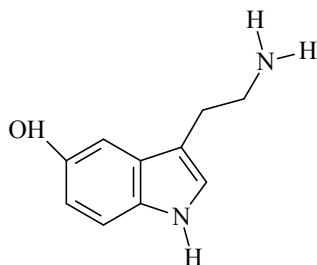


Figura 2: Serotonina

O sistema serotoninérgico tem uma variedade de subtipos de receptores. Estudos revelam que não existe um receptor específico para a 5-HT, mas uma superfamília de 14 receptores, denominados 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT5B, 5-HT6, e 5-HT7, com funções e localizações específicas nas áreas pré e pós-sinápticas (OLIVER, OORSCHOT, 2005).

Embora a serotonina promova a supressão da nocicepção na medula espinhal, também pode haver supressão no sistema periférico, onde a serotonina sensibiliza os nociceptores a estímulos térmico (LANG et. al., 1990; RUEFF, DRAY, 1993).

A serotonina também aumenta a excitabilidade das fibras C em segmentos isolados do nervo periférico (MOALEM et al., 2005). No sistema periférico, a serotonina não é liberada como um neurotransmissor pelos axônios terminais de neurônios serotoninérgicos, mas em uma doença inflamatória esse mediador é liberado pelas plaquetas e mastócitos de murinos (a serotonina não é

liberado pelos mastócitos humanos). Quando injetado na pata de ratos, induz a uma hiperalgesia provavelmente devido a uma ação sobre os receptores 5HT1A (TAIWO, LEVINE, 1992).

3.1.1.2 Derivados do Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico (AA) consiste em um ácido graxo de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A2 e apresenta um papel primordial na fisiologia celular, sendo ativado por diversos estímulos (químico, inflamatório, traumático e mitogênico). O AA é convertido pela prostaglandina (PG) G/H sintetase 1, denominada cicloxigenase (COX), nos compostos intermediários PGG2 e PGH2 (KUMMER, COELHO, 2002).

Em células de mamíferos as cicloxigenases (COXs) existem em pelo menos duas isoformas (COX-1 e COX-2). A COX-1 é uma enzima constitutiva, expressa em quase todo tipo de célula responsável pela produção de prostaglandinas (PGs), com função fisiológica, em diversos órgãos e tromboxano A2 nas plaquetas. COX-2, por outro lado, geralmente está ausente na maioria dos tecidos (com exceção dos rins, partes do cérebro e útero grávidico, onde a COX-2 é constitutiva), mas sua expressão pode ser facilmente induzida por numerosos estímulos como fatores de crescimento, promotores de tumor ou citocinas produzindo grandes quantidades de PGs, em particular PGE2 e PGI2, que são mediadores pró-inflamatórios que atuam aumentando a permeabilidade vascular e promovendo edema nos locais inflamados. É altamente expressa por células que estão envolvidas na inflamação (por exemplo, neutrófilos, macrófagos, monócitos, mastócitos, sinoviócitos), surgindo como a principal isoforma responsável pela síntese de prostanóides envolvidos nos processos patológicos, tanto manifestações agudas como em estados inflamatórios crônicos (GOMES et. al., 2009). Schonbeck e colaboradores (1999) descreveram a existência de uma terceira isoforma denominada COX-3, que ao contrário da COX-1 e COX-2, não produziria prostanóides pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias (Figura 3).

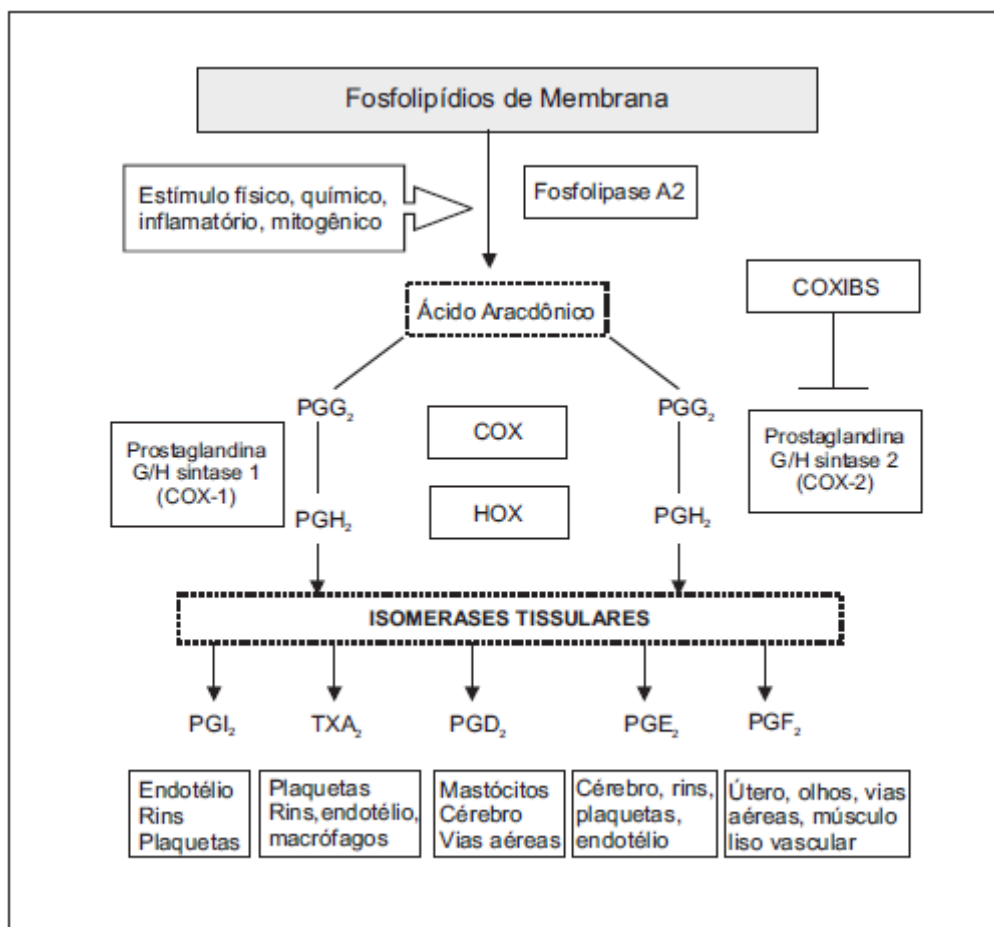


Figura 3: Produção de prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas) a partir do metabolismo do ácido araquidônico.

Legendas: COX = Ciclooxygenase; HOX = Hidroperoxidase; PG = prostaglandina; TX = tromboxano. Fonte: KUMMER, COELHO, 2002.

- Prostaglandinas

A enzima prostaglandina G/H sintetase dispõe de dois sítios catalíticos: o sítio cicloxigenase e o sítio peroxidase, onde o sítio cicloxigenase fará a conversão do AA em PGG₂, que posteriormente é reduzida ao intermediário instável, PGH₂, pelo sítio peroxidase, o qual não é inibido pelos AINES (BROOKS et al., 1999).

A PGH₂ é convertida pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos). O mecanismo das prostaglandinas (Figura 4) pode ser por meio de duas classes de receptores de forma parácrina ou autócrina: os receptores de membrana ligados à

proteína G (GPCR), e os receptores nucleares PPAR (receptores ativados proliferadores do peroxissoma) (KUMMER, COELHO, 2002; NAKAHATA, 2008).

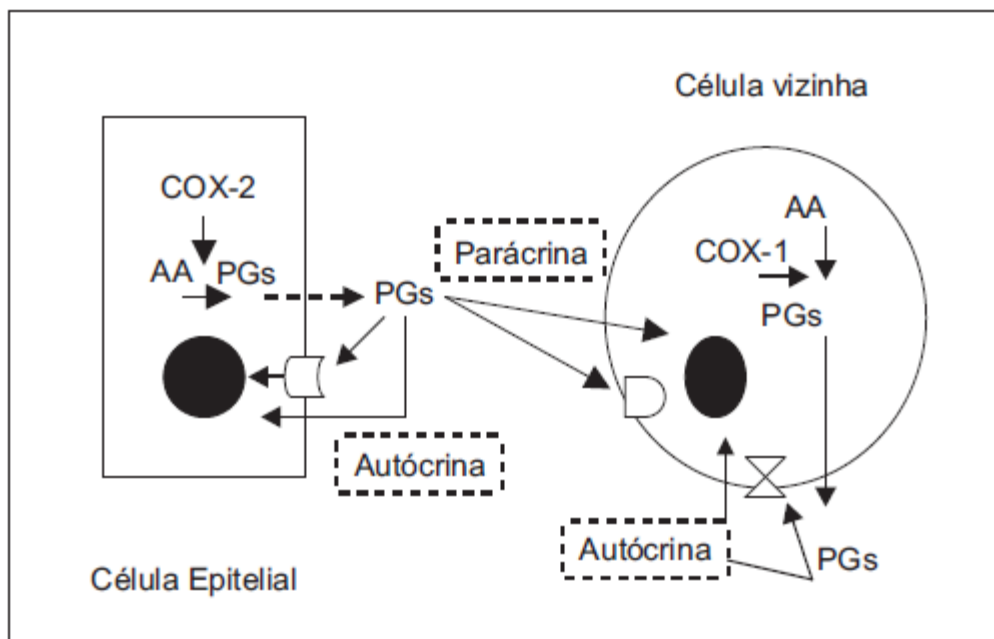


Figura 4: Esquema demonstrativo dos potenciais mecanismos envolvidos na regulação mediada pela ciclooxygenase via ação parácrina e autócrina. AA = ácido araquidônico; PGs = prostaglandinas. As PGS podem agir via receptor citoplasmático de membrana (acoplado à proteína G), ou via receptores nucleares PPARs. Para ativar os PPARs, as prostaglandinas podem agir diretamente do citoplasma para o núcleo, sem necessariamente ter que sair da célula. Fonte: KUMMER, COELHO, 2002.

- Tromboxanos

Outro prostanóide, produto da conversão da PGH₂, é o tromboxano A₂ (TXA₂), metabólito do ácido araquidônico produzido durante a catálise do AA pela COX a catálise do AA pela COX através da enzima tromboxano sintetase (TXS), é um dos mais potentes indutores da vasoconstrição e agregação plaquetária, acredita-se que desempenha um papel importante na patogênese da asma e dos distúrbios circulatórios, incluindo infarto do miocárdio, angina e acidente vascular cerebral (SATO, 1995; NAKAHAMA, 2008).

- Leucotrienos

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas responsáveis pela produção de leucotrienos (LTs). Entre as lipoxigenases existentes nos tecidos dos mamíferos, a 5-LOX é encontrada principalmente em células de origem mielóides, como por exemplo, leucócitos polimorfonucleares (PMNL), mastócitos, macrófagos e basófilos (GOMES et al, 2009).

O primeiro leucotrieno (LT) sintetizado é o LT A₄, a partir do qual se criam duas rotas metabólicas possíveis. Por um lado o leucotrieno B₄ e por outro, o grupo dos cistenil leucotrienos (LT C₄, LT D₄ e LT E₄), cuja ação ocorre ao se ligar aos receptores específicos cis-LT₁ e cis-LT₂ (VELASCO, OLIVA, 1999). O BLT-1, derivado do leucotrieno B₄, é um receptor de alta afinidade que regula a maior parte das ações quimioatrativas e pró-inflamatórias deste mediador. O BLT-2 é um receptor que apresenta baixa afinidade e se une a diferentes produtos da lipoxigenase, sendo sua função fisiológica pouco conhecida (HAZOURI, 2008).

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos de grande interesse em doenças inflamatórias (CUZZOCREA et al., 2003; WERZ, STEINHILBER, 2006; LEVAL et al., 2002; MOREAU et al., 2006) como asma, artrite reumatóide e doenças intestinais (WUBE et al., 2006). Os leucotrienos exercem um importante papel na inflamação, atuando como potentes agentes quimiotáticos, de modo a regular muitas reações inflamatórias e de hipersensibilidade. Estas moléculas são capazes de aumentar a produção de interleucinas e interferon, além de atuarem como moduladores das funções das células B e natural Killer (FERRER, 2000).

O LT B₄ pode ser encontrado em muitos exsudatos inflamatórios. Ao atuar sobre os receptores, produz adesão, quimiotaxia de PMN e macrófagos além de aumentar a produção de citocinas como a IL-6, relacionada com destruição tissular, por parte dos monócitos, e a IL-5, a partir dos linfócitos T (AMATLLER; ANTEZANA, 2007; BECA; HERNÁNDEZ; BASCONES, 2007), agindo também como agregante plaquetário (RIVER-RAMÍREZ; MENDONZA-MAGAÑA; RACETTE, 2008). Participa ainda, de maneira importante na sensibilização das terminações nociceptivas frente a estímulos dolorosos (FAJARDO; LINARES; OLAYA, 2001).

Os leucotrienos LT C₄, LT D₄ e LT E₄ são importantes broncoconstritores que atuam como mediadores nas reações alérgicas (RIVER-RAMÍREZ; MENDONZA-MAGAÑA; RACETTE, 2008). O LT C₄ e o LT D₄ que agem ainda como constritores das células musculares lisas e de vasos sanguíneos. Os cistenil leucotrienos possuem outras funções como estimulação da secreção de muco, assim como aumento da permeabilidade vascular e do extravasamento plasmático (ocasionando edema), apresentando também, interações complexas com outros mediadores inflamatórios, contribuindo, desta forma, para a manutenção da inflamação (AMATLLER; ANTEZANA, 2007; STABLES e GILROY, 2010).

3.1.1.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é produzido por três formas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que incluem a NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2), e a NOS endotelial (eNOS ou NOS3). Estas enzimas catalisam a formação do óxido nítrico e L-citrulina pela oxidação da L-arginina na presença de co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo (FMN), tetrahidrobiopterina (BH4) e doadores tiol (KARPUZOGLU, AHMED, 2006).

Fisiologicamente, o óxido nítrico apresenta diversas funções, podendo atuar como regulador da pressão sanguínea (PERSSON et al., 1992), agir como neurotransmissor NANC (não-adrenérgico-não-colinérgico) promovendo o relaxamento da musculatura lisa brônquica e gastrointestinal, bem como a ereção peniana. Embora apresente importante papel na regulação de processos fisiológicos em mamíferos, este mediador está intimamente relacionado com o processo inflamatório (REED, 1997).

Sob o estímulo apropriado, células como macrófagos, condrócitos, miócitos cardíacos, neutrófilos, hepatócitos, células renais e fibroblastos podem expressar iNOS (KNOWLES, MONCADA, 1994; CIRINO, 1998). Estes estímulos podem ser o lipopolissacarídeo (LPS), assim como de uma série de citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β , interferon- γ e interleucina-2 (IL-2) (KUO, SCHROEDER, 1995; SZABÓ, THIEMERMANN, 1995). Neste caso, o óxido nítrico ocasiona dilatação dos vasos sanguíneos e promove aumento da permeabilidade vascular, o que resulta na formação de edema.

Além disso, o óxido nítrico aumenta a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, prostaglandinas, como PGE2 e espécies reativas de oxigênio, proporcionando, desta forma, a promoção da reação inflamatória (OMOTE et al., 2001; RAWLINGSON, 2003; SAUTEBIN et al., 1998).

De acordo com Ross e Reske-Kuns (2001), a ação pró-inflamatória do óxido nítrico representada pela vasodilatação e recrutamento de neutrófilos ocorre quando está em baixas concentrações, ao passo que em altas concentrações reprime moléculas de adesão, suprime a ativação e induz a apoptose de células inflamatórias, como neutrófilos.

3.1.1.4 Citocinas

As citocinas caracterizam-se como um imenso grupo de moléculas que atuam crucialmente no processo inflamatório e em outros processos, sendo produzidas principalmente por macrófagos, após estimulação, por toxinas, lesão ou mediadores inflamatórios. As quimiocinas e interleucinas fazem parte deste grupo, que se caracteriza por apresentar meia-vida curta, modulação da resposta imune, interação com outras citocinas, assim como reconhecimento por receptores específicos (ZHANG, 2008).

O conjunto inicial de reações que caracteriza a fase aguda do processo inflamatório é mediado primariamente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) no tecido lesado. Dentre estas citocinas, particularmente o TNF- α e a IL-1 β iniciam a cascata inflamatória (UHLAR et al., 1997). Merecem destaque as citocinas anti-inflamatórias que contribuem para o equilíbrio da resposta inflamatória, como por exemplo TGF β , IL-10, IL-4 e IL-5 (FRANKE et al, 2002).

O Fator de necrose tumoral (TNF- α) foi inicialmente identificado pela capacidade de induzir necrose hemorrágica em certos tumores e pela capacidade de levar a caquexia durante os estados de infecção crônica (CARSWELL et al, 1975). Trata-se de um agente quimiotático para neutrófilos e monócitos, estimula a fagocitose, adesão ao endotélio e produção de superóxido por estas células, além de estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como as quimiocinas KC e MIP 2 (CAMUSSI, 1991; ZHANG, 2001). O TNF- α também está intimamente relacionado com a promoção de hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2007). Pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos (BINGHAM, 2002). A presença de lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias gram-negativas é o principal estímulo para sua produção (LINO et.al, 1990). Logo após sua liberação o TNF- α irá se ligar a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito no organismo. Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los.

A interleucina 1 (IL-1 β) pode agir tanto no sistema imunitário como em outros, como por exemplo no sistema nervoso (SPULBER; SCHULTZBERG, 2010). Produzida por neutrófilos e monócitos/macrófagos, atua como importante desencadeador da migração leucocitária (BENINCÁ et al., 2007). É uma das responsáveis por induzir a expressão da molécula de adesão ICAM-1. Além de estar relacionada à pirogenicidade, é responsável pela síntese de outras citocinas como IL-6 pelos monócitos, atuando sinergicamente com o TNF- α (LEMAY et al, 1990). Juntamente com o

fator de necrose tumoral (TNF- α) atua na promoção da hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2007).

IL-1 β e TNF- α apresentam inúmeras funções em todo organismo, muitas das quais são importantes no desenvolvimento da artrite reumatóide (FELDMAN et. al, 1996; GABAY e AREND, 1998; CHARLES et. al., 1999). Tanto a IL- 1 quanto o TNF- α ativam uma variedade de tipos de células encontradas na articulação inflamada, incluindo macrófagos, sinoviócitos, condrócitos e osteoclastos, resultando na liberação de outros mediadores pró-inflamatórios. Ambas estimulam a proliferação das células sinoviais levando à formação de pannus e influenciam na atividade imunológica (BINGHAM, 2002). Neste contexto, o controle terapêutico da inflamação via inibição de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β se faz necessário uma vez que estudos comprovam o papel crucial dessas citocinas na mediação da fase aguda da inflamação e na inflamação sistêmica.

3.2 Imunidade no Contexto da Resposta Inflamatória

O sistema imunológico gerencia a defesa do organismo contra patógenos e antígenos. A resposta imune pode ser classificada em dois sistemas funcionais, que são mais ou menos distintos: a imunidade inata e a adquirida. Estes dois sistemas atuam em conjunto e de maneira interdependente (JANEWAY et al., 2005b). Parte da resposta inflamatória está diretamente relacionada ao recrutamento de células do sistema imune inato. Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) são as principais células efetoras, enquanto que os principais mecanismos na imunidade inata são a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento (SC), bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. (MEDZHITOV et al, 1997).

3.2.1 Resposta Imune e Inflamação

A primeira linha de defesa do organismo é a pele e outras barreiras anatômicas à invasão. Estas incluem as lágrimas, mucos e os cílios no trato gastrointestinal e respiratório, entretanto se o agente infeccioso penetra as barreiras anatômicas há o início de uma inflamação aguda, a partir desse ponto entra em ação fatores humorais que são importantes na inflamação associada a desordens inflamatórias.

O Sistema complemento (SC) é mecanismo de defesa importante que induz ao recrutamento de células fagocitárias e marcação de agentes patogênicos para destruição. Cada um dos

componentes ativados no SC passa a ter atividade proteolítica, e assim os elementos seguintes são ativados em cascata. Durante processo, ocorre a produção de diversos mediadores que induzem a permeabilidade vascular e colaboram para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Finalmente, ocorre formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que promove a lise osmótica da célula-alvo, favorecendo a eliminação do agente infeccioso (CRUVINEL, et al, 2010).

Em meio às células participantes do processo inflamatório, algumas (células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais), estão normalmente presentes nos tecidos, enquanto outras (plaquetas e leucócitos) têm acesso a partir do sangue. Os leucócitos são células móveis e são divididas em duas classes: células polimorfonucleares e mononucleares (RANG, DALE, 2007)

Os neutrófilos polimorfonucleares são os leucócitos polimorfonucleares (PML) mais abundantes no sangue periférico, com importante papel na fase inicial das reações inflamatórias. São sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Os neutrófilos entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como a IL-8, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas (REAVES et al, 2005).

As células mononucleadas denominadas monócitos constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos dão origem a macrófagos e células dendríticas mielóides. Os monócitos e macrófagos são fagócitos hábeis, engolfando patógenos e debris celulares. Diferentemente dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos, operando como verdadeiras sentinelas. Além de seu papel na imunidade inata, eles contribuem para o reparo do tecido e podem apresentar antígenos para os elementos do sistema imune adaptativo (ABBAS e LICHTMAN, 2008).

Durante o processo inflamatório, os macrófagos agem como células apresentadoras de antígenos (APCs), potencializando a ativação de linfócitos T (LT) e linfócitos B (LB) pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO) (HEYWORTH et al, 2003).

Outro importante evento inicial a resposta imunológica inata é o reconhecimento, pelos receptores de reconhecimento padrão (PPRs) ou toll, presentes em macrófagos teciduais, de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) específicos nos microrganismos (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; JANEWAY, 2002; CRUVINEL, et. al, 2010).

Dentre os PPRs, os receptores Toll-like (TLR) estão em evidência pelo desempenho na ligação de patógenos e iniciação da resposta inflamatória (COUTINHO, 2003).

Os receptores Toll-like são divididos em duas categorias de grupos de receptores de membrana. Os receptores Toll-like tipo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13 são tipicamente associados com a membrana da superfície celular. Por outro lado, os receptores tipo TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados primariamente nas membranas endossômicas (VEGA e MARTÍN, 2008). Estão situados em diferentes células do organismo mamíferos, mas, sobretudo nas células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas (DCs) (HALLMAN, 2001). A ativação desses receptores por PAMPs induz a fagocitose e a liberação de citocinas e mediadores químicos que atuam no sistema imune (BARTON, 2002).

Participam também da imunidade inata as células *Natural Killer* (NK) que têm origem na medula óssea, a partir de um progenitor comum aos LTs, constituindo de 5% a 20% das células mononucleares do sangue é um tipo especializado de linfócito. São uma importante linha de defesa inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais. Ademais, recrutam neutrófilos e macrófagos, ativam as células dendríticas e linfócitos T e B (CERWENKA e LANIER, 2001).

Na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos. Estas células são primeiramente produzidas no timo ou na medula óssea, depois sofrem amadurecimento nos órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas), para então serem liberadas durante a resposta imune (PARSLOW, 2000). Os linfócitos T efetores (maduros), quando chegam ao local da injúria liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α) e quimiocinas. Estas são responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

3.3 DOR

De acordo com a Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tissular presente ou potencial”. A percepção da dor envolve dois componentes: o estímulo doloroso (nocicepção) e a reação emocional. A dor tem um valor biológico fundamental, alerta o indivíduo sobre a ocorrência de alguma forma de lesão orgânica instalada ou em vias de se instalar. Em condições normais, a informação sensorial é captada por estruturas do sistema nervoso periférico (SNP) e transmitida ao sistema nervoso central (SNC). Nestas estruturas, neurotransmissores diferentes realizam a função bioquímica de transmitir a dor (DAUDT et al., 1998).

A dor é transmitida a partir de nociceptores encontrados na pele e vísceras que podem ser acionados por vários estímulos, como por exemplo, dano tecidual, inflamação ou lesão do sistema nervoso, onde a resposta pode ser modulada por meio da ação de prostaglandinas, cininas, catecolaminas, íons H^+ , K^+ e substância P (um neurotransmissor específico das fibras condutoras do estímulo doloroso). Esses estímulos são conduzidos por meio de dois tipos de fibras nervosas (fibras A- δ e C) até o corno dorsal da coluna espinal, onde realizam sinapses com interneurônios medulares, podendo ser modulados por peptídeos opióides. Da medula espinal, os estímulos dolorosos percorrem os tratos espinotalâmicos e espinoreticulares, alcançando estruturas nervosas centrais (formação reticular, tálamo, sistema límbico, córtex cerebral), onde são modulados novamente via receptores opióides (SERPELL ET AL, 1998).

3.3.1 Padrões e Tipos de Dor

Embora existam aspectos comuns, entre dor aguda e dor crônica, a avaliação e intervenção entre as mesmas deve ser diferente. Os relatos de dor aguda têm ênfase nas características da dor, nas repercussões biológicas da dor e do alívio, enquanto os relatos de dor crônica enfatizam, além destes, aspectos psicossocioculturais que devem ser incluídos (BRASIL, 2002).

3.3.2 Dor Aguda

A dor aguda tem início repentino relacionado a traumas, infecções ou inflamação. Espera-se que desapareça após intervenção da causa, por exemplo, cura da lesão, imobilização ou em resposta a medicamentos. Respondem rapidamente às intervenções e não costumam ser recorrentes, estando associadas a respostas neuro vegetativas como aumento da PA, taquicardia, taquipnéia, agitação psicomotora e ansiedade (BRASIL, 2002).

3.3.3 Dor Crônica

Dor crônica é definida como a dor cuja duração ou intensidade afete adversamente a função ou o bem-estar do doente. A Associação Internacional para o Estudo da Dor fornece uma definição amplamente usada como dor sem valor biológico aparente que persiste além cicatrização do tecido normal com tempo de duração geralmente acima de três meses (KOPF et. al., 2005).

3.3.4 Classificações de Dor por seu Mecanismo Fisiopatológico

Dor é um processo dinâmico, que põe em movimento mecanismos facilitadores e inibidores, que respectivamente, aumentam ou diminuem a intensidade da dor, dependendo do equilíbrio entre os dois mecanismos opostos. É classificada em nociceptiva, neuropática e psicogênica, todas podem se manifestar de maneira aguda ou crônica (RAJ, 1994).

3.3.4.1 Dor nociceptiva

Abrange dor somática e visceral e ocorre diretamente por estimulação química ou física de terminações nervosas normais - é resultado de danos teciduais mais comuns e frequentes nas situações inflamatórias, traumáticas e invasivas ou isquêmicas (BRASIL, 2002).

3.3.4.2 Dor Neuropática

A dor neuropática é causada por uma lesão ou inflamação no sistema nervoso e é relativamente comum, faz parte de várias síndromes neurológicas e acomete cerca de 25% dos pacientes atendidos em grandes clínicas de dor. Estima-se que a prevalência de dor neuropática na população seja cerca de 7% - 8% (ALVES et al., 2010). Muitas vezes é gravemente debilitante e em grande parte resistentes ao tratamento (HARDEN, COHEN, 2003), principalmente porque os mecanismos subjacentes ainda são mal compreendidos. Os sintomas da dor neuropática pode incluir alodinia (dor resultante de um estímulo que é normalmente não doloroso), hiperalgesia (uma resposta excessiva a estímulos dolorosos) e dor espontânea (MOALEM, TRACEY, 2006).

3.3.4.3 Dor Psicogênica

Segundo Atarodi (2010), dor psicogênica é um tipo de dor em que não há causa orgânica nem estrutural definida. O principal mecanismo proposto para o desenvolvimento da doença é um trauma psicológico e repressão das emoções dolorosas. Diferentes métodos de tratamento têm sido sugeridos para dor psicogênica, como psicoterapia e hipnose. De acordo com a alta prevalência deste problema no sistema de saúde, há necessidade de um modelo de abordagem mais abrangente que considere as dimensões psicológicas no diagnóstico e tratamento desta condição.

3.4 Papel das Citocinas na Dor

Diferentes eventos relacionados à inflamação são induzidos por citocinas, como migração celular, febre e dor. A primeira evidência da participação de uma citocina, no que se refere à dor inflamatória periférica, foi realizada em 1988 por Ferreira e colaboradores, em que mostraram a indução de hiperalgesia mecânica em ratos pela IL-1 β de maneira dependente da produção de prostanoídes (PGs) durante a inflamação. Estudos propostos por Cunha e colaboradores (2005) e Cunha e Verri (2007) demonstram a participação das citocinas no estímulo da dor. O estudo publicado em 2005 descreve que ao ocorrer o estímulo nociceptivo, há liberação concomitante de TNF- α e IL-8, que induzem liberação de IL-1 β e posteriormente, a IL-8 estimula liberação de aminas simpaticomiméticas e a IL-1 β estimula liberação de prostaglandinas. Neste estudo o papel da bradicinina não foi avaliado. As prostaglandinas, por fim sensibilizam os nociceptores, resultando em hipernocicepção/dor, sugerindo um importante papel da IL-1 β como mediadora da dor (VERRI et al., 2006). A segunda publicação no ano de 2007, o papel da bradicinina foi avaliado e os resultados indicaram que seu efeito nociceptivo, via estimulação do receptor B1, seria independente da IL-8, mas incluiria a IL-1 β e o TNF- α .

Assim, podemos observar a grande variedade de componentes relacionados à dor e inflamação e que doenças provenientes do desequilíbrio desses mediadores vem acometendo milhares de pessoas em todo o mundo, e para isso é importante o desenho e descoberta de novos agentes químicos que possam auxiliar no arsenal terapêutico contra tais agressões, dentre esses agentes destacam-se os compostos heterocíclicos, como os derivados tiazolidínicos, que vem ganhando destaque dentro da clínica médica.

3.5 PPAR

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e do processo inflamatório (SKOCZYNSKA et al., 2005; ESCHER et al., 2001). Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ , que controlam a expressão gênica pela ligação a elementos responsivos específicos (PPREs) localizados na região promotora. Para que essa ligação ocorra, os PPARs devem formar heterodímeros com outro receptor nuclear, o retinóide X (Krätznner et al., 2008).

As isoformas do PPAR são farmacologicamente distintas, apresentando ativação diferencial, apesar do alto grau de conservação dos domínios ligantes (CURI et. al., 2002). A sua ação é

dependente dos ligantes que por sua vez podem ser de origem natural (endógena) como os ácidos graxos e seus derivados (ácido araquidônico e seus metabólitos) ou sintéticos como as tiazolidinadionas (STRAUSS; GRASS, 2007).

Todas as isoformas PPARs podem atuar na regulação da resposta inflamatória. Estes receptores participam modulando a intensidade, duração e sequência dos eventos inflamatórios conforme o tecido afetado e as isoformas envolvidas (BISHOP-BAILEY; BYSTROM, 2009).

O PPAR α é encontrado em tecidos com elevadas taxas de catabolismo de ácidos graxos, sendo altamente expresso em tecido adiposo, fígado, rim, coração e músculo esquelético. O PPAR γ é o subtipo mais estudado, sendo expresso de maneira predominante no tecido adiposo, apresentando, porém, níveis menores no coração, cólon, rim, baço, intestino, fígado e macrófagos. O PPAR β/δ pode ser encontrado no intestino delgado, cólon e fígado, além disso, apresenta expressão elevada nos queratinócitos (PETERS; GONZALEZ, 2009).

Os ligantes de PPAR α inibem a produção de IL-6 e prostaglandinas, inibem a expressão da ciclooxigenase-2, da iNOS, além de inibir a produção de TNF- α em macrófagos (STAELS et al., 1998). Rival et al. (2002), evidenciaram que o PPAR β/δ ativado é capaz de inibir um dos principais mediadores pró-inflamatórios, o NF κ B.

Cuzzocrea et al. (2004), demonstraram que a utilização de um agonista de PPAR γ ocasionou a redução da produção de NO, COX-2, PGE₂, TNF- α e IL-1 β . A inibição da expressão de iNOS e COX, assim como a inibição da produção de NO, prostaglandinas ocasionada por agonistas de PPAR γ também está demonstrada em outros trabalhos (RICOTE et al., 1998; MENDEZ; UCHIMURA et al., 2001; LAPOINTE, 2003).

Os PPARs são alvos terapêuticos promissores devido a sua participação na regulação de processos metabólicos importantes e na inflamação. Destacamos a expressão de PPAR γ na artrite reumatóide uma doença inflamatória crônica severa, debilitante, com localização variada mais comum nas articulações sinoviais e tecidos periarticulares, como dores e deformidades agressivas. Há evidências da expressão do PPAR γ em células endoteliais de pacientes com artrite reumatóide, onde sua expressão foi menor em pacientes com a doença do que em pacientes normais (GIAGINIS et al., 2009).

3.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TIAZOLIDINONAS

As tiazolidinadionas (TZDs) têm sido objeto de extensas pesquisa devido sua participação na regulação de diferentes processos fisiológicos. TZDs, como a rosiglitazona e pioglitazona, diminuem os níveis de glicose no plasma, agindo como ligantes dos receptores ativados

proliferadores do peroxissoma (PPARs). Além disso, esta classe de compostos possui vários outros efeitos potencialmente benéficos, incluindo melhora do perfil lipídico no sangue e redução da pressão arterial. TZDs apresentam a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a expressão de óxido nítrico sintase induzida e moléculas de adesão celular. Esses medicamentos também podem ser benéficos na esclerose múltipla e outras doenças neurodegenerativas, incluindo doenças de Alzheimer e de Parkinson, pelo menos em parte devido a suas propriedades anti-inflamatórias (KALAITZIDIS et al., 2009). A classe das tiazolidinadionas apresentam boa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Atualmente, são descritos na literatura como potenciais novos agentes inibidores da enzima MurB, uma flavoproteína existente apenas em seres procariontes, tendo papel fundamental na biossíntese do polímero peptideoglicano (KÜÇÜKGÜZEL et al. 2006; PAYNE et al. 2007, LIESEN et al. 2008) . Possuem atividade citotóxica e antitumoral (PATIL et al, 2010), anti-inflamatória (UCHÔA, 2004; CARMINO, 2008; BARROS, 2010), hipoglicemiante (MOURÃO, 2005) entre outras. O Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica (NUPIT) e o Laboratório de Pesquisa e Síntese de Fármacos (LPSF) têm como objetivo planejar, sintetizar e avaliar as propriedades farmacológicas das tiazolidinadionas, empregando-se métodos validados com diferentes estratégias baseadas nos conceitos da química medicinal. Abaixo serão citados alguns trabalhos referentes às propriedades biológicas deste heterocíclico que merece especial atenção devido a gama de propriedades biológicas de grande utilidade na química medicinal.

3.6.1 Atividade hipoglicemiante

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco e o Laboratório de Pesquisa e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (NUPIT – LPSF – UFPE) sintetizaram e avaliaram a atividade hipoglicemiante de alguns derivados da série 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (Figura 5). Esses compostos foram avaliados após administração oral nas doses de 10 e 30 mg/kg no teste de diabetes induzida por aloxana em camundongos. Dentre os compostos avaliados o 5-(4-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona apresentou diminuição dos níveis de glicose plasmática e triglicerídeo em 50% e 59% respectivamente, após 15 dias de tratamento na dose de 30 mg/kg (Pitta et. al., Br, IP-0300997-1, 2003; Mourão et al, 2005).

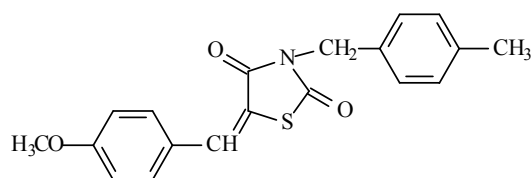
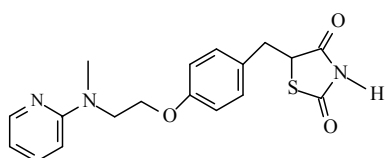


Figura 5 : 5-(4-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

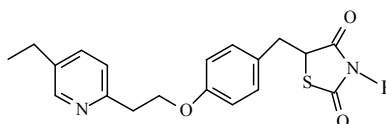
3.6.2 Efeitos Cardiovasculares das Tiazolidinadionas

No ano de 2007 a Agência de Alimentos e Medicamentos dos EUA (Food and Drug Administration, FDA), lançou um alerta de segurança relativa a um possível aumento do risco de eventos isquêmicos cardiovasculares em pacientes que utilizavam a tiazolidinadiona rosiglitazona. Duas tiazolidinadionas estavam disponíveis nos Estados Unidos, a rosiglitazona (Avandia®) e pioglitazona (Actos®). A tiazolidinadiona troglitazona (Rezulin®) foi retirado do mercado em 2000 por induzir lesão hepática, incluindo casos raros de insuficiência hepática e morte (KAUL et al., 2010). No mesmo ano, um estudo feito com 159.026 diabéticos com mais de 66 anos, durante um período de 3,8 anos, evidenciou o risco da utilização da rosiglitazona. Os pacientes tratados com TZDs (rosiglitazona e pioglitazona) apresentaram aumentos de 60% de insuficiência cardíaca congestiva, 40% de infartos do miocárdio e de 29% de mortalidade, em comparação com pacientes tratados com outros antidiabéticos. Neste contexto, os pesquisadores concluíram que nos pacientes idosos com diabetes o tratamento com TZDs, principalmente com a rosiglitazona, foi associado com um risco aumentado de insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio e mortalidade quando comparado com outros tratamentos com hipoglicemiantes orais combinados (LIPSCOMBE, 2007).

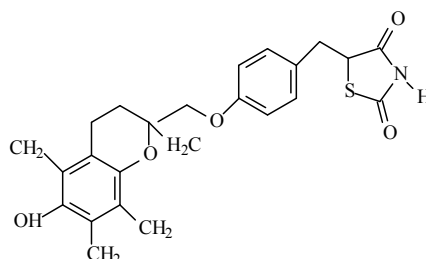
Winkelmayer e colaboradores (2008) publicaram um estudo onde 28.361 pacientes selecionados, destes 50,3% iniciaram o tratamento com pioglitazona e 49,7% com rosiglitazona. Dos pacientes que permaneceram na pesquisa, os que iniciaram a terapêutica com rosiglitazona apresentaram um percentual de 15% de mortalidade quando comparados aos que utilizavam a pioglitazona. A utilização de rosiglitazona também foi associada ao risco 13% maior de insuficiência cardíaca congestiva. As estruturas químicas destas substâncias são mostradas na Figura 6.



Rosiglitazona (Avandia®)



Pioglitazona (Actos®)



Troglitazona (Rezulin®)

Figura 6: Tiazolidinadionas

Diante de tais evidências, em 2010, a FDA permitiu o uso do Avandia® com restrições, sua disponibilidade só será possível para novos pacientes com diabetes tipo 2, caso seus níveis de glicose não sejam controláveis com outros medicamentos. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro do medicamento Avandia®, fabricado pela empresa Glaxo Smith Kline (ANVISA, 2010).

3.6.3 Atividade Antimicrobiana

Albuquerque e colaboradores (1999) investigaram o potencial de vários análogos da série 5-arilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona frente aos microorganismos *Mycobacterium flavus* e a *Bacillus cereus*. Os compostos 5-(2-cloro-arilideno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (**1**) e 5-(2-fluor-arilideno)-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona, apresentaram (**2**) CMI > 128 µg/ML (Figura 7).

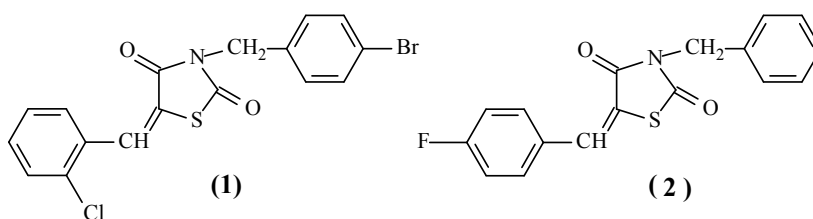


Figura 7: 5-(2-cloro-aryl)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona **(1)** e 5-(2-fluor-aryl)-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona, apresentaram **(2)**

3.6.4 Atividade Antitumoral *in vitro*

Estudos referentes à atividade citotóxica para derivados 5-arylidenotiazolidina-2,4-diona 3-substituídos apresentaram resultados promissores frente ao carcinoma nasofaríngeo (Figura 8). Os derivados 5-arylidenotiazolidina-2,4-diona 3-(4-fluorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona **(3)** e 5-arylidenotiazolidina-2,4-diona 3-(4-bromofenacil)-tiazolidina-2,4-diona **(4)** demonstraram valores de $DI_{50} > 50$ mg/mL (COSTA et al., 1995)

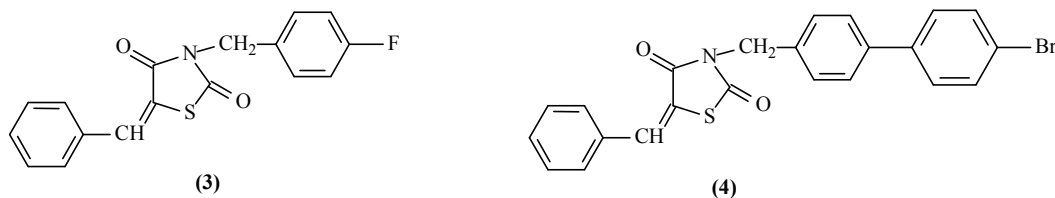


Figura 8: 5-arylidenotiazolidina-2,4-diona 3-(4-fluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona **(3)** e 5-arylidenotiazolidina-2,4-diona 3-(4-bromo-fenacil)-tiazolidina-2,4-diona **(4)**

Patil e colaboradores (2010) sintetizaram uma nova série de derivados 5-benzilidenotiazolidina-2,4-diona e avaliaram sua atividade antiploriferativa. Entre os compostos testados, o derivado 2-[4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno) metil] fenoxi]-N-[3-(trifluorometil)- fenil] acetamida (Figura 9), mostrou-se o mais promissor no teste preliminar de atividade antiproliferativa. Tal derivado apresentou potente citotoxicidade frente a cinco linhagens testadas, MCF7 (câncer de mama), PC3(câncer de próstata), KB (câncer nasofaríngeo), GURAV (câncer oral) e K562 (leucemia).

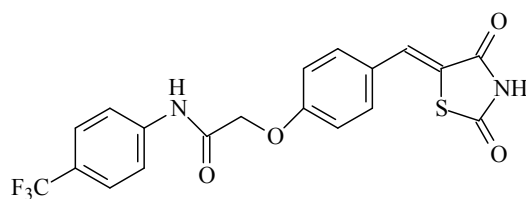


Figura 9: Derivado tiazolidínico 2-[4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno) metil] fenoxi]-N-[3-(trifluorometil)-fenil] acetamida

3.6.5 Atividade Anti-Histamínica (Antagonista-H1)

As tiazolidinadionas são conhecidas por apresentarem ação em receptores histamínicos. Singh e colaboradores (1994) investigaram a atividade anti-histamínica (H1-antagonista) de derivados tiazolidins-4-onas-2,3-dissubstituídos e concluiu que a substituição hidrofóbica na posição 4 do anel fenila promove um efeito cumulativos de polaridade negativa em todos os substituintes no grupo fenila o que foi vantajoso para atividade anti-histamínica (Figura 10).

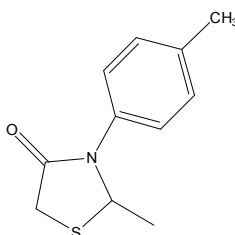


Figura 10: 2-metil-3-*p*-toloil-tiazolidin-4-ona

3.6.6 Atividade Anti-Inflamatória

As drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINEs) são um grupo heterôgenio de compostos farmacologicamente ativos utilizados no tratamento da inflamação aguda e crônica, dor e febre. Apesar de vários mediadores inflamatórios darem suporte a esse processo, o principal alvo dos AINEs é a enzima ciclocigenase (COX) que está envolvida no primeiro passo da conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). As PGs, além de regular funções importantes nos sistemas gástrico, renal e emético são conhecidas por mediar todas as respostas inflamatórias. Os efeitos terapêuticos devido a diminuição de PGs pró-inflamatórias produzida pela inibição das

ciclooxigenases, tanto da isoforma COX-1 quanto da COX-2, dependerá da seletividade de cada AINE. Entretanto, os efeitos colaterais indesejados resultam da inibição de ambas as isoformas devido as funções fisiológicas protetoras exercidas pelas mesmas em órgãos importantes como: estômago, coração, rins, cérebro, sistema reprodutor feminino, entre outros (VANE e WARNER, 2000; RAO, et al., 2010).

Derivados da série 5-arilideno-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona sintetizados por Couto e colaboradores (2006) foram analisados quanto ao seu potencial anti-inflamatório, a exemplo do derivado 5-(4-metil-sulfonil-arilideno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-23), este derivado apresentou ação anti-inflamatória investigada no modelo de bolsão de ar induzido por carragenina, reduzindo em 60% a migração celular para o local da inflamação (Figura 11).

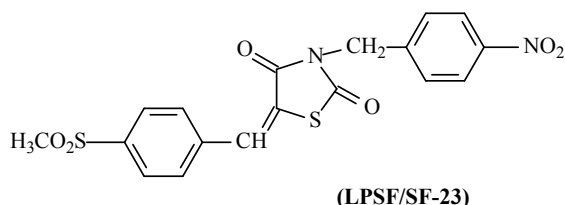


Figura 11: 5-(4-metil-sulfonil-arilideno)- 3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-23)

O derivado (5Z,E)-3-2[-(4-clorofenil-2-oxoetil)]-5-(1H-indol-3-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (PG-15) foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa e inovação terapêutica (NUPIT) com o objetivo de avaliar seu potencial como fármaco anti-inflamatório em ensaios pré-clínicos. Os resultados obtidos demonstraram que o derivado PG-15 inibiu, na concentração de 0,1 mM, mais de 30 e 13 % das enzimas COX-1 e COX-2, respectivamente *in vitro* (Figura 12). Este derivado também foi avaliado *in vivo* no teste do bolsão de ar induzido por carragenina e apresentou 67,2 % de inibição da migração leucocitária na dose de 3 mg/Kg, apresentando inibição similar ao fármaco de referência indometacina na dose de 10 mg/kg (UCHÔA et al., 2009).

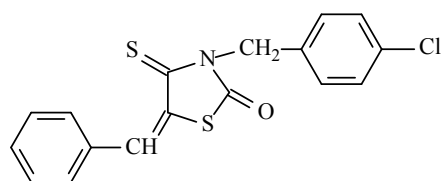


Figura 12: (5Z,E)-3-2[-(4-clorofenil-2-oxoetil)]-5-(1H-indol-3 ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (PG-15)

Recentemente Ottaná e colaboradores (2005), publicaram a atividade anti-inflamatória da série 5-aryliden-2-imino-4-tiazolidinadiona. Todos os derivados demonstraram atividade significativa em modelos de inflamação aguda, como o edema de pata induzido por carragenina e pleurisia induzida por carragenina em ratos. O composto 5-(3-metoxifenilideno)-2-3-fenilaminopropil-4-tiazolidinona (Figura 13), apresentou elevados níveis de atividade antiedematogênica, comparáveis ao da indometacina.

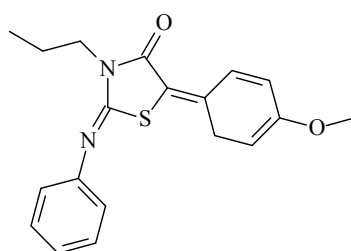


Figura 13: 5-(3-metoxifenilideno)-2-3-fenilaminopropil-4-tiazolidinona

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. "Citocinas". In: _____ Imunologia Celular e Molecular, 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 12, p. 267-302.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The Cell Biology of Macrophage Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 283-318, abril. 1984.
- AKDIS, C. A.; SIMONS, F. E. R. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 69-76, março. 2006.
- ALBUQUERQUE, J.F.C.; ROCHA FILHO, J.A.; BRANDÃO, S.S.F.; LIMA, M.C.A.; XIMENES, E.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; LUU-DUC, C. Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. **Il Farmaco**, v. 54, p. 77-82, nov.1999.
- ALVES, N. D.; Santos, T. J. T.; Costa, S. B. C.; Costa, A. M. B. C.; Feijó, F. M. C.; Costa, C. M. C. Comportamentos espontâneos e induzidos em ratos com dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático. **Rev Dor**, v. 11, n. 1, p. 55-62, janeiro/mar. 2010.
- AMATLLER, A. M.; ANTEZANA, S. G. Antileucotrienos y asma. **Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría**, v. 46, n. 2, p. 113-117, 2007.
- ANDRES, C. J.; BRONSON, J. J.; STANLEY V D'ANDREA, S. V.; DESHPANDE, M. S.; FALK, P. J.; GRANT-YOUNG, K. A.; HARTE, W. E.; HO. H.; MISCO, P. F.; ROBERTSON, J. G.; STOCK. D.; SUN, Y; WALSH, A. W. 4-Thiazolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme murB. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 8, p. 715-717, abril. 2000.
- ANVISA. Alertas por Região Geográfica /Nacionais/2010 - Risco cardiovascular do medicamento Avandia®. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/informetecnico>> Acesso em: 30 set 2010.
- ATARODI, S. Psychogenic pain. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 2, p. 217-265. 2010.
- BARROS, C. D.; AMATO, A. A.; OLIVEIRA, T. B.; IANNINI, K. B. R.; SILVA, A. L.; SILVA, T. G.; LEITE, E. S.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; NEVES, F. A. R.; PITTA, I. R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3805-3811, 2010.
- BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 3, p. 380-383, junho. 2002.

BECA, T.; HERNANDEZ, G.; BASCONES, A. AINEs como tratamento coadjuvante de la enfermedad periodontal. **Avances em periodoncia**, v. 19, n. 2, p.101-113, 2007.

BENAMAR, K. et al. Fever induced by macrophage inflammatory protein-1b in the rat is independent of hypothalamic interleukin-1b or interleukin-6. **Journal of Thermal Biology**, v. 25, n. 1-2, p. 5-10, 2000.

BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.

BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, supl. 65, p. 3-9, setembro. 2002.

BISHOP-BAILEY, D.; BYSTROM, J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 124, n. 2, p.141-150, 2009.

BOCHNER, B. S. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 5, p. 292-302, novembro. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor. - Rio de Janeiro: **INCA**, 2001.

BROOKS, P.; EMERY, P.; EVANS, J. F.; FENNER, H.; HAWKEY, C. J.; PATRONO, C.; SMOLEN, J.; BREEDVELD, F.; DAY, R.; DOUGADOS, M.; EHRICH, E. W.; GIJON-BAÑOS, J.; KVIEN, T. K.; VAN RIJSWIJK, M. H.; WARNER, T.; ZEIDLER, H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology**, v. 38, n. 8, p. 779-788, fevereiro. 1999.

CARMINO, M. A. S. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade anti-inflamatória de novos derivados da tiazolidina-2,4-diona**. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIGORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Immunology**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CAMUSSI, G.; ALBANO, E.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 3-14, 1991.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v.1, p. 41-49, outubro. 2001.

CHARLES, P. et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 163, n. 3, p. 1521-1518, 1999.

CHARLIER, C.; MICHAUX, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 7-8, p. 645-659, julho/ago. 2003.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 1998.

COSTA, D.L.B.; CHANTEGREL, J.; LIMA, M.C.A.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; LIMA, R.M.O.C.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C. Imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées: synthese, etude structurale et activite cytotoxique. **J. Pharm. Belg.**, v. 50, p. 5-10, 1995.

COUTO, J. A. **Novos Compostos 5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-imidazolidínicos e tiazolidínicos: Síntese, Elucidação Estrutural e Atividade Antiinflamatória**. 2006. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

COUTINHO, A.; POLTORACK, A. Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back. **Current Opinion in Immunology**, v.15, n. 6, p. 599-602, dezembro. 2003.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JR., D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-361. 2010.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 7, p. 1418-1424, 2000.

CUNHA, T.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102, n. 5, p. 1755-60. 2005.

CUNHA, T.; VERRI, W. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur J Pharmacol.**, v. 573, n. 1-3, p. 221-229. 2007.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; KENJI, C.; PROCÓPIO, J. PPAR – receptor ativador de peroxissoma. Entendo a gordura: os ácidos graxos, 1º Ed., São Paulo: Editora Manole, 2002. cap. 18

CUZZOCREA, S.; IANARO, A.; WAYMAN, N. S.; MAZZON, E.; PISANO, B.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; DI PAOLA, R.; CHATTERJEE, P. K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P.;

THIEMERMANN, C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta-(12,14)-PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 4, p. 678-688, fevereiro. 2003.

CUZZOCREA, S.; AYROLDI, E.; DI PAOLA, R.; AGOSTINI, M.; MAZZON, E.; BRUSCOLI, S.; GENOVESE, T.; RONCHETTI, S.; CAPUTI, A. P.; RICCARDI, C. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. **FASEB J.**, v. 19, n. 10, p. 1253-1265, agosto. 2005.

CUZZOCREA, S.; Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. **Curr Pharm Des.**, v. 12, n. 27, p. 3551-3570. 2006.

DAUDT, A.W.; HADLICH, E.; FACIN, M. A.; APRATO, R. M. S.; PEREIRA, R. P. Opióides no manejo da dor — uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.44, n. 2, p. 106-110, 1998.

DIENZ, O.; RINCON, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. **Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 27-33, 2008.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Research**, v. 562, n. 2, p. 199-206, outubro.1991.

EISENBARTH, H.; RUKWIED, R.; PETERSEN, M.; SCHMELZ, M. Sensitization to bradykinin B1 and B2 receptor activation in UV-B irradiated human skin. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 197-204, julho. 2004.

ESCHER, P.; BRAISSANT, O.; BASU-MODAK, S.; MICHALIK, L.; WAHLI, W.; DESVERGNE, B. Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting. **Endocrinology**, v. 142, n. 10 p. 4195-4202, 2001.

FAJARDO, L. E. G.; LINARES, M. P. M.; OLAYA, H. L. G. Inflamacion y dolor: cambios em El sistema nervioso periferico y central. **MedUnab**, v. 4, n. 10, p. 59-72, 2001. Disponível em: <http://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/article/view/325>. Data de acesso: 19 Set. 2010.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. **Annual Review of Immunology**. V. 14, p. 397-440, 1996

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; S. POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700. 1988.

FRANKE, A.; LANTE, W.; FACKELDEY, V.; BECKER, H. P.; THODE, C.; KUHLMANN, W. D.; MARKEWITZ, A. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n. 2, p. 363-371, 2002.

FERRER, P. A. R. Inportancia de los acidos grasos poliinsaturados en la alimentacion del lactente. **Archivos Argentinos de Pediatria**, v. 98, n. 4, p. 231-238, 2000.

GABAY, C., AREND, W. P. Treatment of rheumatoid arthritis with IL-1 inhibitors. *Springer Seminars in Immunopathology* v. 20, p. 229–246, 1998.

GARCIA-PASTOR, P.; RANDAZZO, A.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J.; PAYA, M. Effects of petrosaspongiolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and chronic inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 289, p. 166–172, agosto. 1999.

GEPDIREMEN, A.; MSHVILDADZE, V.; SULEYMAN, H.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of Hedera colchica in rats. **Journal Ethnopharmacol** v. 94, n. 1, p. 191–195, setembro. 2004.

GIAGINIS, C.; DASKALOPOULOU, S. S.; VGENOPOULOU, S.; SFINIADAKIS, I.; KOURAKLIS, G.; THEOCHARIS, S. E. Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. **BMC Gastroenterol.** v. 9, p. 9-14, 2009.

GILROY, D.W. Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 524-528, abril. 2010.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M. S.; PINTO, D. C. G. A.; SANTOS, C. M. M.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIMA, J. L. F. C. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**, v.78, n. 2, p. 171-177, julho. 2009.

GORLACH, C.; WAHL, M. Bradykinin Dilates Rat Middle Cerebral Artery and its Large Branches Via Endothelial B2 Receptors and Release of Nitric Oxide. **Peptides**, v. 17, n. 8, p. 1373-1378, 1996.

GOUVEIA, L. F.; OLIVEIRA, R. M. B. O.; OLIVEIRA, T. B.; SILVA, I. M.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2038–2043, maio. 2009.

GREGA, G. J.; SVENSJO, E.; HADDY, F. Macromolecular permeability of the microvascular membrane: Physiological and pharmacological regulation. **Microcirculation**, v. 1, p. 325-341, 1981.

GYERMEK, L. Pharmacology of serotonin as related to anesthesia. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 8, n. 5, p. 402-425, agosto. 1996.

HALLMAN, M.; RÄMET, M.; EZEKOWITZ, R. A. Toll-like Receptors as Sensors of Pathogens. **Pediatric Research**, v. 50, n. 3, p. 315-321, setembro. 2001.

HARDEN, N.; COHEN, M. Unmet Needs in the Management of Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, n. 5, s. 1, p. s12-17, 2003.

HAZOURI, J. A. S. Antagonistas de leucotrienos en el tratamiento de la rinitis alérgica y enfermedades concomitantes. **Revista Alergia Mexico**, v. 55, n. 4, p. 1164-175, julho/ago. 2008.

HEYWORTH, P. G.; CROSS, A. R.; CURNUTTE, J. T. Chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 5, p. 578-584, outubro. 2003.

HURST, S. M.; HURST, S. M.; WILKINSON, T. S.; MCLOUGHLIN, R. M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. **Immunity**, v.14, n. 6, p.705-714, 2001.

IDZKO, M.; LA SALA, A.; FERRARI, D.; PANTHER, E.; HEROUY, Y.; DICHMANN, S.; MOCKENHAUPT, M.; DI VIRGILIO, F.; GIROLOMONI, G.; NORGAEUER, J. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 5, p. 839-846, maio. 2002.

JANEWAY CA, MEDZHITOV R. Innate immunity recognition. **Annual Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216. 2002.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; SHLOMCHIK, M. J. T Cell-mediated Immunity. In: _____. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6 ed. New York

JENKINS, D. W.; SELLERS, L. A.; FENIUK, W.; HUMPHREY, P. P. A. Characterization of bradykinin-induced prostaglandin E2 release from cultured rat trigeminal ganglion neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 469, n. 1-3, p. 29-36, maio. 2003.

KALAITZIDIS, R. G.; SARAFIDIS, P. A.; BAKRIS, G. L. Effects of Thiazolidinediones Beyond Glycaemic Control. [Current Pharmaceutical Design](#), v. 15, n. 5, p. 529-536, fevereiro. 2009.

KARPUZOGLU, E.; AHMED, S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 3, p. 177-186, 2006.

KAUL, S.; BOLGER, A. F.; HERRINGTON, D.; GIUGLIANO, R. P.; ECKEL, R. H. Thiazolidinedione Drugs and Cardiovascular Risks - A Science Advisory From the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. **Circulation**, v. 121, p. 1868-1877, fevereiro. 2010.

KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; SAAREN-SEPPALA, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 387-390, setembro. 2003.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemistry Journal**, v. 298, n. 2, p. 249-258, 1994.

KOPF, A.; BANZHAF, A.; STEIN, C. Perioperative management of the chronic pain patient. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 19, n. 1, p. 59-76, março. 2005.

KRÄTZNER, R.; FRÖHLICH, F.; LEPLER, K.; SCHRÖDER, M.; RÖHER, K.; DICKEL, C.; TZVETKOV, M.V.; QUENTIN, T.; OETJEN, E.; KNEPEL, W. A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Retinoid X Receptor Heterodimer Physically Interacts with the Transcriptional Activator PAX6 to Inhibit Glucagon Gene Transcription. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 509-517, 2008.

Küçükgülzel, G., Kocatepe, A., Clercq, E., Şahin F., Güllüce, M. Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 353-359, 2006.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498 – 512, julho/ago. 2002.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The Emerging Multifaceted Roles of Nitric Oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, n. 3, p. 220-235, 1995.

LANG, E.; LANG, E.; NOVAK, A.; REEH, P. W.; HANDWERKER, H. O. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 63, n. 4, p. 887-901. 1990.

LEVAL, X.; JULÉMONT, F.; DELARGE, J.; PIROTTE, B.; DOGNÉ, J.M. New Trends in Dual 5-LOX/COX Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 941-962, maio. 2002.

LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 3, p. 798-R803. 1990.

LI, G.; QIAN, X.; CUI, J.; HUANG, Q.; CUI, D.; ZHANG, R.; LIU, F. Synthesis and herbicidal activities of fluorine-containing 3-pyridylmethyl-2-phenyliminothiazolidine derivatives. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 182-186, fevereiro. 2006.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 369-376, fevereiro. 2008.

LINO, M.; OSAWA, S.; TSUZUKI, K. Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology*, v. 424, p. 151-165, 1990.

LIPSCOMBE, L. L.; GOMES, T.; LÉVESQUE, L. E.; HUX, J. E.; JUURLINK, D. N.; ALTER, D. A. Thiazolidinediones and Cardiovascular Outcomes in Older Patients With Diabetes. *JAMA*, v. 298, n. 22, p. 2634-2643, dezembro. 2007.

MACDONALD, S. M. Histamine-releasing factors. *Current Opinion in Immunology*, v. 8, n. 6, p. 778-783, dezembro. 1996.

MACLEAN, D.; HOLDEN, F.; DAVIS, A. M.; SCHEUERMAN, R. A.; YANOFSKY, S.; HOLMES, C. P.; FITCH, W. L.; TSUTSUI, K.; BARRETT, R. W.; GALLOP, M. A. Agonists of the Follicle Stimulating Hormone Receptor from an Encoded Thiazolidinone Library. *J. Comb. Chem.*, v. 6, n. 2, p. 196–206. 2004.

MAHDY, A. M.; WEBSTER, N.R. Histamine and antihistamines. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, v. 9, n. 7, p. 324-328, julho. 2008.

MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*, v. 30, n.1 p. 1–26, junho. 1995.

MCCULLOCH, C. A.; DOWNEY, G. P.; EL-GABALAWY, H. Signalling Platforms that Modulate the Inflammatory Response: New Targets for Drug Development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 864-876, outubro. 2006.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v. 388, p. 394-397, julho. 1997

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, v. 343, p. 338-344, agosto. 2000.

MEE, J. B.; CORK, M. J.; DI GIOVINE, F. S.; GORDON W. DUFF, G. W.; GROVES, R. W. Interleukin-1: A key inflammatory mediator in psoriasis? *Cytokine*, v. 33, n. 2, p. 72-78, 2005.

MEKI, A. R. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*, v.16, n. 8, p.1359-1365, 1995.

MENDEZ, M.; LAPOINTE, M.C. PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*, v. 42, n. 4, p. 844-850, 2003.

MIYAZAKI, S.; MATSUKAWA, A.; OHKAWARA, S.; TAKAGI, K.; YOSHINAGA, M. Neutrophil infiltration as a crucial step for monocyte chemoattractant protein (MCP-1) to attract monocytes in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. **Inflammation Research**, v. 49, n. 12, p. 673–678. 2000.

MOALEM, G.; GRAFE, P.; TRACEY, D. J. Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. **Neuroscience**, v. 134, n. 4, p. 1399–1411, 2005.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 240-264, agosto. 2006.

MOREAU, A. CHEN, Q.; RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 23, p. 7716–7727, dezembro. 2006.

MOURÃO, R.H.; SILVA, T.G.; SOARES, A.L.M.; VIEIRA, E.S.; SANTOS, J.N.; LIMA, M.C.A.; LIMA, V.L.M.; GALDINO, S.L.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1129–1133, 2005.

NAKAMURA, T.; ITADANI, H.; HIDAKA, Y.; OHTA, M.; TANAKA, K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 2, p. 615–620, dezembro. 2000.

NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18-35, abril. 2008.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Research**, v. 912, n. 2, p. 171-175, setembro. 2001.

OTTANÀ, R. MACCARI, R.; BARRECA, M. L.; BRUNO, G.; ROTONDO, A.; ROSSI, A.; CHIRICOSTA, G.; DI PAOLA, R.; SAUTEBIN, L.; CUZZOCREA, S.; VIGORITA, M. G. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4243-4352, julho. 2005.

PATIL, V.; TILEKAR, K.; MEHENDALE-MUNJ, S.; MOHAN, R.; RAMAA, C. S. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-benzylidene-2,4-thiazolidinedione derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4539-4544, outubro. 2010.

PARSLOW, T.G.; STITES, D. P.; IMBODEN, J. B. *Imunologia Médica*, 10^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PAULINO, N.; RODRIGUES, N. C.; PARDI, P. C.; SUAREZ, J. A. P. Q.; SANTOS, R. P.; VOGEL, C.; FEIST, H. & MICHALIK, D. Evaluation of anti-inflammatory effect of synthetic 1,5-bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one, HB2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, p. 4290-4295, julho. 2009.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 29-40, janeiro. 2007.

PERSSON, M. G.; GUSTAFSSON, L. E. Ethanol can inhibit nitric oxide production. **European Journal of Pharmacology**, v. 224, n. 1, p. 99-100, novembro. 1992.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) in cell proliferation and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1796, n. 2, p. 230-241, 2009.

PITTA, I.R.; LIMA, M.C.A; GALDINO, S; BARBE, J. Compostos arilidenotiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica Br, PI 0144/02 em 10/04/2003.

POMPERMAYER, K.; ASSREUY, J.; VIEIRA, M. A. R. Involvement of nitric oxide and potassium channels in the bradykinin-induced vasodilatation in the rat kidney perfused ex situ. **Regulatory Peptides**, v. 105, n.3, p. 155-162, maio. 2002.

RAJ, P. P. Characteristics, classification, and assessment of acute postoperative pain. **Current Review of Pain**, Current Medicine, p. 17-66. 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. "Inflamacao e Antiinflamatorios". In: _____ Farmacologia, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 13-14, p. 211-245.

RAO, P. P. N.; KABIR, S. N.; MOHAMED, T. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 1530-1549, maio. 2010.

RAWLINGSON, A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. **Burns**, v. 29, n. 7, p. 631-640, 2003.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, s.1, p. 191-198. 2005.

REED, J. C. Chronic Lymphocytic Leukemia: A Disease of Dysregulated Programmed Cell Death. **Clinical Immunology Newsletter**, v.17, n. 9, p. 125-130, 1997.

RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-g is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998.

RIVAL, Y., BENETEAU, N., TAILLANDIER, T., PEZET, M., DUPONT PASSELAIGUE, E., PATOISEAU, J. F., JUNQUERO, D., COLPAERT, F. C., & DELHON, A. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 435, n. 2, p. 143–151, 2002.

RIVER-RAMIREZ, O. A.; MENDONZA-MAGANA, M. J. E.; RACETTE, M. Anestesia e anafilaxia. **Revista Mexicana de Anestesiologia**, v. 31, n. 1, p. 37-44, 2008.

ROMEIRO, N.C.; SANT'ANNA, C. M. R.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. NSAIDS revisited: Putative molecular basis of their interactions with peroxisome proliferator-activated gamma receptor (PPAR γ). **Eur. J. Med. Chem.** v.XX, p. 1-8, 2007.

ROSS, R.; RESKE-KUNZ, A. B. The role of NO in contact hypersensitivity, **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1469-1478, 2001.

RUEFF, A.; DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent fibres in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. **Neuroscience**, v. 54, n. 2, p.527-535, maio. 1993.

SANTOS, P. P. A.; FREITAS, V.S.; FREITAS, R. A.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B. Relacao entre Mastocitos e Celulas T na Inflamacao. **Odontologia Clinico-cientifica**, v. 9, n. 3, p. 215-217, julho/set. 2010.

SATO, M.; KAWASHIMA, Y.; GOTO, J.; YAMANE, Y.; CHIBA, Y.; JINNO, S.; SATAKE, M.; IWATA, C. Synthesis and evaluation of novel fluorinated sulotroban-related sulfonamide derivatives as thromboxane A₂receptor antagonists. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 403-414. 1995.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A; IANARO, A.; DI ROSA, M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 7, p. 1113-1117, 1998.

SCHÖNBECK, U.; SUKHOVA, G. K.; GRABER, P.; COULTER, S.; LIBBY, P. **Augmented** Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1281-1291, outubro. 1999.

SERPELL, M. G.; MAKIN, A.; HARVEY, A. Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. **Acute Pain**, v. 1, n. 3, p. 31-47, junho. 1998.

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1-2, p. 47-55, maio. 2009.

SINGH, P.; OJHA, T. N.; SHARMA, R. C.; TIWARI, S. Quantitative structure - activity relationship study of antihistaminic thiazolidin-4-ones. **Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 4, p. 162-165. 1995.

SIQUEIRA, JR. J. F.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2000. P 25.

SKOCZYNSKA, A.; DOBOSZ, T.; POREBA, R.; TURCZYN, B.; DERKACZ, A.; ZOLEDZIEWSKA, M.; JONKISZ, A.; LEBIODA, A. The dependence of serum interleukin-6 level on PPAR-alpha polymorphism in men with coronary atherosclerosis. **European Journal of Internal Medicine**, v. 16, n. 7, p. 501-506, 2005.

SPULBER, S.; SCHULTZBERG, M. Connection between inflammatory process and transmitter function- Modulatory effects of interleukin-1. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 256-26, 2010.

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, In Press, Corrected Proof, Available online 23 July 2010.

STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A.; MERVAL, R.; LEBRET, M.; TORRA, I.P.; DELERIVE, P.; FADEL, A.; CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C.; NAJIB, J.; MACLOUF, J.; TEDGUI, A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, **Nature**, v. 393, n. 6687, p. 790-793, 1998.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends. Immunol.** v. 28, n. 12, p. 551-558. 2007.

SZABO, C.; THIEMERMANN, C. Regulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**, v.34, p. 113-153, 1995.

SZÉLES, L.; TÖRÖCSIK, D.; NAGY, L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1014-1030, agosto. 2007.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience**, v. 48, n. 2, p. 485-490, maio. 1992.

UCHIMURA, K.; NAKAMUTA, M.; ENJOJI, M.; IRIE, T.; SUGIMOTO, R.; MUTA, T.; IWAMOTO, H.; NAWATA, H. Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 91-99, 2001.

UCHÔA, F.D.T. **Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória de 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas**. 2004. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

UCHÔA, F. T., SILVA, T. G., LIMA, M. C. A., GALDINO, S. L., PITTA, I. R., COSTA, T. D.¹ Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 339–345, (2009).

UHLAR, C. M.; GREHAN, S.; STEEL, D. M.; ALEXANDER STEINKASSERER, A.; WHITEHEAD, A. S. Use of the acute phase serum amyloid A2 _ SAA2/ gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1b and TNF-a compared to IL-6. **Journal of Immunological Methods**, v. 203, n. 2, p. 123-130, 1997.

VANE, J. R.; WARNER, T. D. Nomenclature for COX-2 Inhibitors. **The Lancet**, v. 356, n. 9239, p. 1373-1374, outubro. 2000.

VASQUEZ-PINTO, L. M.C.; NANTEL, F.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Bradykinin B1 receptor antagonist R954 inhibits eosinophil activation/proliferation/migration and increases TGF-b and VEGF in a murine model of asthma. **Neuropeptides**, v. 44, n. 2, p. 107-113, abril. 2010.

VEGA, M. T. M.; MARTÍN, A. A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 36, n. 6, p. 347-357, dezembro. 2008.

VELASCO, M.V.; OLIVA, C. Papel del tratamiento modificador de los leucotrienos en el asma bronquial. **Canarias Pediatrica**, v. 22, n. 2, p. 21-25, 1999.

VERRI, W. J.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; FERNANDO Q. CUNHA, F. Q. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther.** v. 112, n. 1, p. 116-38. 2006.

VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 897-905, maio. 2008.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2003.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor-a (TNF-a) hyperalgesia. *Brain Res.* v. 692, p. 244–50, 1995.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 701-718, dezembro. 2006.

WINKELMAYER, W. C.; SETOGUCHI, S.; LEVIN, R.; SOLOMON, D. H. Comparison of Cardiovascular Outcomes in Elderly Patients With Diabetes Who Initiated Rosiglitazone vs Pioglitazone Therapy. **Arch Intern Med.** v. 168, n. 21, p. 2368-2375, novembro. 2008.

WUBE, A. A.; BUCAR, F.; ASRES, K.; GIBBONS, S.; ADAMS, M.; STREIT, B.; BODENSIECK, A.; BAUER, R. Knipholone, a selective inhibitor of leukotriene metabolism. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 452-456, junho. 2006.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D.; BERNARDI, M. M. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 2007, p. 215-224.

ZHANG, X. W.; WANG, Y.; LIU, Q.; THORLACIUS, H. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor- α -induced extravasation of neutrophils in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 427, n. 3, p. 277-283, 2001.

ZHANG, M.; THURMOND, R. L.; DUNFORD, P. J. The histamine H₄ receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 3, p. 594-606, março. 2007.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398-406, setembro. 2008.

CAPÍTULO II

4. MANUSCRITO I

Thiazolidinics Derivatives 3,5-dissubstituted: Synthesis and Biological Activity *in vivo* and *in vitro*

Diana Jussara do Nascimento Malta¹, Maria Andréa de Souza Carmino¹, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Maria do Carmo Alves de Lima¹, Suely Lins Galdino¹ Teresinha Gonçalves da Silva¹ and Ivan da Rocha Pitta^{1*}

Correspondence to: Teresinha Gonçalves da Silva, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE - Brasil

Fone: 55-81-21268347 / Fax: 55-81-21268346

E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Artigo a ser submetido ao periódico molecules

(Article)

Thiazolidinics Derivatives 3,5-disubstituted: Synthesis and Biological Activity *in vivo* and *in vitro*

Diana Jussara do Nascimento Malta¹, Maria Andréa de Souza Carmino¹, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Maria do Carmo Alves de Lima¹, Suely Lins Galdino¹ Teresinha Gonçalves da Silva^{1*} and Ivan da Rocha Pitta¹

¹ Department of Antibiotics, Pernambuco Federal University, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, 50740-521, Recife, PE, Brazil

E-mail: (diana_malta@yahoo.com.br). E-mail: (laricardosocorreia@yahoo.com.br)

E-mail: (nenalima.mariadocarmo@gmail.com) E-mail: (suelygaldino@gmail.com). E-mail: (teresinha.goncalves@pq.cnpq.br). E-mail: (irpitta@gmail.com)

* Author to whom correspondence should be addressed.

/irpitta@gmail.com/ teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The objective of this work was to synthesize and evaluate five thiazolidinics compounds about their anti-inflammatory and cytotoxic activities. Moreover, was also evaluated the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL- β) from the exudates peritonitis induced by carrageenan. All derivatives exhibited significant levels of anti-inflammatory activity when compared to control in acute inflammation models of paw edema and peritonitis both induced by carrageenan. The cytotoxic activity was evaluated against three human tumor cell lines (NCI-H292, HT29 and MCF-7). None of the derivatives exhibited significant cytotoxicity activity, except the compound (**5a**) which showed moderate cytotoxicity effect on tumor line NCI-H292.

Keywords: Thiazolidinics derivatives, anti-inflammatory, cytotoxicity activity.

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a heterogeneous family of pharmacologically active derivatives used in the treatment of acute and chronic inflammation, pain

and fever. Is the most used drug class worldwide, but it has adverse effects such as gastrointestinal lesions, nephrotoxicity and bleeding, especially when there is need for chronic use [1]. In search a new candidate therapeutic agent can highlight the molecules containing the ring 4-thiazolidinone. Compounds that exhibit this heterocyclic ring in their structure have great scientific interest, because several studies in literature show a wide spectrum of biological activities of its various derivatives. It is suggested that the different biological activities can be attributed to substituent groups in positions 2, 3 and 5 of the ring, where they promote changes in the physicochemical and structural molecules [2,3].

The thiazolidines are an important scaffold for several known biological activities, such as antimicrobial [4], antinociceptive [5], antihyperglycemic [6], antitumor[7], anti-inflammatory[8], antiviral [9], among other activities.

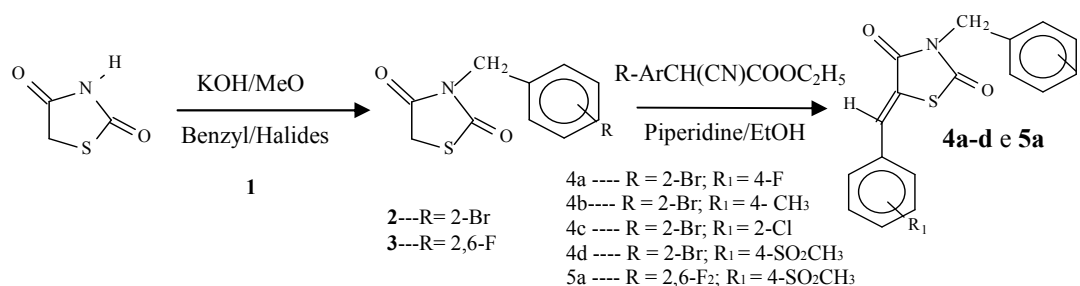
Some of the biological targets studied intensively in recent years are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). These receptors are members of the nuclear hormone receptor superfamily which are ligand-activated transcription factors. There are three PPAR isotypes have been reported: PPAR α , PPAR γ , and PPAR β . Originally, PPAR activity was thought to be limited to lipid metabolism and glucose homeostasis. Later studies showed that PPAR activation regulates inflammatory responses [10]. This paper describes the synthesis and gives the structural characteristics of five derivatives of the 3-benzyl-5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione substituted on the position 3 and 5 on the thiazolidic ring, besides showing their anti-inflammatory and cytotoxic effect.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

The attainment of thiazolidine derivatives (**4a-5a**) occurred in two stages where initially the thiazolidine-2,4-dione (**1**) was N-(3)-alkylated in the presence of potassium hydroxide, forming the potassium salt of the thiazolidine which reacts with benzyl halide in hot alcoholic medium. The second step the 5-benzyliden-3-benzyl-thiazolidine-2,4-diones were prepared by a nucleophilic Michael addition of the 3-benzyl-thiazolidine-2,4-dione **2** or **3** and the respective aryl-substituted ethyl-(2-cyano-3-phenyl)-acrylates [11,12]. The synthetic route is shown in Figure 1.

Figure 1. Synthetic route for 5-benzyliden-3-benzyl-thiazolidine-2,4-diones.



The Synthetic route used has proved to be satisfactory since all the compounds synthesized showed good yields and easy manipulation. The proof structure of all compounds obtained in the methodology of this work was accomplished through the physicochemical analysis and infrared spectroscopic (IR), hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and mass spectrometry (MS). The results confirmed the structure of molecules as well as the purity of final products. From the infrared spectra (IR) was possible to verify the characteristic absorption bands of functional groups present in the synthesized derivatives, which were observed regarding the frequencies of absorption bands associated with C=O bond stretching with a frequency of $1750\text{--}1674\text{ cm}^{-1}$ and vibration of C = C double bond was observed between the frequencies of $1637\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. The nuclear magnetic resonance spectroscopy has shown the hydrogen absorption characteristics of protons present in the compounds of series 5-benzylidene-3-(2,6-difluoro-benzyl)-thiazolidine-2,4-diones (5a) and 5 - benzylidene-3-(2-bromo-benzyl)-thiazolidine-2,4-diones (4a-d). The ^1H NMR spectra were performed using as the solvent DMSO- d_6 (Acros Organics). Chemical shifts (δ) were expressed in ppm and couplings in Hz. The derivatives obtained and characterized showed chemical shifts between 7,1 – 8,39 ppm, corresponding to aromatic hydrogens of the benzylidene grouping and the substituted benzyl. Typical signs of CH_3 , CH_2 and CH appear as singlet in the regions between 2,29–2,37; 4,86–4,93 ppm and 7,96–8,11 ppm, respectively. The method used in the mass spectrum was the ionization with the formation of sodium adducts $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and chemical ionization (CI) in the presence of excess reagent gas $[\text{M}-\text{H}]^+$. The mass spectrometry showed fragments of positive ions, including the molecular ion in their relative concentrations, except the (4c), which was accomplished by chemical ionization. The most intense peak of the spectrum, called the base peak, has arbitrarily to 100% intensity which gave us the security proof of the proposed compounds. Regarding the biological evaluation, compounds 4a-d - 5a were subjected to the study of anti-inflammatory activity and cytotoxic activity and the results of thiazolidinics analogs are shown below.

2.2 Anti-inflammatory activity

Evidence of anti-inflammatory activities *in vivo* in the five compounds (4a-d - 5a) was evaluated in the two different models for inflammation, paw edema and peritonitis, both induced by carrageenan used to investigate the anti-inflammatory effect at dose of 3mg/kg. The injection of carrageenan into the rat paw produced a marked increase of volume from the first hour, reaching its maximal effect after 4 h. Pre-treatment of rats with tested compounds (4a-d - 5a) and standards

indomethacin (10 mg/kg) and rosiglitazone (3 mg/kg), 1 hour before the carrageenan injection, significantly attenuated inflammatory response (**Figure 2**). The compounds (4a-d-5a) showed significant inhibition of edema mainly in 60, 120, and 240 minutes after induction of inflammation by carrageenan. The compound 4c inhibited paw edema by 72% at 120 minutes and 67% at 240 minutes, similar to the compound 5a that inhibited paw edema by 69% at same time. The anti-edematogenic effect of the compound 4a (56%), was similar to that of indomethacin (58%) and their structural analogue rosiglitazone (59%). The thiazolidinics derivatives 4b and 4d showed 42% and 51% at 240 minutes, respectively. Edema is one of the prime signs of inflammation [13]. Several studies using the model of paw edema induced by carrageenan to be a suitable in vivo model to predict the value of anti-inflammatory agents, which act by inhibiting the mediators of acute inflammation[14]. The method was chosen for this study since edema induced by carrageenan is the most prominent acute experimental model in search for new anti-inflammatory drugs. The carrageenan-induced paw edema involves many mediators which induce inflammatory reaction in two different phases. The initial phase, which occurs between 0 and 2.5 h after the injection of the phlogistic agent, has been attributed to the action of mediators such as histamine, serotonin and bradykinin on vascular permeability [15]. It has been reported that histamine and serotonin are mainly released during the first 1.5 h while bradykinin is released until 2.5 h after carrageenan injection [16]. The edema volume reaches its maximum approximately 3 h post treatment and then begins to decline. The late phase, which is also a complement-dependent reaction has been shown to be a result of overproduction of prostaglandins in tissues and may continue until 5 h post-carrageenan injection [17].

Based on characteristic biphasic nature of carrageenan-induced paw edema, it is possible to propose that the significant activity observed in the suppression of the first phase of inflammation may be due to the ability of the compound 4c to inhibit the release and/or activity of the early mediators involved in carrageenan-induced paw edema. The other compounds showed inhibition in the late phase that could result from inhibition of prostaglandins.

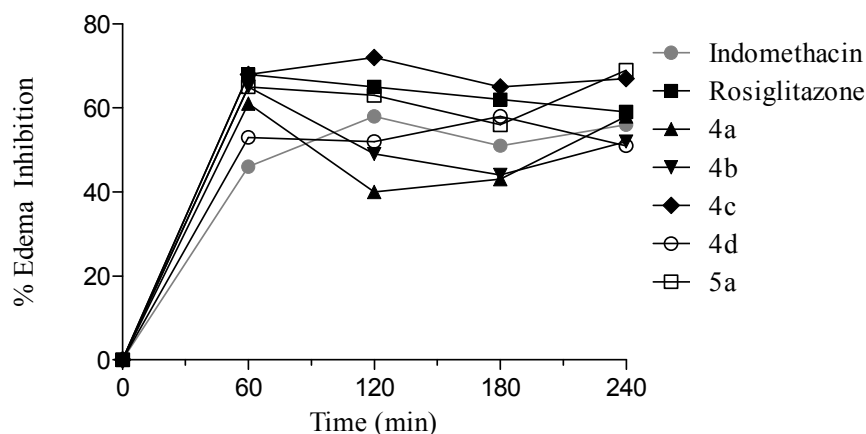


Figure 2 Effect of 5-benzylidene-3-benzyl-4-thiazolidinones on rat paw edema development elicited by carrageenan in the rat. Data are means $\pm$ SEM from $n = 5$ rats for each group.

Such preliminary findings stimulated us to carry out the carrageenan-induced peritonitis assay that could provide additional information. The results obtained in the test of peritonitis induced by carrageenan are shown in table 1. Data analysis showed that the compounds (4a-d-5a) at dose of 3 mg / kg caused a significant reduction in the migration of polymorphonuclear leukocytes when compared with the control group, but showed no significant differences between them. The reference drug indomethacin inhibited cell migration by 58% (4.62 ± 0.3). The statistical analysis shows that thiazolinides derivatives evaluated followed a similar profile to that of indomethacin, no showed significant difference in inhibition of cell migration. The carrageenan triggers an acute inflammation involving sequential release of various inflammatory mediators [18] mainly histamine, serotonin, kinins, prostaglandins and thromboxanes [18,19]. During the inflammatory process induced by carrageenan, prostaglandins, especially PGE₂, increases the formation of peritoneal exudate through the potentiation of the effect of other mediators which increase the permeability of post capillary venules [21]. Probably the mechanism of action of the compounds evaluated is related to decreased vasodilatation of capillaries present in the peritoneal membrane and opening of large pores caused by cells and inflammatory mediators such as neutrophils and prostaglandin E₂.

Table 1 Anti-inflammatory effect of de compounds (4a-d - 5a) on carrageenan-induced peritonitis assay

Compounds	Dose (mg/kg)	PMNL / mL ($\times 10^6$)	Percent inhibition (%)
4a	3	$5,38 \pm 1,25^*$	51
4b	3	$3,91 \pm 0,49^*$	64
4c	3	$3,78 \pm 0,69^*$	65
4d	3	$4,12 \pm 1,27^*$	62
5a	3	$3,6 \pm 0,72^*$	67
Indomethacin	10	$4,62 \pm 0,3^*$	58
Control	-	$10,93 \pm 1,6$	-

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$.

2.3 Measurement of cytokines

The results of the cytokines present in inflammatory exudate of carrageenan-induced peritonitis are shown in table 2. All compounds showed a significant decreased concentrations of TNF- α compared to control (794,32 pg/mL). The compounds 4d and 5a showed potent inhibition for both cytokines (TNF- α and IL-1 β). The thiazolidinediones 4a and 4b showed potent inhibition of TNF- α , but inhibited the IL-1 β slightly. IL-1 β is an important pro-inflammatory mediator involved in the dynamics of inflammation by promoting the expression of adhesion molecules, leukocyte migration and increased vascular permeability [22]. IL-1 β is induced by TNF- α , and shares many of its activities, including the capacity to induce IL-6. This cytokine is often used as a marker for systemic inflammatory reactions because it appears in the circulation conveniently later, when illness is undeniable, and stays high for longer [23].

Recent studies show that PPAR γ agonists act by inhibiting the production of cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. Knowing that thiazolidinics derivatives are part of this class, it is likely that the compounds tested act this way [24].

Over expression of pro inflammatory cytokines such as TNF- and IL-1, are well documented in a number of inflammatory processes [25, 26, 27]. Any successful attempt to block these cytokines would prove to be therapeutically useful.

Table 2 Effects of thiazolidinics derivatives (**4a-d** **5a**). IL-1 β and TNF- α levels on carrageenan-induced peritonitis assay

Compounds	Dose (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
4a	3	87,09 $\pm$ 0,01*	870,96 $\pm$ 0,01*
4b	3	21,37 $\pm$ 0,06*	758,57 $\pm$ 0,05*
4c	3	630,95 $\pm$ 0,01*	562,34 $\pm$ 0,01*
4d	3	44,66 $\pm$ 0,06*	120,22 $\pm$ 0,01*
5a	3	26,30 $\pm$ 0,01*	70,79 $\pm$ 0,01*
Indomethacin	10	1122,01 $\pm$ 0,34	930,0 $\pm$ 0,02
Control	-	794,32 $\pm$ 0,02	891,25 $\pm$ 0,01

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$.

2.4 Cytotoxicity activity

Evaluation of cytotoxic potential was held by MTT assay, which is based on that living cells have the capacity to reduce tetrazolium salt, yellow, the formazan insoluble purple, dashing through the action of the mitochondrial enzyme succinyl dehydrogenase, active only in living cells [28]. The compounds (4a – d), did not show activity, however, the compound (**5a**) showed low active

cytotoxic. The lack of cytotoxicity activity at the dose tested does not necessarily rule out the potential of those compounds with this activity, requiring additional tests using other cell lines and experimental models.

3. Experimental protocols

Chemistry

All chemicals were purchased as reagent grade and used without further purification. Reactions were monitored with analytical thin layer chromatography (TLC) in silica gel 60 F254 plates and visualized under UV (254 nm). Melting points were determined in open capillary tubes on a Quimis 340 capillary melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded in KBr on a BRUKER (IFS 66) grating spectrometer, mass spectra on a Varian Plus (70 eV) R-1010C Delsi-Nermag and NMR spectra on a UNITYplus – 300 MHz – VARIAN spectrometer at 20 °C, using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Mass spectra were recorded on an HCTultra Bruker Daltonics spectrometer on the ESI positive ion polarity.

Synthesis of N-alkylated thiazolidine-2,4-diones

An equimolar solution of sodium hydroxide in an ethanol/water mixture (6:4) was added dropwise with stirring to a suspension of thiazolidine-2,4-dione in the same ethanol/water mixture. A few minutes later, the substituted benzyl chloride was added and the mixture was stirred for a few minutes before being refluxed for 24 h. After cooling at room temperature, the expected compound was precipitated by addition of crushed ice before purification by flash chromatography on silica with chloroform/methanol (92:8) as the eluent. The chemical data on 2,6-difluor-benzyl-thiazolidine-2,4-dione (2) and 2-bromo-benzyl-thiazolidine-2,4-dione (3) were previously reported [12, 34].

Synthesis of 2-cyano-3-substituted-ethyl acrylate esters

A mixture of substituted aromatic aldehydes (32 mmols), ethyl cyanoacetate (32 mmols), piperidin (catalytic amount) and anhydrous benzene, used as solvent, was refluxed at 110°C in a system coupled with a Dean-Stark to separate the water formed. When no more water was formed, reaction was stopped. This time could vary from 4 to 24 hours. Mixture was kept in the refrigerator during 12-24 hours, and crystals formed separated by filtration. The obtained

cyanoacrylate esters were purified by recrystallization with hot ethanol. Intermediates 2 e 3 was previously reported by our group [11]. Compound 4d were synthesized as previously reported [12].

Synthesis of 3,5-substituted thiazolidine-2,4-diones

Equimolar amounts of N-benzylated thiazolidine-2,4-dione and cyanoacrylates were reacted using absolute ethanol as solvent and piperidine as catalyzer. Mixture was heated to 50 °C during a variable time from 15 minutes to 72 hours, depending on reagents consumption velocity. After that, solid formed was filtrated and washed with ethanol and *n*-hexane.

3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-fluor-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, 4a

C₁₇H₁₁BrFNO₂S, Yield: 39,9%. Mp. 175 °C. TLC *n*-hexane: ethyl acetate (9:1) R_f: 0,65. IR cm⁻¹ (KBr): ν 1750, 1675, 1591. ¹H NMR (δ ppm, DMSO-d₆): 8,02 (s, CH), 4,86 (s, CH₂), 7,75 (dd, 2H Benzylidene, J= 5,7 Hz), 7,37 (dd, 2H Benzylidene, J=5,7 Hz), 7,67 (dd, 1H benzyl, J=9,3 Hz), 7,42 (t, 1H benzyl, J=9,0), 7,27 (dt, 1H benzy, J=7,8 Hz), 7,21 (d, 1H benzyl, J= 7,5 Hz). MS, ESI⁺: m/z 415 [M+Na]⁺.

3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, 4b

C₁₈H₁₄BrNO₂S, Yield: 63%. Mp. 154 °C. TLC *n*-hexano: ethyl acetate (7:3) R_f: 0,75. IR cm⁻¹ (KBr): ν 1738, 1680, 1597. ¹H NMR (δ ppm, DMSO-d₆): 7,96 (s, CH), 4,86 (s, CH₂), 2,37 (s, CH₃), 7,56 (d, 2H Benzylidene, J= 78,1 Hz), 7,38 (d, 2H Benzylidene, J=7,8 Hz), 7,67 (dd, 1H benzyl, J= 7,8 Hz; j=1,2 Hz), 7,34 (dt, 1H benzyl, J=7,5 Hz, j=1,2 Hz), 7,26 (dt, 1H benzyl, J=7,8; j=1,5 Hz), 7,18 (dd, 1H benzyl, J=7,8 Hz; j=1,5 Hz). MS, CI⁺: m/z 384 [M-H]⁺.

3-(2-bromo-benzyl)-5-(2-chloro-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, 4c

C₁₇H₁₁BrClNO₂S, Yield: 40%. Mp. 140 °C. TLC *n*-hexane: ethyl acetate (7:3) R_f: 0,86. IR cm⁻¹ (KBr): ν 1744, 1686, 1603. ¹H NMR (δ ppm, DMSO-d₆): 8,09 (s, CH), 4,87 (s, CH₂), 7,64-7,70 (m, 2H Benzylidene), 7,53-7,59 (m, 2H Benzylidene), 7,64-7,70 (m, 1H benzyl), 7,38 (dt, 1H benzyl, J= 7,5 Hz; j=1,5 Hz), 7,29 (dt, 1H benzyl; J=7,78; j=1,5 Hz), 7,25 (dd, 1H benzyl, J= 7,8 Hz, j=1,8 Hz).

3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, 4d

C₁₈H₁₄ Br NO₄S, Yield: 51%. Mp. 210 °C. TLC *n*-hexeno: ethyl acetate (7:3) R_f: 0,47. IR cm⁻¹ (KBr): ν 1744, 1677, 1603. ¹H NMR (δ ppm, DMSO-d₆): 8,08 (s, CH), 4,87 (s, CH₂), 3,29 (s, SCH₃), 8,08 (d, 2H Benzilideno; J=8,4 Hz), 7,91 (d, 2H Benzilideno; J= 8,4 Hz), 7,69 (dd, 1H

benzil; J=7,8 Hz, j=0,9 Hz), 7,37 (dt, 1H benzil; J=7,5 Hz; j=1,5 Hz), 7,29 (dt, 1H benzil, J=7,5; J=1,5 Hz), 7,25 (dd, 1H benzyl, J=7,5 Hz; j=1,5 Hz). MS, ESI+: m/z 474 [M+Na]⁺.

3-(2,6-difluor-benzyl)-5-(4-metylsufonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione, 5a

C₁₈H₁₃F₂NO₄S₂, Yield: 85%. Mp. 160 °C. TLC *n*-hexeno: ethyl acetate (7:3)R_f: 0,36. IR cm⁻¹ (KBr): ν 1750, 1691, 1603. ¹H NMR (δ ppm, DMSO-d₆): 8,02 (s,CH), 4,93 (s, CH₂), 3,27 (s, SCH₃), 8,05 (d, 2H Benzylidene, J=8,4 Hz), 7,87 (d, 2H Benzylic, J=8,4 Hz), 7,44 (dt, 1H benzyl, J=8,4, j=1,5 Hz), 7,13 (dd, 2H benzyl, J=8,4Hz, j=1,8 Hz). MS, ESI+: m/z 432 [M+Na]⁺.

Biological activities

Animals

The experiment used 4 week-old Swiss albino mice males, with weight between 25 and 30 g and wistar rats males, with weigth between 200 and 250 g. Animals were provided by the Bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE); they were kept in a small colony in the animal house at a temperature of 22 ± 3 °C, with 12 hour cycles of light and darkness, receiving standard feed (Purina®) and water as required. The experimental procedure was approved by the Local Committee for Animal Ethics (23076.006588/2008-92 CCB – UFPE).

Paw edema induced by carrageenan

The edema was induced by injecting 0.1 ml of 1.0% (w/v) carrageenan suspension into the sub plantar region of the right hind paw of the rats [29]. All animals (five per group) were given free access to food and water after the sub plantar injections. Control group rats (n = 5) received saline solution and the control groups received 10 mg/kg indomethacin and 3 mg/kg rosiglitazone, orally. The test groups animals were treated orally with 3 mg/kg of the compounds (4a-d -5a) 1 hour before the carrageenan injection. The paw volume was measured before administering carrageenan (V₀) and 60, 120, 180 and 240 min after (V_t). Inflammation was calculated as the increase in volume (ml) of the paw after treatment subtracted of the basal volume. Results were expressed as percentage of inhibition of edema, calculated according to the following formula [1-treated/control] x 100

Peritonitis induced by carrageenan

The compounds were administered orally at single dose of 3 mg/kg, indomethacin at a dose of 10 mg/kg p.o. and carrageenan (1%) was injected intraperitoneally 1 h later. After 4 h the animals were sacrificed and phosphate buffered saline was used during the collection of peritoneal fluids. The total leukocyte count was determined in hematology analyzer Micros 60®. The exudates were centrifuged and the supernatant stored at - 20 ° C for analysis of TNF-α and IL-1α [30, 31].

Measurement of cytokines

Tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-1 β production was evaluated in the peritonitis exudate at 4 h after the induction of peritonitis by carrageenan injection as described previously [30,31]. The assay was carried out using a sandwich ELISA kits specific for mice, according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, California, USA) with a lower detection limit of 10 pg/ml.

Cytotoxicity activity

In vitro evaluation of cytotoxicity activity was carried out on three tumor cell lines NCI-H292 (human lung carcinoma), HT-29 (human colon carcinoma) and MCF-7 (human breast carcinoma). The NCI-H292, HT29 and MCF-7 cell lines were maintained in a suitable medium (Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium [Sigma]) with the addition of 10% fetal bovine serum (Sigma) and 1% L-glutamine (200 mM). Cell viability was determined by 0.4% Trypan blue (Merck). Cell counting was performed on a Leitz inverted microscope using a hemocytometer. The cell suspensions were distributed in 96-well culture plates (198 μ L in each well). These were incubated at 37 °C and 5% humidity in an appropriate incubator. After 24 h of incubation, the compounds (**4a-d** - **5a**) were added (at a concentration of 50 μ g/mL- single dose) and the plates again incubated at 37 °C [32]. After 72 hours, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazole (MTT) bromide (25 μ L) was added to each well at a concentration of 5 mg/mL in PBS. The plates were then left for two hours in an incubator (37 °C). Subsequently, the culture medium and MTT were removed by aspiration, and dimethylsulfoxide (100 μ L) was added to each well to dissolve the crystals that formed [33]. To verify the percentage of inhibition, optical readings were performed on a Multiscan-type automatic plate reader at 595 nm. All measurements were performed in triplicate.

4. Conclusion

In summary, this paper describes the synthesis, spectral characterization and evaluation of anti-inflammatory activity and cytotoxicity of some 5-benzyliden-3-benzyl-2,4-dione derivatives. All compounds showed a wide range of promising anti-inflammatory activities. These results provide the basis for further studies about the anti-inflammatory activity to investigate the possible mechanism of action of drug candidates.

Acknowledgements

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), INCT_if (Instituto Nacional em Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica), and the Brazilian Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for support for this joint research program.

References

1. Ottaná, R.; Maccari, R.; Barreca, M.L.; Bruno, G.; Rotondo, A.; Rossi, A.; Chiricosta, G.; Di Paola, R.; Sautebin, L.; Cuzzocrea, S.; Vigorita, M.G. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 4243–4252.
2. Liesen, A. P.; Aquino, T. M.; Góes, A. J. S.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. *Química Nova* **2008**, 31, 369–376.
[1]
3. Verma, A.; Saraf, S. K. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 43, 897–905.
[2]
4. Albuquerque, J.F.C.; Rocha Filho, J.A.; Brandão, S.S.F.; Lima, M.C.A.; Ximenes, E.A.; Galdino, S.L.; Pitta, I.R.; Chantegrel, J.; Perrissin, M.; Luu-Duc, C. Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. *Il Farmaco* **1999**, 54, 77–82.
[3]
5. Oliveira, A.C.P.; Bertollo, C.M.; Rocha, L.T.S.; Nascimento Jr., E.B.; Costa, K.A.; Coelho, M.M. Antinociceptive and antiedematogenic activities of fenofibrate, an agonist of PPAR alpha, and pioglitazone, an agonist of PPAR gamma. *European Journal Pharmacology* **2007**, 561, 194–201.
[4]
6. Leite, L.F.C.C.; Mourão, R.H.V.; Lima, M.C.A.; Galdino, S.L.; Hernades, M.Z.; Neves, F.A.R.; Barbe, J.; Pitta, I.R. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 42, 1263–1271
[5]
7. Patil, V.; Tilekar, K.; Mehendale-Munj, S.; Mohan, R.; Ramaa, C. S. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-benzylidene-2,4-thiazolidinedione derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 45, n. 10, p. 4539–4544.
[6]
8. Youssef, A.M.; White, M.S.; Villanueva, E.B.; El-Ashmawy, I.M.; Klegeris, M. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolyl-2,4-thiazolidinediones as anti-inflammatory and neuroprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 2019–2028.
[7]
9. Rawal, R.K.; Prabhakar, Y.S.; Katti, S.B.; De clerq, E. 2-(Aryl)-3-furan-2-ylmethyl-thiazolidin-4-ones as selective HIV-RT Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 6771–6776.
[8]
10. Giaginis, C.; Giagini, A.; Theocharis, S. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. *Pharmacological Research* **2009**, 60, 160–169.
[9]
11. Mourão, R. H.; Silva, T. G.; Soares, A. L. M.; Vieira, E. S.; Santos, J. N.; Lima, M. C.A.; Lima, V. L. M.; Galdino, S. L.; Barbe, J.; Pitta, I. R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 40, 1129–1133

12. Barros, C.D.;Amato, A.A.;Oliveira, T.B.; Iannini, K.B.R.; Silva, A.L.; Silva, T.G.;Leite, E.S.;
Hernandes, M.Z.; Lima, M.C.A.;Galdino,S.L.; Neves, F.A.R.; Pitta,I.R. Synthesis and anti-
inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. *Bioorganic &*
Medicinal Chemistry **2010**,18, 3805–3811.
13. Sur,T., Pandit, S.,Battacharyya,D.,Kumar,A.C.K.,Lakshmi,M.S.,Chatttopadhyay, D., Mandal, S.C.
Studies on the anti-inflammatory activity of Betula alnoides bark. *Phytotherapy Research*, **2002**, 16,
669–67
14. Morebise, O., Fafunso, M.A., Makinde, J.M., Olajide, O.A., Awe, E.O. Anti-inflammatory and
analgesic property of leaves of Gongronema latifolium. *Phytotherapy Research* **2002**, 16, S75–S77
15. Maity, T.K.,Mandal, S.C.,Mukherjee, P.K. Studies on anti-inflammatory effect of Cassia tora leaf
extract (FamLeguminosae). *PhytotherapyResearch* **1998**, 12, 221–223
16. Cifuentes, D.A., Simirgiotis, M.J., Favier, L.S., Rotelli, A.E., Pelzer, L.E. Anti-inflammatory activity
from aerial parts of Baccharis medullosa, Baccharis rufescens and Laennecia sopherifolia in mice.
Phytotherapy Research **2001**, 15, 529–531
17. Pérez-Gurrero, C., Herrera, M.D., Ortiz, R., de Sotomayor, M.A., Fernández,
M.A.Apharmacological study of Cecropia obtusifolia Betrol aqueousextract. *Journal of*
Ethnopharmacology **2001**, 76, 279–284
[10]
18. Panthong A., Kanjanapothi D., Taesotikul T., Phankummoon A., Panthong K., Reutrakul V. Anti-
inflammatory activity of methanolic extracts from Ventilago harmandiana Pierre. *Journal of*
Ethnopharmacology **2004**, 91, 237-242.
19. Carvalho, A. A. V. Avaliação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória da *Neolignana*
grandisina em modelos de dor e inflamação induzidas em camundongos. 2008. 140f.
[11]
20. Damas, J.; Bourdon, V.; Remacle-Volon, G.; Adam, A. Kinins And Peritoneal Exudates Induced
By Carrageenin And Zymosan In Rats. *British Journal of Pharmacology* **1990**, 418-22
[12]
21. Jean, T.; Bodinier, M.C. Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their
release. *Angiology* **1994**, 45, 554-559.
[13]
22. Hallegua, D.S.; Weisman, M.H. Potential therapeutic uses of interleukin-1 receptor
antagonists in human diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2002**, 61, 960- 967.
[14]
23. Clark I.A.; Alleva, L. M. , Vissel, B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease.
Pharmacology & Therapeutics **2010**, 128, 519–548.
24. Cuzzocrea, S.; Pisano, B.; Dugo, L.; Ianaro, A.; Maffia, P.; Pattel, N.S.A.; Di Paola, R.; Ialenti,T.;
Genoveze, G.; Chatterjee, T.K.; Di Rosa, M.; Caputti, A.P.; Thiemermann, C. Rosiglitazone, a

- ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *European Journal of Pharmacology* **2004**, 483, 79–93.
25. Wong, H.R., Finder, J.D., Wasserloos, K., Lowenstein, C.J., Geller, D.A., Billiar, T.A., Pitt, B.R., Davies, P. Transcriptional regulation of iNOS by IL-1 beta in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* **1996**, 271, 166–171.
 26. Perkins, D.J., Kniss, D.A. Tumor necrosis factor-alpha promotes sustained cyclooxygenase-2 expression: attenuation by dexamethasone and NSAID's. *Prostaglandins* **1997**, 54, 727–743
 27. Dinarello, C.A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical Experimental Rheumatology* **2002**, 20, S1–S13.
 28. Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* **1996**, 4, 14-19.
 29. Winter CA, Risley EA, Nuss GW Carrageenan-induced o edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1962, 111, 544-547.
 30. Prasad, N., Gupta, A. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Peritoneal Dialysis International*, **2005**, 25, 207–222.
 31. Uchôa, F.T.; Silva, T.G.; Lima, M.C.A; Galdino, S.L.; Pitta, I.R.; Costa, T.D. Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2009**, 61, 339-345.
 32. Weisenthal, L.M.; Marsden, J.A.; Dill, P.L.; Macaluso, C.K. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Research* **1983**, 43, 749-757
 33. Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Hursey, M.L.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* **1988**, 48, 589-60
 34. Bozdağ-Dündar O, Ceylan-Unlüsoy M, Verspohl EJ, Ertan R. Synthesis and antidiabetic activity of novel 2,4-thiazolidinedione derivatives containing a thiazole ring. *Arzneimittelforschung*. **2006**, 56, 621-5.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from authors

4. MANUSCRITO II

Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects by the thiazolidinics derivatives 3,5-dissubstituted

Diana Jussara do Nascimento Malta¹, Maria Andrea de Souza Carmino¹, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Maria do Carmo Alves lima¹, Suely Lins Galdino¹, Teresinha Gonçalves da Silva¹, Ivan da Rocha Pitta¹

¹ Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE – Brasil

Biological activity thiazolidinics derivatives

Correspondence to: Teresinha Gonçalves da Silva, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE - Brasil

Fone: 55-81-21268347 / Fax: 55-81-21268346

E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects by the thiazolidinics derivatives 3,5-disubstituted

Diana Jussara do Nascimento Malta¹, Maria Andrea de Souza Carmino¹, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Maria do Carmo Alves lima¹, Suely Lins Galdino¹, Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}, Ivan da Rocha Pitta¹

¹ Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE – Brasil

The aim of this study was to investigate the antiinflammatory and antinociceptive effect of 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-thiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-125) and 3-(2,6-difluor-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-thiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-192) on air pouch test and Adjuvant-induced chronic arthritis. The anti-inflammatory activities of the compounds were evidence by a reduction in leukocyte migration and release of TNF- α and IL-1 β in both air pouch. However, the pretreatment with thiazolidinics compounds was not capable to inhibit the initiation of arthritis or change the disease course. Nevertheless, both derivatives, mainly LPSF/GQ-192, showed therapeutic effect represented by the ability to reduce the edema in this model of chronic inflammation. The thiazolidinics compounds LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 reduced the nociception produced by acetic acid by 58,8% and 51,6%, respectively. In the hotplate test the compounds did not present antinociceptive activity when compared to the control group. But, the biochemical parameters for AST and ALT showed to be high. Based on these data, we can infer that the thiazolidinics compounds LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 shows a significant anti-inflammatory and antinociceptive profile, whose power has not yet been determined. Thus, the results indicate that thiazolidinics derivatives tested exhibit activities antiinflammatory, antinociceptive and promising, probably through modulation of the immune system leading to a decrease in proinflammatory cytokines. It is suggested that the antinociceptive activity of the derivatives is due to peripheral mechanisms, acting only on inflammatory pain.

Key words: Thiazolidinics derivatives, anti-inflammatory, Air-pouch, cytokines, arthritis, antinociception, hot plate, writhing test.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects articular and periarticular as well as tendons, however, the anatomical structure most affected is the synovial membrane (Cruz and Branco, 2002). RA is the most common autoimmune disease, affecting 1–1.5% of the population worldwide. This disease affects between 1 and 1.5% of world population, the age group 40 to 60 years of highest incidence. However, due to the expected aging of the population, it is estimated that by 2030 the incidence of disease increases considerably (Khurama e Barney, 2005; Abell et. al., 2005). Research indicates that the innate immune system may be involved in the development of rheumatoid arthritis, which would be responsible for the recruitment of inflammatory cells into the joint cavity culminating with the release of factors such as cytokines and prostaglandins that contribute to the perpetuation of inflammation (MÜLLER LADNER, 2005). Among the proinflammatory cytokines crucial to the development of RA are IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Choy and Panayi, 2001). Nowadays, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) supplemented with steroid hormone remains the major recommended strategy for its RA treatment. It is known, long-term treatment with NSAIDs may result in serious side effects, such as gastrointestinal ulcerogenicity and renal morbidity (Pincus et al., 1992). Many drugs used routinely in the clinic may have side effects such as hepatotoxicity, which may limit its use and expected benefits (Bertolami, 2005).

In this context, it is necessary a detailed study of potential drugs for better positioning against its use. Thus, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effects by thiazolidinics derivatives 3,5-disubstituted: 3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-125) e 3-(2,6-difluor-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-192). For evaluation for about the anti-inflammatory activity was performed using the experimental models air pouch and Adjuvant-induced chronic arthritis, while the antinociceptive activity was evaluated by writhing test induced by acetic acid and hot plate test. Moreover, it was determined profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and evaluated the concentration of some enzymes considered indicators of hepatotoxicity, such as alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST)

METHODS

Animals

The experiment used 4 week-old Swiss albino mice males, with weight between 25 and 30 g and 12 week-old Wistar rats males, with weight between 200 and 250 g. Animals were provided by the Bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE); they were kept in a small colony in the animal house at a temperature of 22 ± 3 °C, with 12 hour cycles of light and darkness, receiving standard feed (Purina®) and water as required. The experimental procedure was approved by the Local Committee for Animal Ethics (23076.006588/2008-92 CCB – UFPE).

Drugs and Reagents

The derivatives 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-125) and 3-(2,6-difluor-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-192) were synthesized and provided by the Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The following drugs and reagents were used: Fentanyl was purchased by Cristália, São Paulo – Brasil. Dexamethasone and Diclofenac were purchased by Aché, São Paulo – Brasil. HEMSTAB EDTA was purchased by Labtest, São Paulo – Brasil. Kit Mouse TNF- α Elisa and Kit Mouse IL-1 β Elisa was purchased by eBioscience, São Paulo - Brasil; Glacial Acetic Acid was purchased by VETEC, São Paulo – Brasil. Carrageenan and indomethacin were purchased from Sigma, USA.

Air pouch test

The anti-inflammatory effect was tested by the production of air pouches on the dorsal cervical region of mice of 25–30 g by a subcutaneous injection of 2.5 mL of sterile air on day 0, followed by a second injection of 2.5 mL of sterile air 3 days later. On day 6, the 1 mL of 1% (w/v) carrageenan solution was injected into the cavity. The thiazolidinedione 3,5-disubstituted compounds (LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192) and the reference drug diclofenac were administered orally 1 h before the injection of carrageenan. After 6 h, the mice were sacrificed by ether exposure, and the pouches were washed with 3 mL of saline solution containing 3 μ M of EDTA. The total leukocyte count was determined in hematology analyzer Micros 60®. The exudates were centrifuged and the supernatant stored at - 20 ° C for analysis of TNF- α and IL-1 α (Kim et al., 2006; Barros et al., 2010).

Quantification of IL-1 β and TNF- α levels

Tumor necrosis factor α (TNF- α) and Interleukin-1 β (IL-1 β) production was evaluated in the air pouch exudate at 6 h after the induction of inflammation as described previously referencia . The assay was carried out using a sandwich ELISA kits specific for mice, according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, California, USA) with a lower detection limit of 10 pg/ml.

Adjuvant-induced chronic arthritis

To evaluate the effects of chronic inflammation, was used the method described by Newbould, 1963 with modifications. The thiazolidinedione 3,5-disubstituted compounds (LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192) and the reference drug diclofenac were administered orally at doses of 3 mg / kg and 10 mg / kg respectively. The doses were chosen according to pilot tests and previous studies by our group (Barros et al., 2010). The animals in the control group received saline. Six rats were used to evaluate the effect of these compounds for treated and control groups. The doses were administered once daily for 14 consecutive days. On the third day of treatment, 25 μ L of Freund's complete adjuvant (FCA) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) was injected into the tissue subplantar right hind paw of each rat. The paw edema was measured daily from the third to fourteenth day and the twenty-first day through plethysmometer (UGO Basile).

Biochemical parameters

Rats were anesthetized with (ketamina and xilazina 8:2) and the blood was collected by cardiac puncture. Blood was allowed to clot and the serum was separated by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. Serum levels of ALT and AST as markers of hepatic function were measured using commercial kits, according to manufacturer's instructions.

Writhing test

The writhing test described by Koster et al. (1959) and modified by Oliveira et al. (2001) was adopted. Animals were divided into four groups of six each and pretreated as above. Thirty minutes later, 10 ml/kg of 1% aqueous solution of acetic acid was given to all mice i.p. For each mouse abdominal constrictions resulting from the injection of acetic acid that occur within 20 min after challenge were cumulatively counted. Antinociceptive effect was expressed as the reduction in the

number of writhes for those animals pretreated with compounds LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 at dose 3 mg/kg and the diclofenac 10 mg/kg (compared with control group).

Hot plate test

The mice were placed individually on a hot plate with the temperature adjusted to 55 ± 1 °C. Exposure to heat continued until nocifensive reaction of either hind paw occurred. The animals were tested in only one series of measurements and the typical responses were hind paw shaking and/or lifting. The latency to the response was recorded and the time of maximum permanence permitted on the hot surface was 30 s. Analgesic effect was defined as an increase in withdrawal latency. The reaction time was recorded at 1, 2 and 3 h after the treatment with LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 at dose 3 mg/kg and Fentanyl® at doses 0,2 mg/kg given orally.

Data analysis

All values in the figures and tables are expressed as means $\pm$ SEM. The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. Differences between the drug-treated groups and the control group were evaluated by $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Air pouch

As shown in table 1 both compounds inhibit the leukocyte migration when compared with control ($15,64 \pm 1,9 \times 10^6$) at dose of 3 mg/kg. The compound that showed the largest percentage of inhibition of cell migration was LPSF/GQ-192 (73, 9%/ $4, 08 \pm 1,5 \times 10^6$). The compound LPSF/GQ-125 (69, 7%/ $4, 26 \pm 0,5 \times 10^6$) was statistically different from indomethacin ($2, 08 \pm 0, 46 \times 10^6$) and as well as LPSF/GQ-192 did not show difference when compared with the standards diclofenac (77%/ $3,56 \pm 1,03$) and rosiglitazone (82%/ $2.71 \pm 0.57 \times 10^6$), a drug belonging to the same class of compounds.

Table 1. Effects of LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 upon cell migration on inflammation induced by carrageenan in the murine air pouch model .

Compound	Dose (mg/kg)	N° of PMNL /mL (x10 ⁶)	Inhibition (%)
LPSF/GQ-125	3	4,26± 0,5* [#]	69,7
LPSF/GQ-192	3	4,08± 1,5*	73,9
Indomethacin	10	2,08±0,4*	86,7
Rosiglitazone	3	2,71±0,5*	82,6
Diclofenac	10	3,56±1,0*	77,0
Control	-	15,64±1,9	-

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$

[#] Statistically significant from Standard indomethacin $p < 0.05$

Quantification of IL-1 β and TNF- α levels

The data show that both compounds inhibited TNF- α concentration at dose 3 mg/kg compared to control (1096, 47 pg/mL). The compounds LPSF/GQ-192 and LPSF/GQ-125 showed 239, 88 pg/mL e 416,86 pg/mL, respectively . The standard drugs exhibited indomethacin (954, 99 pg/mL), rosiglitazone (426, 57 pg/mL) and diclofenac (1000,87 pg/mL) at doses 10 and 3mg/kg, respectively . Regarding to production of IL-1 β both compounds also decreased the production of cytokines (338.84 pg / mL) and LPSF/GQ-125 (691, 83 pg/ml) compared with control (870, 96 pg/ml). The exudates obtained from animals treated with standards drugs rosiglitazone and indomethacin showed a concentration of IL-1 β to 676, 00 pg/mL and 134, 89 pg/mL, respectively (table 2).

Table 2 Effects of LPSF/GQ-125, LPSF/GQ-192, rosiglitazone, indomethacin and diclofenac upon TNF- α and IL-1 β , levels on inflammation induced by carrageenan in the air pouch model.

Treatment	Dose (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
LPSF/GQ-125	3	416,86±0,01*	691,835±0,004*
LPSF/GQ-192	3	239,88±0,007*	338,84±0,03*
Indomethacin	10	954,99±0,02*	831,76±0,01*
Rosiglitazone	3	426,57±0,02*	676,00±0,01*
Diclofenac	10	1000,87±0,01*	935,00±0,01
Control	-	1096,47±0,01	870,96±0,01

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$

Adjuvant-induced chronic arthritis

The pretreatment with thiazolidinics derivatives was not capable to inhibit the initiation of arthritis or change the disease course. However, both derivatives, mainly LPSF/GQ-192, showed therapeutic effect represented by the ability to reduce the edema in this model of chronic inflammation. The

edema formed after the injection of adjuvant was daily measured using a plethysmometer and the results are shown in Figure 1. Both derivatives were able to inhibit, in a discreet way, the edema when compared to the control group. Furthermore, the animals treated with the derivatives showed similar results to those receiving diclofenac sodium. During the treatment, the edema lowers values to the animals treated with LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 were found on the eighth day of the test. The compound LPSF/GQ-125 inhibited the paw edema 24.62% on the thirteenth day of treatment, while the LPSF/GQ-192 showed the highest percentage of inhibition on the eighth day of treatment (30.93%).

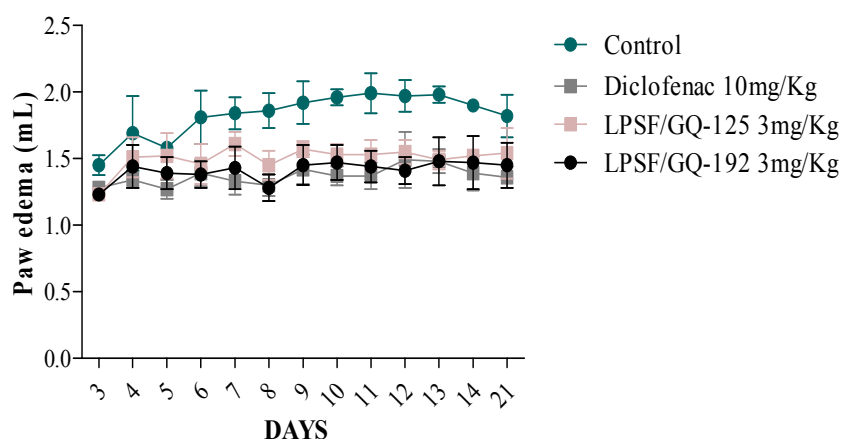


Figure 1. Effect of LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 on rat paw edema development elicited by FCA.

Biochemical parameters

The results in Table 3 show the elevation of serum AST and ALT when compared to control AST (54,17± 3,83), ALT (38,05± 4,57). To compound LPSF/GQ-125 results were AST (305,25±31,12), ALT (316,12±5,04), while the compound LPSF/GQ-192 showed the following results: AST (327,18±27,71), ALT (359,91±2,74). These results were statistically significant when compared to control group.

Table 3 Serum activity of AST and ALT (14 days post treatment with LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ192)

Treatment	AST (UL ⁻¹)	ALT (UL ⁻¹)
LPSF/GQ-125 (3m/kg)	305,25±31,12*	316,12±5,04*
LPSF/GQ-192 (3mg/kg)	327,18±27,71*	359,91±2,74*
Diclofenac (10 mg/Kg)	277,33±18,55*	287,52±5,48*
Control (Vehicle)	54,17± 3,83	38,05± 4,57

*Statistically significant from control group: $p < 0.05$

Writhing test

The effect of thiazolidinics derivatives 3, 5-disubstituted LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 on acetic acid-induced writhing behavior in mice are shown in table 3. The acetic acid injection (1%; 0.1ml/10g) induced a significant number of writhing in the control group. Both compounds reduced statistically significantly the number of writhes induced by intraperitoneal injection of acetic acid in mice when compared with the control group. The derivative LPSF/GQ-125 (58.8%) showed a statistically similar to the diclofenac (68.7%).

Table 4. Effect of LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 in total number of writhes induced by acetic acid in 20 min

Compound	Dose (mg/kg)	Writhing (n°/20min)	Inhibition %
LPSF/GQ-125	3	34,4±5,06* [#]	58,8
LPSF/GQ-192	3	40,4±7,8*	51,6
Diclofenac	10	26.8 ± 4.9*	68
Control	-	83,5±4,82	-

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$

[#] Statistically significant from Standard group: $p < 0.05$

Hot Plate

The results are shown in table 4 and indicate that at all times of analysis the compounds did not present antinociceptive activity when compared to the control group.

Table 5 Effect of LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 on the response latency at 0, 60, 120 and 180 min after administration of drugs in the hot plate test in mice.

Compounds	Dose (mg/Kg)	Latency (s)			
		0	60	120	180
LPSF/GQ-125	3	7,18 ± 1,27	8,96±0,85	7,64 ± 1,38	9,88±1,82
LPSF/GQ-192	3	7,26 ± 0,75	8,64 ± 0,71	6,78 ± 0,88	6,52± 1,74
Fentanyl	0,2	9,54 ± 1,72	18,1±0,6*	11,3±0,9*	8,8±1,1
Control	-	9,30 ± 0,49	9,7 ± 1,42	8,84 ± 1,31	8,58 ± 1,48

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$

Discussion:

The present work investigates the possibility of thiazolidinics derivatives LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 being able to inhibit inflammation during phases of the inflammatory process, as well as the capacity to act on nociception in different experimental models. The dose used in the experiments in this article was previously chosen based on tests done by our group previously (Uchôa, 2009; Barros et al., 2010). Our study relative to the murine air pouch model induced by carrageenan showed that thiazolidinics derivatives have pronounced anti-inflammatory effects, reducing both cell migration and levels of major proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β). This animal model mimics rheumatoid arthritis. The induction of inflammation by carrageenan into subcutaneous air pouch forms a membrane that presents similar characteristics to the inflamed synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis (Sedgwick; Lees, 1986). It is, therefore, a model used for screening potential drug candidates to treat arthritis. Both derivatives were promising in the inhibition of cell migration on this model of acute inflammation. The results reported here corroborate the results of previous studies performed in our research group (Barros et al., 2010). It is noteworthy that in rheumatoid arthritis TNF- α and IL-1 β participate in the initiation and perpetuation of inflammation. Inhibition of TNF- α leads to reduced IL-6 levels, as well as inhibiting the production of IL-1 β decreases the destruction of cartilage and bone joints (Joosten et al., 1999). As the results were promising in this preliminary test, suggesting that these compounds may have anti-arthritic effects, in the next step was to evaluate the compounds LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 in the model of arthritis induced by Freund's complete adjuvant (CFA). This model has been widely used to evaluate the activity of new anti-arthritic drugs (Bourgerie, 1994). The justification for using of this model of arthritis in animals is the similarity that it has with rheumatoid disease in human (Billiau; Matthys, 2001). These similarities include histopathological changes cellular infiltration, hypersensitivity and swelling of the affected joint (GOMES, 2008). Pre-treatment with the derivatives, especially LPSF/GQ-192, was able to reduce the manifestation of some clinical signs of arthritis, such as bone deformities and edema. There are evidences that reducing or eliminating the production of TNF- α and IL-1 β are important targets for treatment of arthritis (McCulloch et al., 2006). Furthermore, the action of these compounds can also be associated with a probable inhibition of the enzyme cyclooxygenase, with the consequent inhibition of prostaglandin synthesis, especially PGE₂ and PGI₂, leading to decreased vascular permeability and edema reduction. RA is a severe and debilitating chronic inflammatory disease, with varied location, being more common in synovial joints and periarticular tissues, being characterized by pain and aggressive deformities. Therefore, an effective drug should reduce the inflammatory process and combat the pain. In our study to evaluate the antinociceptive, were used the writhing test and the hot

plate test. First we evaluated the effect of thiazolidinediones LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 on acetic acid-induced writhing. Acetic acid acts by releasing endogenous mediators that stimulate the nociceptive neurons causing, on the peritoneal level, increased levels of PGE2 and PGF2a, serotonin, histamine, as well as release of bradykinin and cytokines, as TNF- α and IL-8 (DERAEDT et al., 1980; RIBEIRO et al., 2000). The writhing induced by acetic acid allows to detect both central and peripheral antinociceptive effect, being, therefore of low specificity and widely used as a preliminary test that must be followed by other methodologies to assist in evaluating the antinociceptive profile (PIRES et al., 2004; SILVA, 2009). In this context, it was necessary to use a more specific test to confirm the profile of activity of the compounds tested. The hot plate test is a model in which temperature represents a noxious stimulus that activates nociceptors directly (Le Bars et al., 2001). This test allows evaluate predominantly activity of drugs that act at the level of central nervous system, such as fentanyl and morphine, which increases the latency time on the nociceptive response in hot plate (Loh et al. 1976; Levy e Proudfit, 1977; Oliveira et al., 2007). The acute treatment with with thiazolidinediones LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 did not inhibit the nociceptive response in hot plate test. So, it is suggested that these compounds do not cause changes in central nociceptive response. There is not evidence that the thiazolidinediones promote nociceptive effects related to CNS (Oliveira et al., 2007). Hepatic enzyme levels were shown to be high with the need for studies about its hepatotoxicity. In summary, studies reported in this paper suggest that the efficacy of the compounds tested is probably is associated with inhibitory effects upon the formation of mediators such as bradykinin, histamine, and prostaglandins and, as already noted, with its ability to reduce levels of TNF- α and IL-1 β .

Conclusions:

This work has been shown that derivatives and LPSF/GQ-125 LPSF / GQ 192 have anti-inflammatory and anti-nociceptive, the effect being antinociceptive related inflammatory pain, probably not involving central mechanisms. The compounds appear to act more effective in acute inflammation, probably by modulating innate immune system, since it decreased the production of TNF- α and IL-1 β , however, was not very effective in reducing symptoms of arthritis, although it reduced the swelling of the joints. However, future studies on the toxicity of these compounds are necessary since its chronic use has caused an increase in liver enzyme levels.

References:

- Abell, J. E., Hootman, J. M., Zack, M. M., Moriarty, D., Helmick, C. G. Physical activity and health related quality of life among people with arthritis. *J. Epidemiol. Community Health*, 59, 380-385 (2005).
- Barros, C. D., Amato, A. A. Oliveira, T. B., Iannini, K. B. R., Silva, A. L., Silva, T. G., Leite, E. S., Hernandez, M. Z., Lima, M. C. A., Galdino, S. L., Neves, F. A. R., Pitta, I. R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 3805-3811 (2010).
- Bendele, A. M. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 1, 377-385 (2001).
- Bertolami, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arq. Bras. Cardiol.*, 85, (2005).
- Bértolo, M. B., Brenol, C. V., Schainberg, C. G., Neubarth, F., Lima, F. A. C., Laurindo, I. M., Silveira, I. G., Pereira, I. A., Loures, M. A. R., Azevedo, M. N., Freitas, M. V. C., Neto, M. S. P., Xavier, R. M., Giorgi, R. D. N., Kowalski, S. C., Anti, S. M. A. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia Rev. Bras. Reumatol.*, 47, 151-159 (2007).
- Billiau, A., Matthys, P. Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune disease. *J. Leukocyte Biol.*, 70, 846-860 (2001).
- Bourgerie, S. A. F. Estudo do efeito anti-inflamatório do veneno de abelha *Apis mellifera* africanizada em modelos de inflamação aguda e crônica. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, UEC, Campinas. (1994).
- Choy, E. H., Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New. Engl. J. Med.*, 344, 907-916 (2001).
- Cruz, M., Branco, J.C., Artrite Reumatóide: Fatores de Prognóstico e segmento. *Acta Reumatol Port.*, 27, 183-190 (2002).
- Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F., Flahaut, M. Release of prostaglandins E and F in an allergic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.*, 61, 17-24 (1980).

Gomes, R. P., Atividade física no tratamento de artrite induzida por adjuvante de Freund: Efeito na nocicepção, edema e migração celular. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). UFSC., (2008).

Irwin, S. Comparative observacional assessment: I. a. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology*, 13, 222-257 (1968).

Joosten, L. A., Radstake, T. R., Lubberts, E., van den Bersselaar, L. A., van Riel, P. L., van Lent, P. L., Barrera, P., van den Berg, W. B. Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 339-47 (2003).

Khurana, R.; Berney, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Patophysiol.*, 12, 153-165 (2005).

Kim, J. Y., Hwang, Y. P., Kim, D. H., Han, E. H., Chung, Y. C., Roh, S. H., Jeong, H. G. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Carrageenan-Induced Inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 858–864 (2006).

Koster R., Anderson M, Beer. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.*, 18, 412 (1959).

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

Levy, R. A., Prouditt, H. K., 1977. The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 202, 437-445 (1977).

Loh, H. H., Tseg, L. F., Wei, E., Li, C. H. Beta-endorphin is a potent analgesic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 2895-2898 (1976).

Newbould, B. B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. Br. J. Pharmacol., 21, 127-136 (1963).

Mcculloch, C. A.; Downey, G. P.; El-Gabalawy, H. Signalling Platforms that Modulate the Inflammatory Response: New Targets for Drug Development. **Nat Rev Drug Disco**, 5, 864-876 (2006)

Müller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R. E., Neidhart, M., Gay, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature*, 1, 2 (2005).

Oliveira, A. C. P., Bertollo, C. M., Rocha, L. T. S., Jr. Nascimento, E. B., Costa, K. A., Coelho, M. M. Antinociceptive and antiedematogenic activities of fenofibrate, na agonist of PPAR alpha, and pioglitazone, na agonist of PPAR gamma. *Eur. J. Pharmacol.*, 561, 194-201 (2007).

Pincus, T., Marcum, S.B., Callahan, L.F., Long-term drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices. II. Second line drugs and prednisone, *J. Rheumatol.*, 19, 1885–1894 (1992).

Pires, P. A., Malvar, D.C., Blanco, L.C., Vignoli, T., Cunha, A. F., Vieira, E., Dantas, T. N.C., Maciel, M. A. M., Côrtes, W. S., Vanderlinde, F. A. Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da *capsicum frutescens* – Solanaceae (pimenta malagueta). *Revista UFRPE. Seropédica*, 24, 129-134, (2004).

Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Thomazzi, S. M., Pascholato, A. B. P., Poole, S., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 387, 111-118 (2000).

Sedgwick, A. D., Lees, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents and Actions* 18, 429–439 (1986).

SILVA, I. K. C. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de novos derivados N-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UFAl., (2009).

Uchôa, F. T., Silva, T. G., Lima, M. C. A., Galdino, S. L., Pitta, I. R., Costa, T. D.¹ Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 339–345, (2009).

Effects evaluation of the thiazolidinics derivatives 3,5-disubstituted against carbon tetrachloride-induced liver injury

Diana Jussara do Nascimento Malta¹, Maria Andrea de Souza Carmino¹, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Maria do Carmo Alves Lima¹, Suely Lins Galdino¹, Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}, Ivan da Rocha Pitta¹

1 Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE - Brasil

Correspondence to: Teresinha Gonçalves da Silva, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE - Brasil

Fone:55-81-21268347 / Fax: 55-81-21268346

E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Abstract

The aim of this study was to investigate the hepatic effect 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-tiazolidina-2, 4-diona (LPSF/GQ-125) e 3-(2, 6-difluor-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-tiazolidina-2, 4-diona (LPSF/GQ-192) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. The animals received for 7 days LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 (3 mg/kg; per oral, p.o.). In the eighth day, rats received injection with 2.5% CCl₄ dissolved in olive oil at a dose of 1 ml/kg body weigh (1 mg/kg; intraperitoneal, i.p.). Twenty-four hours after CCl₄ administration animals were euthanized and plasma and liver were removed to the biochemical and histological analysis. Pre-treatment of rats with LPSF/125 and LPSF/192 increase serum levels of AST, ALT and ALP enzyme. The results showed that the compounds tested did not protect animals against the damage induced by CCl₄ at dose (3 mg/kg). The hepatotoxic effect of on acute liver injury induced by CCl₄ in rats will be shown the following.

Key words: Thiazolidinics derivatives, carbon tetrachloride, liver injury

INTRUDUCTION

Widely used to induce acute hepatic damage in experimental animal models the carbon tetrachloride (CCl₄) is a potent hepatotoxic chemical. Reductive metabolism of the hepatotoxin, CCl₄, by CYP450 involves the production of the trichloromethyl free radical (CCl₃), which interacts with oxygen to form the highly toxic CCl₃O₂ (Szymonik-Lesiuk et al., 2003; Weber et al., 2003). Reactive oxygen species (ROS) generated by metabolic intermediates of xenobiotics via induction of CYP450 families as well as activated inflammatory cells through NADPH oxidases promote the accumulation of lipid derived oxidation products that cause liver injury, resulting in cell (Pugh et. al., 2009). Drug-induced liver injury (DILI) is an important cause of liver disease with an incidence of between 1 in 1,000 and 1 in 100,000 in patients taking therapeutic doses of medications (Lee, 2003). The effects of thiazolidinediones (TZDs) on liver function or metabolism remain largely known. Thiazolidinediones are peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists used as insulin-sensitizing drugs to treat diabetes mellitus. This class of drugs is a well-recognized cause of drug-induced hepatotoxicity. Troglitazone, the first TZD, was withdrawn from the market in 2000 following 94 cases of liver failure (Graham, et. al, 2003; Chan et.al, 2003). There are two second generations TZDs on the market at the current time: rosiglitazone and pioglitazone. Both of these second generation TZDs are known to cause hepatotoxicity, with rare reports of hepatic failure (Forman et. al., 2000; Marcy et. al., 2004; Farley-Hills et. al, 2004). Periodically, after starting therapy is recommended that liver enzymes be determined before initiation of rosiglitazone or pioglitazone (Chase et. al., 2002). In this context, the present study investigated whether the compounds 3-(2 bromo-benzyl)-5-(4-metylsufonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-125) and 3-(2,6-difluor-benzyl)-5-(4-metylsufonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-192) present effects acute hepatic injury, in an experimental model of CCl₄ induced hepatotoxicity.

METHODS

Animals

The experiment used Wistar rats males, with weigth between 200 and 250g. Animals were provided by the Bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE); they were kept in a small colony in the animal house at a temperature of 22 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C, with 12 hour cycles of light and darkness, receiving standard feed (Purina®) and water as required. The

experimental procedure was approved by the Local Committee for Animal Ethics (23076.006588/2008-92 CCB– UFPE).

Drugs

The derivatives 3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-125) and 3-(2,6-difluor-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-192) were obtained by synthesis as described previously by Carmino (2008) and Barros(2010) were authenticated using mass and NMR spectroscopy provided by the Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

Induction of liver necrosis

The animals received for 7 days LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 (3 mg/kg; per oral, p.o.) Hepatic injury was induced experimentally by i.p. injection with 2.5% CCl₄ dissolved in olive oil at a dose of 1 ml/kg body weight. Control mice were injected with similar volumes of olive oil for each treatment. In the eighth day rats received CCl₄ treatment (1 mg/kg; intraperitoneal, i.p.). After 24 hours rats were anesthetized and the blood samples were collected by cardiac puncture into a coagulant containing tube. It was ensured that all the animals, treated or untreated, are sacrificed at the same time point. All the biochemical estimations were completed at 0 -4 °C on the same day when the animals were sacrificed (Shim et. al., 2010).

Biochemical parameters

Rats were anesthetized and the blood was collected by cardiac puncture. Blood was allowed to clot and the serum was separated by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. Serum levels of ALT, AST and ALP as markers of hepatic function were measured using commercial kits especific for automatic biochemical analyzer COBAS Mira Plus (Roche Diagnostic System).

Histopathological studies

For histopathological studies, few-millimeter-thick midsections of the left lobes of the livers excised from each group were processed for light microscopy. The processing involved fixing of the tissue specimens in a 10% neutral buffered formalin solution, preparing the blocks in paraffin, cutting sections 5–6 µm in thickness, and staining the sections with haematoxylin–eosin stain.

Data analysis

All values in the tables are expressed as means $\pm$ SEM. The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. Differences between the drug-treated groups and the control group were evaluated by $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The ALT, AST and ALP activities of CCl₄-treated rats were significantly increased, as well as treated in combination with CCl₄ (CCL₄ + LPSF/GQ-125 and CCL₄ + LPSF/GQ-192), compared to those of control (vehicle) rats (Table 1).

Table 1 Effects of LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 on CCl₄-induced hepatotoxicity. Rats were i.p. injected with indicated doses of compounds followed by 1 ml/kg of 2.5% CCl₄ injection 24h later.

Treatment	AST (UL ⁻¹)	ALT (UL ⁻¹)	ALP (UL ⁻¹)
LPSF/GQ-125 (3mg/kg) + CCl ₄	246,62 $\pm$ 84,67 ^{*#}	146,34 $\pm$ 55,20 ^{*#}	301,22 $\pm$ 37,67 [*]
LPSF/GQ-192 (3mg/kg) + CCl ₄	316,04 $\pm$ 67,57 [*]	224,42 $\pm$ 54,15 [*]	329,36 $\pm$ 71,67 [*]
CCl ₄	211,46 $\pm$ 40,0 [*]	105,06 $\pm$ 29,6	228,02 $\pm$ 51,86 [*]
Control (Vehicle)	38,24 $\pm$ 4,06	46,3 $\pm$ 20,0	44,86 $\pm$ 8,01

* Statistically significant from control group: $p < 0.05$

[#]No statistically significant from CCl₄ group: $p < 0.05$

The results in Table 1 show the elevation of serum AST, ALT and ALP when compared to control: AST (38,24 U/L $\pm$ 4,06), ALT (46,3 U/L $\pm$ 20,0) and ALP (44,86 U/L $\pm$ 8,01). To compound LPSF/GQ-125 results were AST (246.62 U / L $\pm$ 84, 67), ALT (146.34 U / L $\pm$ 55, 20) and ALP (301.22 U / L $\pm$ 37,67). These results were not statistically different when compared to CCl₄ group. The compound LPSF/GQ-192 showed the following results: AST (316.04 U / L $\pm$ 67,57), ALT (224.42 U / L $\pm$ 54,15) and ALP (329, 36 U / L $\pm$ 71,67).

Histopathological studies provided supportive evidence for the biochemical analysis. The histological changes basically supported the measuring of the serum enzyme activities. There was no abnormal appearance or histological changes in the liver of vehicle group (B). CCl₄ administration caused classical damage in the rat liver at 24 h, as demonstrated by inflammatory cells infiltration, fatty degeneration and hydropic degeneration, vacuole generation and steatosis (fig.1)

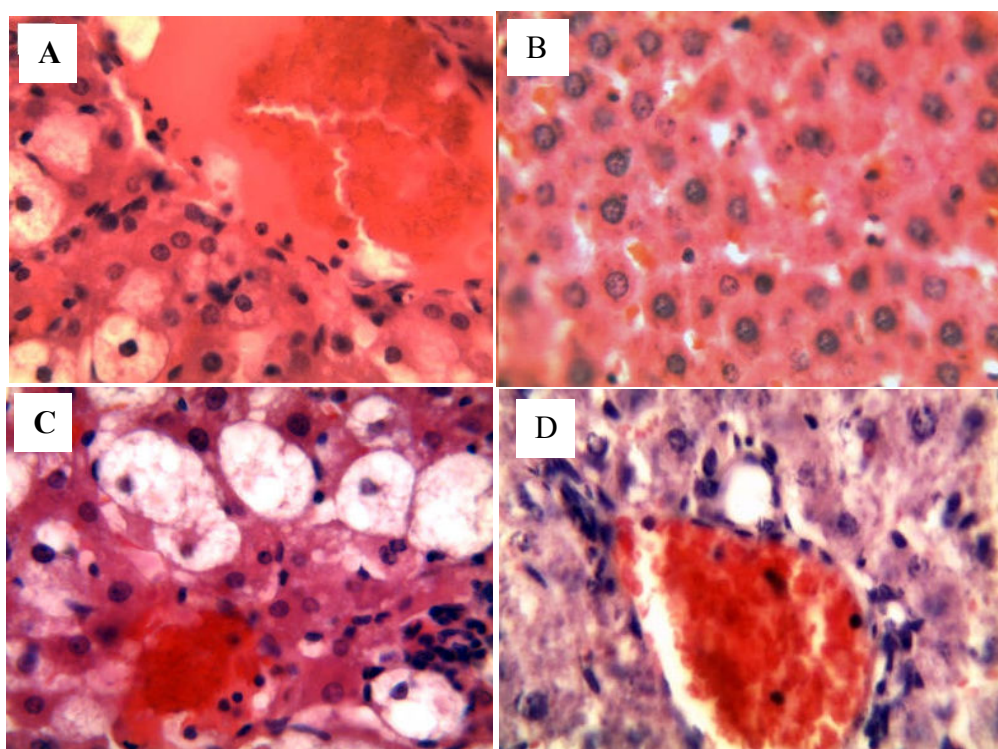


Figure 1 Liver sections from rats in CCl₄ group (A) and vehicle group (B) showed normal liver histology. Steatosis with fat droplets in the liver obtained from rat LPSF/GQ-125 + CCl₄ group (C). Liver sections from a rat in LPSF/GQ-192 + CCl₄ group showed lymphocytic infiltrate around the blood vessel (D).

DISCUSSION

The activity levels of serum aminotransferases (ALT and AST) and alkaline phosphatase (ALP) were found to be elevated significantly in rats sacrificed 24 h after receiving the necrogenic dose of CCl₄. These enzymes are generally elevated in different types of hepatic lesions (Wang et al., 1997). The acute CCl₄ intoxication induces liver damage, as evident from higher serum transaminase activity and histological data. The increased serum levels of AST, ALT and ALP are attributed to damage to the structural integrity of the liver, since these are located in the cytoplasm and released into the circulation after cellular damage. This hepatic damage is possibly associated with at least two sequential processes (Shim et al., 2010). The initial phase involves CYP450-mediated bioactivation of CCl₄ to a highly reactive trichloromethyl radical and ROS, leading to lipid peroxidation and hepatocellular membrane damage. This is followed by the release of a myriad of growth factors, inflammatory mediators, and prostaglandins from activated hepatic macrophages, which potentiate CCl₄-induced hepatic injury (Sudo et al., 2005). We found that the compounds 3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-125) and 3-

(2,6-difluor-benzyl)-5-(4-methylsulfonyl-benzyliden)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-192) significantly increase the serum markers of hepatic injury and lipid peroxidation against CCl₄-induced liver injury in rats, alkaline phosphatase increased significantly in the treated groups compared to control. Alkaline Phosphatase (ALP) is present in various tissues, bone mainly in the hepatobiliary system and is indicative of the occurrence of gastrointestinal mucosa cholestasis (impaired bile flow), which can lead to a increased serum levels up to 10 times (Santos et al., 2008). With these results could not possible establish the mechanism by which these compounds results liver damage. The onset of idiosyncratic and severe hepatotoxicity undermines the success of TZD as a novel class of therapeutic with other TZD analogues still being used clinically, an understanding of the mechanism of toxicity is necessary to advocate the safe use of these analogues and also to explore alternative chemical entity to gain pharmacological advantage. Troglitazone was withdrawn from market at 2000 due to its idiosyncratic liver toxicity (Chojkier, 2005) but the mechanism of toxicity is still unknown to researchers. It is necessary to highlight that although many mechanistic studies are performed (Smith, 2003). The exact mechanism of toxicity remains elusive. Recents studies show that Sulfur moiety of TZD ring underwent metabolic activation via CYP3A4 to form reactive intermediates which covalently bound with glutathione (Saha et al., 2010). Glutathione is an important endogenous antioxidant system that is found in particularly high concentration in liver and it is known to have key functions in protective processes. The reduced form of glutathione becomes readily oxidized to glutathione disulfide (GSSG) on interacting with free radicals. Excessive production of free radicals resulted in the oxidative stress, which leads to damage of macromolecules e.g. lipids, and can induce lipid peroxidation *in vivo* (Sinclair et al., 1991). Probably, the derivatives LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 suffers the same kind of metabolic activation.

In conclusion, the results of the present study, indicated that under the present experimental conditions, LPSF/GQ-125 and LPSF/GQ-192 showed hepatotoxicity effect against carbon tetrachloride-induced liver injury.

REFERENCES

- Barros, C. D.; Amato, A. A.; Oliveira, T. B.; Iannini, K. B. R.; Silva, A. L.; Silva, T. G.; Leite, E. S.; Hernandez, M. Z.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Neves, F. A. R.; Pitta, I. R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3805-3811 (2010).
- Carmino, M. A. S. Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade anti-inflamatória de novos derivados da tiazolidina-2,4-diona. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.
- Chan, K. A., Truman, A., Gurwitz, J. H., A cohort study of the incidence of serious acute liver injury in diabetic patients treated with hypoglycemic agents. *Arch Intern Med.*, 163, 728-34 (2003).
- Chase, M. P., Yarze, J. C. Pioglitazone-associated fulminant hepatic failure, *Am J Gastroenterol.* 97, 502-503 (2002)
- Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: In search of answers. *Hepatology*, 41, 237-246 (2005).
- Farley-Hills, E., Sivasankar R, Martin M. Fatal liver failure associated with pioglitazone. *BMJ.*, 329-429 (2004).
- Forman, L. M., Simmons, D. A., Diamond, R. H. Hepatic failure in a patient taking rosiglitazone, *Ann Intern Med.* 132, 118-121, (2000).
- Graham, D. J., Green, L., Senior, J. R., Troglitazone-induced liver failure: a case study. *Am J Med.*, 114, 299-306 (2004).
- Lee, W.M. Drug-induced hepatotoxicity, *N Engl J Med* . 349, 474-485 (2003).
- Marcy, T. R., Britton, M. L., Blevins, S. M. Second-generation thiazolidinediones and hepatotoxicity. *Ann Pharmacother*; 38, 1419-1423. (2004)
- Pugh, A. J., Barve, A. J. Falkner, K., Patel, M., McClain, C. J. Drug- Induced Hepatotoxicity or Drug- Induced Liver Injury. *Clin Liver Dis.*, 13, 277-294 (2009).
- Saha, S., New, L. S., Ho, K. H., Chui, W. K., Chan, E. C. Y. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicology Letters.*, 192, 141-149 (2010).
- Santos, J. C. A, Riet-Correa, F., Simões, S. V. D., Barros, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesq Vet Brás.*, 28 1-14 (2008).
- Sinclair, A. J., Barnett, A. H., Lunie, J. Free radical and autooxidant systems in health and disease. *Journal of Applied Medicine.* 17, 409 (1991).

Sudo, K., Yamada, Y., Moriwaki, H., Saito, K., Seishima, M. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice, *Cytokine*. 29, 236–244 (2005).

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Slomka, M., Madro, A., Celinski, K., Wielosz, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 10, 309–315 (2003).

Weber, L. W., Boll, M., Stampfl, A., Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 105–136. (2003).

Shim, J. Y.; Kim, M. H.; Kim, H. D.; Ahn, J. Y.; Yun, Y. S.; Song, J. Y. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 242, 318–325 (2010).

Smith, M. T. Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 16, 679–684 (2003).

Wang, P.Y., Kaneko, T., Tsukada, H., Nakano, M., Nakajima, T., Sato, A. Time courses of hepatic injuries induced by chloroform and by carbon tetrachloride: comparison of biochemical and histopathological changes. *Arch. Toxicol.* 71, 638–645 (1997).

7. CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados com os compostos tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos da série LPSF/GQ, podemos concluir que:

- Os compostos tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos dessa série apresentaram atividade marcante na inibição da inflamação na fase aguda reduzindo o edema e a migração celular;
- Na avaliação dos níveis de citocinas os compostos em estudo diminuíram as concentrações de TNF- α e IL-1 β no exsudatos inflamatórios
- Os compostos tiazolidínicos 3,5- dissubstituídos não foram eficazes em reduzir os sintomas da artrite, apesar de ter diminuído o edema das articulações.
- Apresentaram capacidade de inibir a nocicepção relacionada à dor inflamatória, provavelmente não envolvendo mecanismos centrais,
- Dentre os compostos testados o LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 apresentaram melhores efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos entretanto, se apresentaram tóxicos quando avaliadas frente ao dano hepático causado por CCl₄.

ANEXO A

1. MATERIAL E MÉTODOS

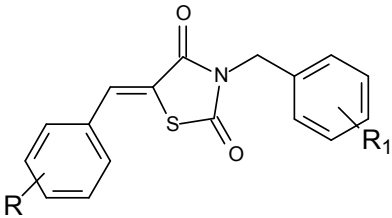
1.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20 e 25 g e ratos Wistar machos adultos, pesando entre 200 e 300 g oriundos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o número 23076.006588/2008-92.

1.2 MATERIAL DE ESTUDO

Foram testados cinco novos derivados tiazolidinônicos fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/UFPE: LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192.

Tabela 1 Estrutura e nome químico dos derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos.

Estrutura Geral	Código	R ₁	R	Nome Químico
	LSPF/GQ-115	2-Br	4-F	3-(2-bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
	LSPF/GQ-120	2-Br	4-CH ₃	3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona
	LSPF/GQ-122	2-Br	2-Cl	3-(2-bromo-benzil)-5-(2-cloro-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona
	LSPF/GQ-125	2-Br	4-SO ₂ CH ₃	3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)tiazolidina-2,4-diona
	LSPF/GQ-192	2,6-F	4-SO ₂ CH ₃	3-(2,6-difluor-benzil)-5-(4-metilsufonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4diona

1.3 DOSES

A escolha das doses foi pautada de acordo com estudos anteriores feito pelo Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica (NUPIT-UFPE) e o Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos (LBPF-UFPE) (UCHÔA, 2009; BARROS, 2010). Todos os derivados avaliados foram testados a cerca de sua atividade anti-inflamatória posteriormente nas doses de 3 mg/Kg, 0,3 mg/kg e 0,03 mg/kg, onde obteve-se melhores resultados quanto a inibição de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) na dose de 3 mg/kg com percentual de inibição acima que variou de 60% a 80% de inibição (CARMINO, 2008).

2. DELINEAMENTO METODOLÓGICO

2.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

2.1.1 Teste do Edema de Pata Induzido por Carragenina

A ação anti-inflamatória foi avaliada primeiramente através do teste de edema de pata induzido por carragenina 1% (Winter et al., 1962). O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (1% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de rato Wistar machos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina, os compostos tiazolidinônicos-3,5-dissubstituídos (LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192), foram administrados, por via oral, nas doses de 3 mg/kg. Foram utilizados como padrão o anti-inflamatório não-esteroidal indometacina (10 mg/kg) e rosiglitazona (3mg/kg) por (v.o.), ao grupo controle foi administrado salina. O volume da pata foi tomado imediatamente após a administração da carragenina (tempo zero), com intervalos de 60, 120, 180 e 240 minutos, através do deslocamento de água registrado em pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile Co., Varese, Italy).

2.1.2 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina

Neste ensaio, foram utilizados seis grupos de seis animais. Quatro grupos receberam, por via oral, os derivados tiazolidinônicos-3,5-dissubstituídos (LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192) na dose de 3mg/Kg. A indometacina, fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, foi administrado via oral na dose de 10mg/Kg e a rosiglitazona na dose de 3 mg/kg. O grupo que recebeu apenas o veículo foi utilizado como controle. Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por aplicação intraperitoneal de 0,1 mL/10 g do agente flogístico carragenina (1% em salina). Quatro horas após a indução da inflamação os animais foram

eutanasiados em câmara de CO₂, sendo injetado na cavidade peritoneal 2 mL de PBS contendo EDTA. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico micros 60 (PRASSAD; GUPTA, 2005). Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a - 20°C para análise de TNF- α e IL-1 α .

2.1.3 Teste do Bolsão de Ar

Este teste consistiu na formação de uma bolsa de ar no dorso do camundongo através da injeção de ar estéril. Para a realização do ensaio foram utilizados cinco grupos de seis animais. No primeiro dia, injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio os animais receberam, por via oral, os derivados tiazolidinônicos: LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ- 125 e LPSF/GQ- 192 na dose de 3mg/kg, indometacina (10mg/Kg), rosiglitazona (3mg/Kg) e diclofenaco (10 mg/Kg) e ao grupo controle foi administrado salina. Após uma hora da administração dos compostos, foi injetado 1mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 3 mL de PBS contendo EDTA como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60 (KIM et al., 2006). Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a - 20°C para análise de TNF- α e IL-1 β .

2.1.4 Teste da Pleurisia Induzida por Carragenina

A pleurisia foi realizada segundo metodologia descrita por Fröde e Medeiros (2001). Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de ketamina 50% e xilazina 2 % (partes iguais), 0,1 a 0,2 mL / 100g. Em seguida foi administrado 0,1mL do agente flogístico carragenina (1%), na cavidade pleural através do espaço intercostal utilizando-se uma seringa. Os compostos tiazolidinônicos-3,5-dissubstituídos LPSF/GQ- 125 e LPSF/GQ- 192 (3 mg/Kg), e os fármacos ,Dexametasona (0,5 mg/Kg), Indometacina (10 mg/Kg) e Rosiglitazona (3 mg/Kg), foram administradas uma hora antes, per os, a aplicação da carragenina. Após quatro horas a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de solução salina tamponada (PBS - pH 7,6) e heparinizada (20 UI/mL). O exsudato foi então coletado com auxílio de pipeta de Pasteur e armazenado em tubos de ensaio para a quantificação do número de leucócitos totais. A contagem foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60. Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a - 20°C para análise de TNF- α e IL-1 β .

2.1.5 Artrite induzida por adjuvante completo de Freund

Para avaliar os efeitos da inflamação crônica, foi empregado o método descrito por Newbould, 1963 com modificações. Foram utilizados quatro grupos contendo seis animais, que serão tratados com veículo (salina contendo DMSO 5%), diclofenaco (10 mg/Kg), e os derivados LPSF/GQ- 125 e LPSF/GQ- 192. Os animais receberam todos os tratamentos por gavagem, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. No terceiro dia do tratamento, 25 µl de Freund's complete adjuvant (FCA) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) foi injetado no tecido subplantar da pata traseira direita de cada rato. O edema da pata injetada e colateral foi medido diariamente do terceiro ao 14º dia e no 21º dia através de pletismômetro (UGO Basile).

3. Quantificação de IL1-β e TNF-α

A quantificação de IL-1β e TNF-α do exsudato do teste do bolsão de ar e peritonite induzida por carragenina foi determinada pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando Kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e todas as amostras foram testadas em triplicata.

4. Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

Para determinar o potencial citotóxico dos compostos tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos foi realizado um triagem inicial com três linhagens de células tumorais, HT29 (carcinoma de cólon - humano), MCF-7 (carcinoma de mama - humano) e NCI H-292 (câncer de pulmão - humano). As células foram cultivadas em meio DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células/mL. Os compostos tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos (LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ- 125 e LPSF/GQ- 192), foram testados na dose de 50 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após o intervalo de 72 horas, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm (MOSMAN, 1983). Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOTÓXICA

A lesão hepática foi induzida experimentalmente por via intraperitoneal com 2,5% de CCl₄ dissolvido em azeite de oliva na dose de 1 mL / kg de peso corporal. Nos animais controle foi administrado azeite com volumes similares. Vinte e quatro horas após a indução de lesão hepática com CCl₄, os animais foram anestesiados com uma mistura ketamina 50% e xilazina 2 % (partes iguais) e as amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca. Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalinase (ALP) foram mensurados de acordo com o kit do fabricante. Após o sacrifício do animal o tecido hepático foi removido imediatamente e fixado em formalina a 10%. Para análise microscópica, o tecido foi embebido em parafina, seccionado até 5µm e corado com hematoxilina e eosina (SHIM et. al, 2010).

6. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

6.1 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

A atividade antinociceptiva foi verificada através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Neste ensaio foram utilizados quatro grupos de seis animais cada. Uma hora antes da administração do ácido acético, os animais receberam os derivados tiazolidinônicos, LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ- 125 e LPSF/GQ- 192 na dose de 3mg/Kg. O diclofenaco (10 mg/kg), foi utilizado como fármaco padrão, por via oral. O grupo controle recebeu salina. O ácido acético 1% foi injetado (0,1mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal dos animais para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Dez minutos após a aplicação do ácido os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno transparentes, registrando-se o número de contorções abdominais durante 20 minutos. Foi adotado o conceito de que uma contorção é entendida como a torção do corpo inteiro e/ou o alongamento dos membros posteriores, com o movimento do abdômen tocando a superfície da gaiola. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções do grupo tratado com o a média de grupo controle (KOSTER, 1959).

6.2 Teste da placa quente

Os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida à temperatura fixa ($55\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e observados em relação ao tempo que levaram para manifestar uma resposta ao estímulo térmico. Esta resposta corresponde ao ato de lambear as patas, pular ou sapatear. Vinte e quatro horas antes de se iniciar o teste, os animais foram submetidos ao estímulo, sendo selecionados os que levaram até 20 segundos para manifestar resposta. Os animais foram tratados, por via oral, com salina e os derivados LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120, LPSF/GQ-122, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 (3mg/Kg). As medidas de latência foram realizadas nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos após o tratamento oral. Foi utilizado como fármaco padrão, por via subcutânea, o fentanil (0,2 mg/Kg) (IRWIN, 1968).

7. Variáveis Analisadas

Analisou-se a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) e a produção de citocinas pró-inflamatórias no teste do bolsão de ar, bem como a antinocicepção frente a estímulo químico e térmico no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da placa quente, respectivamente.

8. Análise dos Dados

As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o software Graph Pad prism. 5.0. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

ANEXO B

1. Resultados Complementares e Discussão

1.1 Teste do Bolsão de Ar

Os resultados da atividade anti-inflamatória para este teste encontram-se na tabela 2 e na figura 1. Os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição estatisticamente significativa na migração celular quando comparados ao controle ($15,64 \pm 1,9 \times 10^6$ células).

Tabela 2 Número de PMNL e percentual de inibição da inflamação pelos derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos no teste do bolsão de ar.

Composto	Dose (mg/kg)	Contagem de PMNL /	Inibição inflamatória (%)
		mL($\times 10^6$)	
LPSF/GQ-115	3	$5,56 \pm 0,91^{* \#}$	65
LPSF/GQ-120	3	$5,66 \pm 0,80^{* \#}$	60
LPSF/GQ-122	3	$4,32 \pm 0,96^*$	71
Indometacina	10	$2,08 \pm 0,46^*$	88
Rosiglitazona	3	$2,71 \pm 0,57^*$	83
Diclofenaco	10	$3,56 \pm 1,03^*$	77
Controle	-	$15,64 \pm 1,90$	-

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

#Diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão ($p < 0,05$).

Este modelo animal mimetiza a artrite reumatóide, nele a indução da inflamação por carragenina na bolsa de ar subcutânea forma uma membrana que apresenta características semelhantes à membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatóide (SEDGWICK; LEES, 1986). Trata-se, portanto, de um modelo utilizado como triagem para potenciais candidatos a fármacos no tratamento da artrite. A inibição leucocitária do LPSF/GQ-122 ($4,32 \pm 0,96/71\%$) foi estatisticamente similar aos dos fármacos usados como referência, indometacina ($2,08 \pm 0,46/88\%$), rosiglitazona ($2,71 \pm 0,57/83\%$) e diclofenaco ($3,56 \pm 1,03/77\%$), porém o LPSF/GQ-115 ($5,56 \pm 0,91/65\%$) e LPSF/GQ-120 ($5,66 \pm 0,80/60\%$) foram menos efetivos na redução da migração celular do que a indometacina, rosiglitazona e diclofenaco.

A carragenina é um polissacarídeo derivado de algumas espécies de algas, que é amplamente utilizado em diversos estudos experimentais a cerca da migração de neutrófilos por ser uma substância com intensa ação quimiotática (SZABÓ; BECHARA; CUNHA, 2005). Ela desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios (PANTHONG, et al., 2004). Sobretudo histamina, serotonina,

cininas, prostaglandinas e tromboxanos (CARVALHO, 2008; DAMAS et al., 1990). O teste do bolsão de ar causa um aumento dos níveis de PGE₂ no exsudado inflamatório, com participação da enzima ciclooxygenase (ÖZDFL; MELLI, 2004).

Estudos demonstram que os AINEs podem inibir a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) além de respostas como a liberação extracelular de enzimas lisossomais, quimiotaxia, migração, agregação, aderência e motilidade espontânea e a produção de ânion superóxido. Estes efeitos podem ser independentes da sua inibição da síntese de prostaglandina (INAN et. al., 2006).

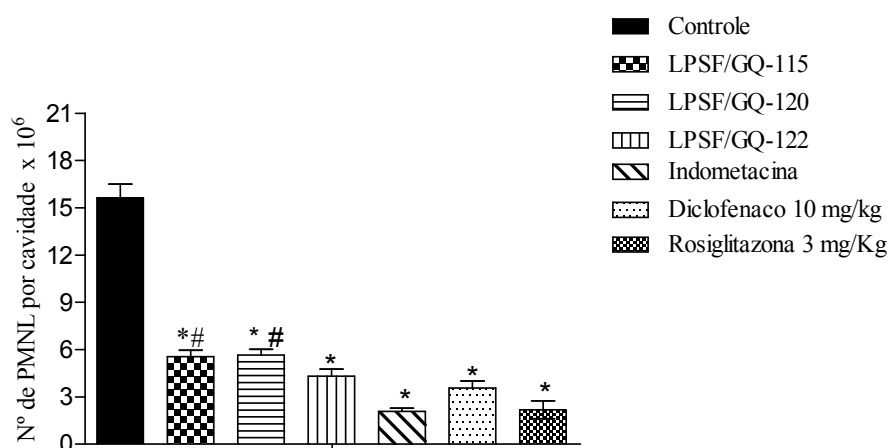


Figura 1 Efeito na migração celular dos derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos LPSF/GQ no teste do bolsão de ar.

Para maior esclarecimento a respeito da inibição leucocitária desencadeada pelos compostos tiazolidinônicos em estudo foi realizada a dosagem de TNF- α e IL-1 β do exsudato inflamatório do teste do bolsão. A quantificação dessas citocinas foi realizada através da técnica do ELISA sanduíche. Os resultados da dosagem de citocinas para o teste do bolsão de ar encontram-se na tabela 3. Todos os compostos apresentaram uma diminuição significativa da produção de TNF- α quando comparados ao controle (1096,47 pg/ml), com 239,00 pg/ml para o composto LPSF/GQ-120, 354,81 pg/ml para o LPSF/GQ-115 e 933,25 pg/ml para o composto LPSF/GQ-122. O fármaco rosiglitazona utilizado como padrão, apresentou uma concentração de TNF- α de 426,57 pg/ml, indometacina 954,99 pg/ml e diclofenaco 1000,87 pg/ml. Os compostos testados, do mesmo modo, inibiram a produção de IL-1 β nos exudatos inflamatórios quando comparados ao controle (870,96 pg/ml), com 645,65 pg/ml para o composto LPSF/GQ-120, 630,95 pg/ml para o LPSF/GQ-115 e 549,54 pg/ml para o composto LPSF/GQ-122. A rosiglitazona apresentou uma concentração de IL-1 β de 676,00 pg/ml enquanto a indometacina 831,76 pg/ml e diclofenaco 935,00 pg/ml. Resultados da dosagem para os padrões corroboram com trabalhos de Vigil et al. 2008 e Cuzzocrea et. al. (2004). Segundo Newcombe (1997), os AINEs não provocam resposta anti-inflamatória contra as

ações da IL-1, e a inibição da síntese de prostaglandinas não afeta a resposta inflamatória gerada pela IL-1.

Tabela 3 Efeito dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-115, LPSF/GQ-120 e LPSF/GQ-122, sobre a concentração de TNF- α e IL-1 β no teste do bolsão de ar.

Tratamento	Dose (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
LPSF/GQ-115	3	354,81 $\pm$ 0,05*	630,95 $\pm$ 0,02*
LPSF/GQ-120	3	239,00 $\pm$ 0,03*	645,65 $\pm$ 0,01*
LPSF/GQ-122	3	933,25 $\pm$ 0,01*	549,54 $\pm$ 0,03*
Indometacina	10	954,99 $\pm$ 0,02*	831,76 $\pm$ 0,01*
Rosiglitazona	3	426,57 $\pm$ 0,02*	676,00 $\pm$ 0,01*
Diclofenaco	10	1000,87 $\pm$ 0,01*	935,00 $\pm$ 0,01
Controle	-	1096,47 $\pm$ 0,01	870,96 $\pm$ 0,01

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A IL-1 β promove a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular, indicando que IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório (HALLEGUA; WEISMAN, 2002). O TNF- α está associado à redução da migração celular e exsudação. É uma citocina chave para a resposta imune inata. O aumento da concentração desta citocina no organismo está vinculada a uma série de doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide (VIGIL, et al., 2008). De acordo com CUZZOCREA et al. (2004), agonistas PPAR γ atuam na inibição na produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Foi observado neste ensaio que a inibição da migração celular analisada nos grupos tratados com esses compostos está relacionada com a capacidade de inibir a produção tanto de TNF- α como de IL-1 β . No entanto, o mecanismo de ação pode estar relacionado a diferentes vias, inclusive com a inibição de prostaglandinas, PPAR ou modulação do sistema imune, sendo necessários outros estudos que auxiliem sua elucidação.

1.2 Teste da Pleurisia Induzida por Carragenina

O modelo da pleurisia induzida por carragenina é caracterizado por duas fases de reação inflamatória, uma inicial (4h) e outra tardia (48h), com diferentes mediadores inflamatórios envolvidos (SALEH et al., 1996; DALMARCO e FRÖDE, 2007). Ambas as fases estão associadas a uma acentuada reação inflamatória, nas vias respiratórias, semelhante a que ocorre na asma humana (DALMARCO e FRÖDE, 2007). Entre esses mediadores, o influxo de leucócitos do sangue ao local da inflamação desempenha um importante papel na modulação da resposta inflamatória. Os resultados obtidos mostraram que os derivados tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos apresentaram efeito anti-inflamatório na fase aguda da pleurisia induzida por carragenina, inibindo a migração leucocitária. As inibições produzidas pelos derivados tiazolidínicos sobre a migração leucocitária estão sumarizadas na Tabela 4 e Figura 2.

Tabela 4 Número de PMNL e percentual de inibição da inflamação pelos derivados tiazolidínicos, LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 no teste da pleurisia induzida por carragenina.

Composto	Dose (mg/kg)	Contagem de PMNL /mL ($\times 10^6$)	Inibição inflamatória (%)
LPSF/GQ-125	3	3,72 $\pm$ 1,13*	59,6
LPSF/GQ-192	3	2,94 $\pm$ 0,87*	68,1
Indometacina	10	3,02 $\pm$ 1,37*	67,2
Rosiglitazona	3	3,00 $\pm$ 0,65*	67,4
Dexametasona	0,5	2,52 $\pm$ 1,23*	72,6
Controle	-	9,21 $\pm$ 2,19	-

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

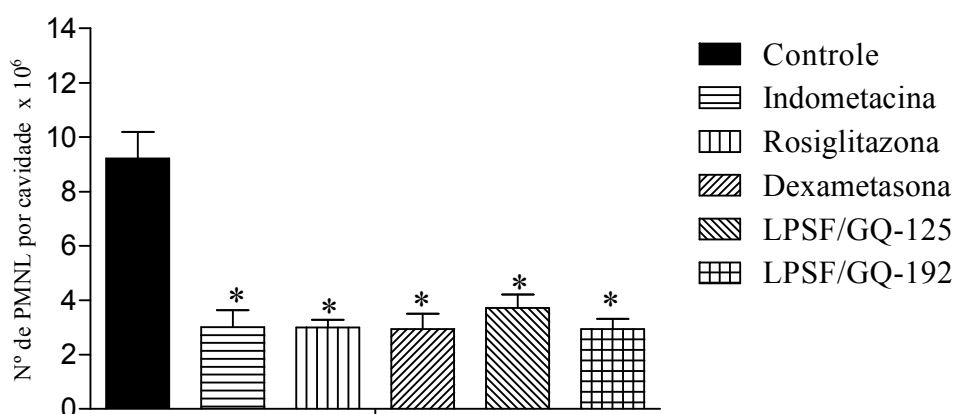


Figura 2 Efeito na migração celular dos derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos :LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192 (3 mg/Kg v.o.) no teste da pleurisia induzida por carragenina. * $p < 0,05$.

Os compostos LPSF/GQ-192 ($2,94 \pm 0,87/68,1\%$) e LPSF/GQ-125 ($3,72 \pm 1,13/59,6\%$), na dose 3 mg/kg, inibiram significativamente a migração leucocitária em relação ao controle ($9,21 \pm 2,19$). Este perfil de inibição pode ser observado nos fármacos como dexametasona ($2,52 \pm 1,23/72,6\%$), indometacina ($3,02 \pm 1,37/67,2\%$) e rosiglitazona ($3,00 \pm 0,65/72,6\%$).

Estudos recentes demonstram que as tiazolidinadionas são capazes de diminuir o influxo de leucócitos no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Pesquisadores avaliaram o potencial efeito da pioglitazona neste modelo e constataram a capacidade de inibir a migração celular em duas fases (4 e 48 horas) (FRÖDE et al; 2009). Esses resultados corroboram com os dados encontrados e sugerem que os compostos avaliados podem possuir mecanismo de ação relacionado ao PPAR. Porém, testes a cerca do mecanismo de ação desses derivados em questão devem ser elucidados através de testes específicos.

1.3 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

A avaliação farmacológica dos derivados tiazolidínicos no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, revelou atividade antinociceptiva periférica para todas as substâncias testadas na dose de 3 mg/kg em relação ao controle, porém LPSF/GQ-122 apresentou a menor inibição 41%. Os Derivados LPSF/GQ-115 e LPSF/GQ-120 inibiram a resposta nociceptiva em 64% e 50% respectivamente, semelhantes estatisticamente ao fármaco utilizado como padrão diclofenaco (68%). Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 5 e na figura 3.

O ácido acético age liberando mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos, provocando em camundongos, a nível peritoneal, um aumento nos níveis de PGE2 e PGF2 α , serotonina, histamina, assim como liberação de bradicinina e citocinas, como, TNF- α e IL-8 (DERAEDT et al., 1980; RIBEIRO et al., 2000). De modo a provocar comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incordenação da atividade motora. (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Tabela 5 Número de contorções abdominais (média $\pm$ desvio padrão) em 20 minutos e percentual de inibição dos derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Contorções abdominais (nº/20min)	Inibição %
LPSF/GQ-115	3	30,0 $\pm$ 4,81*	64
LPSF/GQ-120	3	35,0 $\pm$ 6,51*	58
LPSF/GQ-122	3	49,0 $\pm$ 2,92* #	41
Diclofenaco	30	26,8 $\pm$ 4,96*	68
Controle	-	83,5 $\pm$ 4,82	-

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

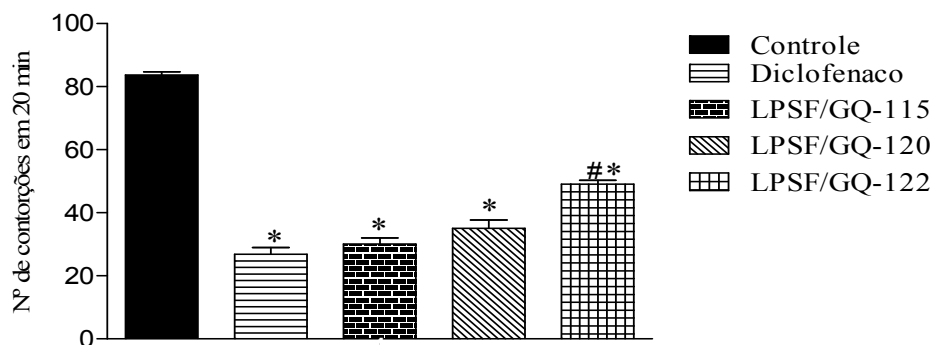


Figura 3 Efeito antinociceptivo da administração oral dos derivados tiazolidinônicos no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético permite detectar efeito analgésico tanto central como periférico, sendo, portanto, de baixa especificidade e largamente utilizado como ensaio preliminar, devendo ser seguido por outras metodologias que auxiliem na avaliação do perfil antinociceptivo de um determinado agente teste (PIRES et al., 2004; SILVA, 2009).

1.4 Teste da placa quente

Para confirmação do perfil de atuação na nocicepção dos compostos testados utilizou-se o teste da placa quente. O teste da placa quente caracteriza-se como um modelo animal para avaliação do perfil de atuação de fármacos com atividade analgésica. As respostas comportamentais exibidas pelos animais neste ensaio, lambr as patas e pular, são de nível supra-espinal, sendo, portanto

utilizado predominantemente para verificação da atividade de fármacos que atuem no sistema nervoso central, como fentanil e morfina, que promovem o aumento do tempo de latência na resposta nociceptiva para verificação do efeito antinociceptivo central (Loh et al. 1976; Levy e Proudfit, 1977; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; Oliveira et al., 2007; RINALDI et al., 2009). Os resultados, expressos na tabela 6, demonstram que em todos os tempos de análise nenhum dos derivados testados apresentou ação, quando comparados ao controle. Em comparação ao fentanil, opióide de ação central, as substâncias apresentaram tempo de latência estatisticamente inferior, nos tempos de 60 e 120 minutos, porém, mostraram similaridade a este fármaco no tempo de 180 minutos após o tratamento. Isso se deve ao fentanil ser um anestésico de curta duração (BLANCO et al., 2005 ;COSTA-E-SOUSA et al., 2010).

Tabela 6 Tempo de latência ao estímulo térmico no teste da chapa quente após tratameno oral com os derivados tiazolidinônicos

Compostos	Dose(mg/Kg)	Tempo de Latência (Minutos)			
		0	60	120	180
LPSF/GQ-115	3	7,98±1,36	7,86±1,50	7,65±1,46	8,15±1,28
LPSF/GQ-120	3	7,02±1,20	8,08±0,93	6,68±1,57	6,64±1,58
LPSF/GQ-122	3	7,95±0,70	8,41±0,73	8,1±0,84	7,35±1,23
Fentanil	0,2	9,54 ± 1,72	18,1±0,6 *	11,3±0,9*	8,8±1,1
Controle (salina)	-	9,30 ± 0,49	9,7 ± 1,42	8,84 ± 1,31	8,58 ± 1,48

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,05)

Outro fato observado foi que após a administração dos compostos tiazolidínicos os animais não exibiram o comportamento caracterizado pela ereção de cauda denominada fenômeno de “straub”. Este comportamento pode ser um dos pontos determinantes para se avaliar a atividade nos receptores opióides em experimentos com animais (ZARRINDAST; ALAEI-NIA; SHAFIZADEH; 2001). Não há evidencias de que as tiazolidinadionas promovam efeitos nociceptivos relacionados ao SNC (Oliveira et al., 2007)

Os resultados complementam aqueles obtidos no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e permitem concluir que o mecanismo de ação dos derivados testados não está relacionado à ação central, estando provavelmente relacionado com a capacidade das substâncias testadas de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 .

2. Influências dos substituintes na atividade farmacológica

Em moléculas biologicamente ativas a substituição de um átomo ou grupo de átomos por outro com mesmas propriedades físico-químicas está baseado nos conceitos de isosterismo. Tais conceitos foram introduzidos em 1919 por Languimuir, que direcionou seus estudos na comprovação da similaridade eletrônicas e estéricas de átomos, grupos de átomos, radicais e moléculas. A aplicação do isosterismo para modificar uma parte biologicamente ativa de uma molécula por outra molécula com similar atividade é conhecida por bioisosterismo ou isómeros não-clássicos (WERMUTH, 2008).

Essas diferenças estruturais têm sido observadas nas mais diversas classes de compostos, dando destaque ao uso de heterocíclios pentagonais, que se apresentam como um bom “scaffold” para o desenvolvimento de novas drogas destinadas às mais diversas atividades, como os anti-inflamatórios. Dentre esses heterocíclios anti-inflamatórios, os derivados tiazolidinônicos vêm apresentando resultados significativos como na série desenvolvida por Previetera et al (1990), onde verificaram uma interessante atividade anti-inflamatória e analgésica desses derivados, com melhores perfis de segurança gastrointestinal que os NSAIDs conhecidos na época, sugerindo que estas podem preferencialmente interagir com a Cox-2.

Desde então, pesquisadores vêm focando no desenho e avaliação de novas moléculas candidatas a fármacos anti-inflamatórios, contendo heterocíclios tiazolidínicos e a substituição em posições estratégicas da molécula tem apresentado resultados interessantes no conhecimento dos possíveis mecanismos de ação. De acordo com Wermuth (2008), a substituição, em uma molécula ativa, de um átomo de hidrogênio por um substituinte alquil, halogênio, hidroxila, nitro, ciano, alcoxi, amino, carboxilato entre outros, ou um grupo funcional pode modificar profundamente a potência, a duração e talvez a natureza do efeito farmacológico da mesma. Isso pode ocorrer por variações em alguns parâmetros da molécula como: coeficiente de partição, densidade eletrônica, ambiente estérico, biodisponibilidade e características farmacocinéticas, e finalmente a capacidade de estabelecer uma interação direta entre o substituinte e o receptor ou enzima.

Ao compararmos resultados obtidos na quantificação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) nos testes de bolsa de ar e peritonite induzida por carragenina observamos que essas características ficam mais evidentes quando comparamos a estrutura dos compostos LPSF/GQ-115 e LPSF/GQ-120, onde sua única diferença é a substituição do átomo de flúor por um grupamento metila na posição *para* do anel benzilidênico, fazendo com que valores de TNF- α e IL-1 β , sejam diminuídos, simultaneamente em relação ao controle. Tais diferenças, apesar de não serem tão significativas, podem estar atribuídas às diferenças nos parâmetros eletrônicos e estéricos, dadas pelo grupamento

metila. Quando comparamos ambos os compostos ao LPSF/GQ-125, verificamos que apesar da pequena diminuição da atividade no TNF- α do mesmo em relação ao LPSF/GQ-120, observamos uma marcante inibição nos valores de IL-1 β , o que favorece a atividade da molécula como um todo, e que a diferença estrutural entre elas é o grupamento metilsulfonyl na posição *para* do anel benzilidênico (Figura 4).

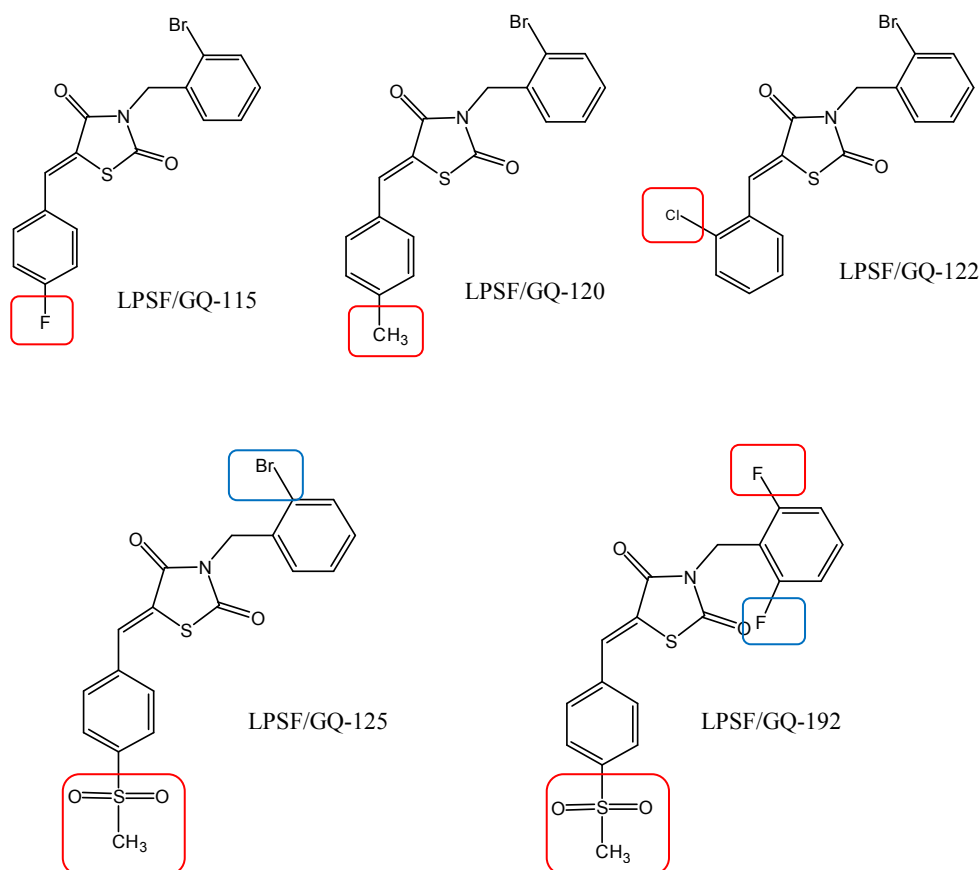


Figura 4 – estrutura dos compostos com atividade frente a inibição de TNF- α e IL-1 β

A importância de grupos sulfônicos foi avaliada por Leblanc e colaboradores (1995), onde verificaram que derivados diariltiofênicos contendo grupamentos metilsulfonyl e aminosulfonyl eram favoráveis para a atividade antiinflamatória, além da seletividade desses pela isoforma Cox-2 e que o aminosulfonyl era mais potente frente a Cox-1 e Cox-2, que o metilsulfonyl. Sendo assim, algumas observações podem ser levadas em consideração dentro dos parâmetros eletrônicos e estéricos dos compostos, e que os grupamentos metilsulfônicos podem contribuir positivamente para atividade favorecendo provavelmente a diferentes tipos de interações com o sítio de ação, como pontes de hidrogênio ou ligações iônicas, além de alterar o coeficiente de partição da

molécula. Esses estudos também foram reforçados com resultados encontrados por Barros et al (2010), onde analisando uma serie de novos derivados tiazolidinonicos, entre eles o composto LPSF/GQ-125, em estudos de docking e atividade biológica, verificou que esse composto apresentou melhor resultado, e que os estudos de docking apontaram uma melhor interação deste com o alvo biológico em relação aos demais testados. E mesmo o composto LPSF/GQ-125 tendo menor afinidade com o alvo testado, o PPAR γ , que o padrão utilizado, rosiglitazona, apresentou uma maior atividade anti-inflamatória, o que pode indicar uma provável interação com outros alvos biológicos no processo da inflamação.

Quando comparamos os demais compostos com o LPSF/GQ-122, observamos que esse apresenta o resultado menos promissor, o que nos leva a acreditar que a substituição em *para* por átomos ou grupamentos diferentes de hidrogênio favorece a atividade. Isso pode ser atribuído ao bloqueio metabólico, normalmente sofrido por compostos aromáticos com substituição nesta posição, levando a oxidações seguidas de conjugações, alterando assim a estrutura da molécula, tornando-a mais fácil de ser excretada.

Ao observamos o composto LPSF/GQ-125 e LPSF/GQ-192, notamos que ambos foram os mais ativos das series testada. A principal diferença estrutural dos compostos é a substituição do *o*-bromo do anel benzílico por dois átomos de flúor nas mesmas posições do anel. Taylor e Kennewell (1981), afirmaram que uma das características marcantes dos halogênios são suas propriedades indutivas-atratora e que os efeitos mesoméricos, visto na maioria dos halogênios, normalmente não estão envolvidos no meio biológico. Entretanto a característica fundamental e predominante dos halogênios é seu efeito hidrofóbico.

De acordo com Katritzky et al (2006), existe uma relação direta entre a atividade biológica e certos parâmetros físico-químico, tais como coeficiente de partição, tensão superficial ou pressão de vapor, e que o acúmulo de átomos de halogênio promove a passagem através das biomenbranas, porém uma observação pode ser feita em relação ao átomo de flúor é que o mesmo contribui pouco para lipofilia das moléculas, além de contribuir para a sua biotransformação.

Entretanto, em estudos realizados por Reszgulin e Mecozzi (2006), descreve que a diferença de eletronegatividade entre o flúor e o átomo de carbono cria um grande momento dipolo nesta ligação e que isso pode contribuir para possíveis interações intermoleculares. Além disso, o flúor é capaz de participar de ligações de hidrogênio com água, essas ligações são mais fracas que aquelas obtidas com o oxigênio, mas são ainda fortes o suficiente para contribuir para ligações de compostos fluoraromaticos com sítios ativos ou receptores, o que poderia, de certa forma, colaborar com a melhor atividade do composto LPSF/GQ-192.

Fica evidente a necessidade de estudo complementares, como trabalhos de cristalografia de raio x, estudo de docking em outros alvos biológicos, entre outros, que possam contribuir para o melhor entendimento dos possíveis mecanismos de ação, como também favorecer a modificações na estrutura da molécula que possam melhorar sua atividade e diminuir efeitos tóxicos, principalmente hepáticos, promovidos pela mesma.

Referências

- BARROS, C. D.; AMATO, A. A.; OLIVEIRA, T. B.; IANNINI, K. B. R.; SILVA, A. L.; SILVA, T. G.; LEITE, E. S.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; NEVES, F. A. R.; PITTA, I. R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3805-3811, 2010.
- BLANCO, L. C.; VIGNOLI, T.; REIS, G. M.; MALVAR, D. C.; PIRES, P. A.; SOUZA, P. A.; LEITÃO, G. G.; MORAIS, A. A.; VANDERLINDE, F. A.; CÔRTEZ, W. S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida. Seropédica**, v. 25, n. 1, p. 78-84, 2005.
- CARMINO, M. A. S. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade anti-inflamatória de novos derivados da tiazolidina-2,4-diona**. 2008. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.
- CARVALHO, A. A. V. **Avaliação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória da *Neolignana grandisina* em modelos de dor e inflamação induzidas em camundongos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2008.
- COSTA-E-SOUSA, R. H.; SILVEIRA, J. W.S.; CORTES, W. S.; MONTEATH, S.; ECHEVARRIA, A.; MACIEL, M. A.M.; COSTA, E. A.; GALDINO, P. M.; ROCHA, F. F.; VANDERLINDE, F. A. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcolico das folhas e galhos de *croton sacaquinha* croizat (euphorbiaceae). **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida. Seropédica**, v. 30, n. 1, p. 00-00, 2010.
- CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATTEL, N.S.A.; DI PAOLA, R.; IALENTI, T.; GENOVEZE, G.; CHATTERJEE, T.K.; DI ROSA, M.; CAPUTTI, A.P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n.1, p.79–93, 2004.
- DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S. In vivo effects of cyclosporin A on expression of adhesion molecules in tissues in mice. **Frontiers of Medical & Biological Engineering**. v. 9, p. 111-123, 2007.
- DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins And Peritoneal Exudates Induced By Carrageenin And Zymosan In Rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, n. 2, p.418-22, 1990.
- DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation** v. 10, p. 223–227, 2001.

FRÖDE, T. S.; BUSS, Z. S.; REIS, G. O.; MEDEIROS, Y. S. Evidence of anti-inflammatory effects of Pioglitazone in the murine pleurisy model induced by carrageenan. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1394–1400, 2009.

HALLEGUA, D.S.; WEISMAN, M.H. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.61, n. 11, p. 960-967, 2002.

INAN, A.; KOCA, C.; SXEN, M. Effects of diclofenac sodium on bursting pressures of anastomoses and hydroxyproline contents of perianastomotic tissues in a laboratory study. **International Journal of Surgery**, v. 4, p. 222-227, 2006

IRWIN, S. Comparative observacional assessment: I. a. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacology**, v.13, n. 3, p.222-257, 1968.

KATRITZKY, A. R.; DOBCHEV, D. A.; FARA, D. C.; HUR, E.; TAMM, K.; KURUNCZI, L.; KARELSON, M.; VARNEK, A.; SOLOV'EV, V. P. Skin permeation rate as a function of chemical structure . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3305 – 3314, 2006.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Carrageenan-Induced Inflammation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 858–864, 2006.

KOSTER R, ANDERSON M, BEER. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxi- dase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, p. 431–436, 2005.

LEVY, R. A.; PROUDIT, H. K. The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 202, p. 437-445, 1977.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEBLANC, Y.; GAUTHIER, J.Y.; ETHIER, D.; GUAY, J.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D.; TAGARI, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; PRASIT, P. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 2123, 1995.

LOH, H. H.; TSEG, L. F.; WEI, E.; LI, C. H. Beta-endorphin is a potent analgesic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 2895-2898, 1976.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEWBOULD, B. B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. **British Journal of Pharmacology**, v. 21, p. 127-136, 1963.

NEWCOMB, D. S. Anti-Inflammatory Drugs: Mechanisms of Action. Principles of Medical Biology, **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 8, p. 687-722, 1997.

OLIVEIRA, M. C. B. L. **Atividade antiinflamatória dos extratos obtidos de *Cordia curassavica* DC.** 2002. 131f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

ÖZDFL, N. Ç.; MELLI, M. Formation of 8-isoprostaglandin F2a and prostaglandin E2 in carrageenan-induced air pouch model in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n.3, p. 189-197, 2004.

PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; PHANKUMMOON, A., PANTHONG, K.; REUTRAKUL, V. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana* Pierre, **Journal of. Ethnopharmacol.** v. 91, p. 237-242, 2004.

PIRES, P. A. **Potencial Analgésico, Anti-edematogênico, Antipirético e Atividade Ulcerogênica de Fármacos Anti-inflamatórios em Roedores.** 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2009.

PRASAD, N.; GUPTA, A. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. **Peritoneal Dialysis International**, v. 25, p. 207-222, 2005.

PREVITERA, T.; VIGORITA, M. G.; BASILE, M.; FENECH, G.; TROVATO, A.; OCCHIUTO, F.; MONFORTE, M. T.; BARBERA, R. 3,3'-Di(1,3-thiazolidine-4-one) system. V. Synthesis and pharmacological properties of 3,3'(1,2-ethanediyl)bis-(2-heteroaryl-1,3-thiazolidine-4-one) derivatives Système 3,3'-di(1,3-thiazolidin-4-one). V. Synthèse et propriétés pharmacologiques de

dérivés 3,3'-(1,2-ethanediyl) bis(2-hétéroaryl-1,3-thiazolidin-4-one) **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 25, p. 569–579, 1990.

REZGULIN , A. V.; MECOZZI , S. Binding properties of aromatic carbonbo und fluorine . **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 49, n. 26, p. 7902 – 7906, 2006.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M. PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing noceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RINALDI, S.; SILVA, D.O.; BELLO, F.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO,D. S.; MATHEUSA, M.E.; FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, n. 3, p. 541-546, 2009.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy, **British Journal of Pharmacology**. v. 118, p. 811–819, 1996.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v.18, n.3-4, p. 439-46, 1986.

SHIM, J. Y.; KIM, M. H.; KIM, H. D.; AHN, J. Y.; YUN, Y. S.; SONG, J. Y. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 242, p. 318–325, 2010.

SILVA, I. K. C. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de novos derivados N-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos**. (2009). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UFAL, (2009).

SZABÓ, M. V. R. S.; BECHARA, G. H.; CUNHA, F. Q. Efeito inibitório da acupuntura sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 21, n. 1, p. 91-95, 2005.

TAYLOR, J. B.; KENNEWELL, P. D. Introductory Medicinal Chemistry. Ellis Horwood Ltd. : **Chichester** , p. 89, 1981.

Uchôa, F. T., Silva, T. G., Lima, M. C. A., Galdino, S. L., Pitta, I. R., Costa, T. D.¹ Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 61, p. 339–345, 2009.

VIGIL, S. V. G.; LIZ, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. **Transplant Immunology**. v. 19, n. 1, p. 25-29, 2008.

WERMUTH, C. G., The Practice of Medicinal chemistry. Ed. 3^o, p. 941, 2008.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 111, p. 544–547, 1962.

ZARRINDAST, M. R.; ALAEI-NIA, K.; SHAFIZADEH, M. On the mechanism of tolerance to morphine-induced Straub tail reaction in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 69, n.4, p. 419–424, 2001.

ANEXO C

Submission of Manuscripts

- **Submission:** Manuscripts should be submitted online at www.mdpi.com by registering and logging in to this website. Once you are registered, click here to go to the submission form.
- **Accepted File Formats:**
- *MS Word:* Manuscript prepared in MS Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in MS Word, the *Molecules* Microsoft Word template file must be used. Please do not insert any graphics (schemes, figures, *etc.*) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
- *LaTeX:* ensure to send a copy of your manuscript as a PDF file also, if you decided to use LaTeX. When preparing manuscripts in LaTeX, please use the MDPI LaTeX template files.
- **Coverletter:** Check in your cover letter whether you supplied at least 5 referees. Check if the English corrections are done before submission.

Manuscript Preparation

- Manuscripts should be prepared in English using a word processor. The MS Word template file should be used. MS Word for Macintosh or for Windows .doc or .rtf files are preferred. Manuscripts may be prepared with other software, provided that the full document (with figures, schemes and tables inserted into the text) is exported to a MS Word format for submission. Times or Times New Roman font is required. The font size is 12 pt and the line spacing "at least" 17 pt. Although our final output is in .pdf format, authors are asked to not send manuscripts in this format as editing them is much more difficult.

Special Notes regarding MS Word files:

- Please do not insert any graphics (schemes, figures, *etc.*) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
- Most formatting codes will be removed or replaced on processing your article so there is no need to use excessive layout styling. In addition, options such as automatic word breaking, double columns, footnotes or automatic numbering should not be used. However, bold face, italic, subscripts, superscripts, *etc.* may be used for emphasis as needed. Authors from countries where right-to-left writing is used should ensure their manuscripts have Western style (left-to-right) formatting.
- The standard style of *Molecules* should be followed. Prospective authors should consult any current issue of *Molecules* for examples of this style.
- Authors' full mailing addresses, homepage addresses, phone and fax numbers, e-mail addresses and homepages can be included in the title page and these will be published in the

manuscripts and the Table of Contents. The corresponding author should be clearly identified. It is the corresponding author's responsibility to ensure that all co-authors are aware of and approve of the contents of a submitted manuscript.

- All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.
- A brief (about 200 words) Abstract should be provided. The use in the Abstract of numbers to identify compounds should be avoided, unless these compounds are also identified by name.
- A list of three to five keywords must be given, and placed after the Abstract. Keywords may be single words or very short sentences.
- Although variations in accord with a manuscript's contents are permissible, in general all papers should have the following sections: Introduction, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgments (if applicable), Experimental and References (or References and Notes, if applicable).
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. Conference slides, video sequences, software, etc., can also be included and will be published as supplementary material.
- Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles supplied for all tables. All table columns should have an explanatory heading. To facilitate layout of large tables, smaller fonts may be used, but in no case should these be less than 10 pt. in size. Authors should use the Table option of MS Word to create tables, rather than tabs, as tab delimited columns are often difficult to format in .pdf for final output.
- Figures and schemes should also be placed in numerical order in the appropriate place within the main text. Numbers, titles and legends should be provided for all schemes and figures. These should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before the figure or scheme.
- Chemical structures and reaction schemes should be drawn using an appropriate software package designed for this purpose. As a guideline, these should be drawn to a scale such that all the details and text are clearly legible when placed in the manuscript (i.e. text should be no smaller than 8-9 pt.). To facilitate editing we recommend the use of any of the software packages widely available for this purpose: MDL® Isis/Draw, ACD/ChemSketch®, CS ChemDraw®, ChemWindow®, etc. Free versions of some of these products are available for personal or academic use from the respective publishers. If another less common structure drawing software is used, authors should ensure the figures are saved in a file format compatible with one of these products.
- *X-ray crystallographic data.* To avoid publication of extensive compilations of crystallographic data and facilitate refereeing of manuscripts, *Molecules* has entered a data deposition scheme with the Cambridge Crystallographic Data Centre

(<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>). Authors planning to include such results in their papers should contact the CCDC to deposit the crystallographic data and obtain the corresponding CCDC deposition number(s) before submitting their manuscripts to *Molecules* (for instructions on doing this, see: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/depositing.html>). The deposition number(s) (usually provided by the CCDC within 3 working days) should be included in the manuscript, along with the following text: "CCDC contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)". This text may be included in the General subsection of the Experimental or as a suitably referenced endnote.

- *Experimental data.* *Molecules* is first and foremost a repository of synthetic procedures and data. The Experimental section should have an initial subsection labeled *General*, containing information on materials, methods, analytical instrumentation used, etc. To allow for correct abstracting of the manuscripts all compounds should be mentioned by correct chemical name, followed by any numerals used to refer to them in the paper. The use of the IUPAC nomenclature conventions is preferred, although alternate naming systems (for example CAS rules) may be used provided that a single consistent naming system is used throughout a manuscript. For authors perhaps unfamiliar with chemical nomenclature in English we recommend the use of compound naming software such as AutoNom. Full experimental details must be provided, or, in the case of many compounds prepared by a similar method, a representative typical procedure should be given. The general style used in the *Journal of Organic Chemistry* is preferred. Complete characterization data must be given for all new compounds. For papers mentioning large numbers of compounds a tabular format is acceptable. In case of compound libraries containing more than 100 compounds, preferably 20% of the whole library. For known compounds appropriate literature references must be given.
- *References.* See the Reference Preparation Guide. References should be numbered according to the order in which they appear in the text.
- *Reference Preparation:* References should preferably be prepared with EndNote®, ReferenceManager™ or a similar bibliography software package. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness (you may use ISI Web of Knowledge, PubMed/MEDLINE or Google Scholar). The Editorial Office will charge additional CHF 10 per citation for which extensive corrections must be made.
- **Abstract/Table of Contents Graphic:** Authors are encouraged to provide a graphical representation of the paper (in either JPEG, GIF, PNG or PDF format) to be used as a graphic of the paper, along with the abstract, on the Table of Contents. The graphic should not exceed 500 pixels width/height. As an example, authors may review the abstract graphic of following papers:
 - <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/1/490>
 - <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/378>

- Electronic Supplementary Information (ESI): Conference slides, video sequences, software, etc., can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about Supplementary Material Depositbeneath

Review / Referees

Authors should suggest at least 5 potential referees with the appropriate technical expertise, although the Editor will not necessarily approach them. Please provide as detailed contact information as possible about the proposed referees (address, homepage address, phone and fax numbers and e-mail address). At least two of the suggested referees must be from a different country than the authors. Additionally, at least two suggested referees must be from a western country (USA, Canada, Japan, Australia or western European country). To identify potential referees, you may check the Editorial Board of our journal and suggest board members with appropriate research interests. In addition, we suggest searching for related papers in Google Scholar and proposing their authors as possible reviewers. Another possibility is to propose authors that you frequently cited in your paper.

English Corrections

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. For this purpose we ask that non-native English speakers ensure their manuscripts are checked before submitting them for consideration. We suggest that for this purpose your manuscript be revised by an English speaking colleague before submission. Authors can also use the services of American Journal Experts (AJE) for this purpose. Authors of articles submitted to MDPI journals benefit of a one-time 10% discount on AJE's charges. Simply follow the above link to make use of the referral discount.

Copyright / Open Access

Articles published in the International Journal of Molecular Sciences will be open-access articles distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license. MDPI will insert following note at the end of the published text:

© 200... by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Reprints

Reprints may be ordered. Please visit <http://www.mdpi.org/reprints/> for more information or to order reprints.

Sample Deposit and Exchange

Optionally and in addition to the payment of the article processing charge (APC), authors are encouraged to register and donate samples of the key compounds and appropriate intermediates from each paper to Molecular Diversity Preservation International (MDPI) in Switzerland for long-term preservation and redistribution at a reasonable price for research purposes. Contributions of starting materials, intermediates or other non-commercially available samples are also acceptable. *Sample Availability* information should be included after the "References" section at the end of the manuscript, and before the copyright notice. For details on samples service, visit: <http://www.mdpi.org/>. Samples should be sent to:

Molecular Diversity Preservation International (MDPI)

Samples Deposit Kandererstrasse 25 CH-4057

Basel

Switzerland

Tel.: +41616837734

Fax: +41613028918

E-mail: samples@mdpi.org

Correct identification of components of *natural products*

The correct identification of the various components of extracts from natural sources is of key importance, and as publishers we are keenly aware of our responsibility to the scientific community in this area. Consequently, for papers on this topic, we have adopted the recommendations of the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavour Industry (IOFI), as published in *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 185. These recommendations may be summarized as follows:

Any identification of a natural compound must pass scrutiny by the latest forms of available analytical techniques. This implies that its identity must be confirmed by at least two different methods, for example, comparison of chromatographic and spectroscopic data (including mass, IR and NMR spectra) with those of an authentic sample, either isolated or synthesized. For papers claiming the first discovery of a given compound from a natural source, the authors must provide full data obtained by their own measurements of both the unknown and an authentic sample, whose source must be fully documented. Authors should also consider very carefully potential sources of artifacts and contaminants resulting from any extraction procedure or sample handling.

Supplementary Material Deposit

- We wish to encourage the submission of supplementary data in electronic formats, so that important chemical, structural or scientific information is retained in full. Spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, etc) can be submitted in JCAMP (.jdx) format.
- 3D coordinate structures (in pdb, mol, xyz or other common formats), if available, should also be submitted.

ANEXO D

Normas do periódico Archives of Pharmacal Research

Instructions for Authors

1. Aims and Scope

Archives of Pharmacal Research is an interdisciplinary journal devoted to the publication of original scientific research papers and reviews in the fields of drug design, drug discovery and development, and drug actions with the aim of providing fundamental and novel information on drugs and drug candidates. Manuscripts will be considered for publication on the condition that the results reported are based on original research that has not been published elsewhere in any journal. Upon acceptance for publication of an article in Archives of Pharmacal Research, the author tacitly agrees to make available any materials used in the published experiments including natural products disclosed in the article that

are not commercially available, so that other researchers may confirm the observations.

In addition, studies on natural products must meet the following specific criteria: a) any natural extract must be defined and appropriate information provided regarding the origin; and b) the author must be able to state that the material under study is endotoxin free.

2. Types of Papers Archives of Pharmacal Research considers manuscripts for publication in the following types of papers: Research Articles: These are full-length research papers that describe original and important pieces of work in detail within the scope of journal. Maximum length of manuscripts should not exceed 6,000 words (24 typescript pages) excluding figures and tables. Invited Reviews: Expert reviews are by invitation only. They should cover the specific topics and not just an overview of the literatures.

3. How to Submit Manuscripts

Submission of a manuscript to Archives of Pharmacal Research implies that the manuscript has not been published previously and is not currently under consideration for publication elsewhere. Manuscript must be submitted through the Springer online submission website (<http://www.editorialmanager.com/arpr>). Please visit the Springer site and create your account to access to the site. Authors should submit the text, tables and artworks in electronic form via this web-based manuscript submission system. Authors must include a cover letter that contains the title, authors, a brief description on the originality of presented work, desired section of publication,

corresponding author's name, address, telephone and fax numbers (including country and city codes), and e-mail address.

4. Review of Manuscripts

All manuscripts are peer-reviewed. A panel of, at least, two independent referees whose names are not normally disclosed to authors will evaluate the submitted manuscripts. Authors will be informed of the reviewer's comments.

5. Proofs

Authors are basically responsible for the factual accuracy of their papers. One set of proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned to the publisher within 3 days of receipt. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage. In addition, the editors reserve the right to make any necessary correction to a paper prior to publication.

6. Transfer of Copyright

All authors must sign the 'Transfer of Copyright' agreement before the article can be published. This transfer agreement enables the Pharmaceutical Society of Korea to protect the copyrighted material for the authors.

7. Page Charge

Fee of US \$ 20 per printed page will be charged to the authors upon the acceptance of the manuscript on the form accompanying the proofs. Note that payment is not a condition of publication: articles can be accepted or rejected on their merit alone.

8. Reprints

Fifty reprints of each accepted paper will be supplied to the corresponding author at no cost. Additional reprints will be available by ordering on the reprint order form.

9. Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be concisely written in English and typed double-spaced throughout on A-4 paper with margins of at least 3.0 cm. All pages should be numbered in succession, the title page being page 1. Each manuscript must have a title page, which includes only the title, the authors' names with their affiliation, a running title of not more than 50 characters including spaces, and mailing address, which includes telephone and Fax numbers and e-mail address of the corresponding author. The title should be as short as is consistent with clarity. Tables and figures should be on separate pages placed at the end of the manuscript. Abbreviation. The excessive use of abbreviations in the text is strongly discouraged. Authors should only use abbreviations sparingly and should always define an abbreviation when first used by placing it in parentheses after the full term, e.g. Acetylcholinesterase (AChE). The metric system for all measurements should be expressed in lowercase letters without periods (mL, nm, min, etc.). Chemical Structures. CS

ChemDraw Ultra (version 5.0 or later) will be our primary illustration software for illustration of chemical structures. Therefore, authors are strongly recommended to use the software and to save their structures in ACS format for manuscript submission. A detailed setting for the illustration software would be as follows; Chain angle (120), Bond spacing (18% of length), Fixed length (0.508 cm), Bold width (0.071 cm), Line width (0.021 cm), Margin width (0.056 cm), and Hash spacing (0.088 cm).

Drug names. Drug names should be the official or approved names; trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name and address must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg. Concentration should be given in terms of molarity (e.g., nM or mM), or as unit weight/unit volume solution (e.g., mg/L) stating whether the weight refers to the salt or the active component of the drug.

10. Organization of Manuscripts

Each manuscript must begin with an ABSTRACT that summarizes the results obtained and the conclusion drawn. It should not exceed 200 words. A short list of six keywords or phrases should be supplied following the abstract.

INTRODUCTION. An introduction should first begin with general aspect for a non-specialist and then continue with the specific reason for undertaking the investigation. No attempt should be made to indicate the results obtained.

MATERIALS AND METHODS. Procedures used in the work should be given in sufficient detail to permit the repetition by other researchers. Nevertheless, published procedures should be briefly summarized by mentioning the reference(s) and only described in detail if the procedures have been modified.

RESULTS. In this section, only observations should be described without discussion of their significance.

DISCUSSION. The authors' interpretations of their observations (or findings) should be accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work.

REFERENCES. Only papers closely related to the author's work should be cited. References should be assembled alphabetically. Follow the Harvard format. That is, references are referred by name and year. When referring to more than one paper from a same author from a same year, the alphabets a, b, c, etc. should be placed next to the year of publication to distinguish the articles. In the text, when referring to a work by sole author, the name of author should be given like (Robinson, 1998) and (Robinson, 1999; Jeong, 2000). When referring to a work by two authors, the name of authors should be given like (Robinson and Jeong, 2001). When referring to a work by more than three authors, the name of the first author should be given followed by et al. such as (Robinson et al., 2002). Literature references must consist of names and initials of all authors, title of the paper referred to, abbreviated title of the journal and the volume, year, and first and last page numbers of the paper. The style and punctuation of the references should confirm with the following examples:

Journals:

Lai, Y. -L., Mehta, R. C., Thacker, A. A., Yoo, S. -D., MacNamara, P. J., and DeLuca, P. P., Sustained bronchodilation with isoproterenol poly(glycolidecolactide) microspheres. Arch. Pharm. Res., 10, 119-125 (1993).

Books: Azria, M., The Calcitonins: Physiology and Pharmacology.

Karger, London, (1989). Borchardt, R. T., Hidalgo, I. J., Hillgren, K. M. and Hu., M., Pharmaceutical applications of cell culture: An Overview, In Wilson, G., Davis, S. S., Illum, L. and Zweibaum, A. (Eds.). Pharmaceutical Application of Cell and Tissue Culture to Drug Transport. Plenum Press, New York, pp. 1-14, (1991).

Journal names should be abbreviated in accordance with Chemical Abstracts or Biological Abstracts List of Serials. Tables. Each table should be placed on a separate page and numbered in one consecutive series of Roman numerals in the order cited in the text. Tables should be formatted with horizontal lines only: vertical ruled lines are not required. Column heading should be kept as brief as possible and should indicate units of measurements. Any annotation to headings or to tabulated items must be identified by superscript lowercase italic letters, a, b, c, etc. and added in sequence at the foot of the table.

Figures and Schemes. A list of figure and scheme legends must be submitted on a separate page to accompany the figures and schemes. Each legend must give a concise description of the figure and scheme concerned, together with any essential experimental details not described in the text. In particular, the key to any symbols or distinctive line formats used on the figure must be given.

Note that all figures (drawings, schemes, charts and photographs) should be numbered in one consecutive series of Arabic numerals in the order cited in the text.

Figures generated by a laser quality printer or good quality black and white photographs are acceptable.

Figures must be large enough for the necessary reduction for printing. Each figure should be numbered in order. Essential half-tone figures, reproduced from the original, will be included at the Editors discretion. Color photographs will be printed at the Editors discretion, on the understanding that the authors will bear the cost.

<http://www.springer.com/journal/12272>