



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

**JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS ISOXASOLINA-ACILHIDRAZONAS EM  
DIFERENTES MODELOS MURINOS**

**Recife  
2017**

**JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS ISOXASOLINA-ACILHIDRAZONAS EM  
DIFERENTES MODELOS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Química para a Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanda Lúcia dos Santos

Prof. Antonio Rodolfo de Faria

**Recife  
2017**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Dias, Jhonatta Aleandre Brito

Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de derivados Ixasolina-Acilhidrazonas em diferentes modelos murinos / Jhonattan Alexandre Brito Dias. – 2017.

66 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientadora: Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos.

Coorientador: Prof. Antonio Rodolfo de Faria.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Inflamação. 3. Anti-inflamatórios. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientador). II. Santos, Vanda Lúcia dos (coorientador). III. Faria, Antônio Rodolfo de (orientador). IV. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-136

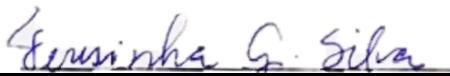
**JHONATTA ALEXANDRE BRITO DIAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS ISOXASOLINA-ACILHIDRAZONAS EM  
DIFERENTES MODELOS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Química para a Saúde.

Aprovada em: 23 / 02 / 2017

**BANCA EXAMINADORA**



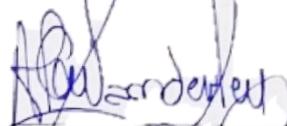
---

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco



---

Profª. Dra. Vanda Lúcia dos Santos (Co-orientadora)  
Univeridade Estadual da Paraíba



---

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

*Aos meus pais, por terem me concebido a vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter subido mais um degrau, por mais um sonho que se concretiza. Por sempre estar presente comigo em todas as horas mesmo quando fraco ou triste. A Ele toda honra toda glória e todo o poder. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais: Iza Maria Brito e Vanderley Freire Dias por todo amor, carinho, compreensão, educação, investimento apoio e incentivo nas mais diversas situações e devaneios enfrentados ao longo da minha vida e carreira profissional.

Aos meus irmãos Ayse Pricilla Brito Dias, Johnson Augusto Brito Dias e Moises Vidal Fernandes pelo companheirismo e cumplicidade.

À minha tia Mércia Pereira de Brito por sempre estar presente e me apoiar de maneira incondicional na busca e realizações dos meus sonhos e projetos.

A todos da minha família por acreditarem e confiarem na minha capacidade e me encorajarem a sempre seguir em frente independente dos obstáculos

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Teresinha Gonçalves da Silva, por ter me aceitado como orientando, pelo seu sempre excelente trabalho desenvolvido no laboratório bem como suas valiosíssimas orientações, conduzindo-me nos primeiros e essenciais passos da minha pós-graduação e vida profissional.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vanda Lucia dos Santos por ter me mostrado e encaminhado ao caminho da pesquisa científica, por seu excelente trabalho, amizade e exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria, do Departamento de Farmácia, da Universidade Federal de Pernambuco, por fornecer as moléculas de estudo utilizadas neste trabalho e por seu excelente trabalho e desempenho.

Aos meus amigos Laís Nerys, Bruno Iraquitan, Jaciana Aguiar, Fernanda Mota, Sandra Cabral, Cynthia Layse, Anne Cecília, Elizabeth Borba, Larissa Cardoso, Carlson Junior, Tatiane Bezerra, Isla Bastos, Temístocles Italo, Caroline Soares, André Barros por fazerem parte da minha caminhada científica. Pelo carinho e incentivo que me fizeram durante esses dois anos percorridos.

Aos alunos de iniciação científica Wendell Santos, Filipe Plácido, Rayane Keyte e Alane Dornelas pela dedicação e empenho ao trabalho científico.

A todos que fazem parte do Biofarmatox, Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológicas de Produtos Bioativos e do Departamento de Antibióticos por toda prestatividade e contribuição para consolidação deste trabalho.

À secretária Adenilda Eugênia de Lima e todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

A cada professor que compõe o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelo tempo e ensinamentos destinados à minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo e apoio financeiro.

*Que darei eu ao Senhor, por todos os  
benefícios que me tem feito?*

*Tomarei o cálice da salvação, e invocarei o  
nome do Senhor. Pagarei os meus votos ao  
Senhor, agora, na presença de todo o seu  
povo.*

(Salmos 116:12-14)

## RESUMO

A inflamação é definida como mecanismo comum a várias doenças em resposta a danos físicos e/ou químicos, patógenos, injúrias tóxicas, isquemia ou autoimunes e caracteriza-se como um processo cuja finalidade é proteger o organismo. Em resposta, o organismo exhibe algumas reações conhecidas como sinais cardinais da inflamação, entre os quais destaca-se a dor. A dor ocorre devido a sensibilização das fibras sensoriais mediada por substâncias responsáveis por proporcionar uma sensação desagradável. Tentativas em desenvolver novos fármacos como alternativa terapêutica a farmacoterapia já existentes é motivada devido a efeitos adversos causados pelos anti-inflamatórios disponíveis. Neste contexto, este trabalho objetivou-se em avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de um novo derivado isoxazolina-acilhidrazona (R-151). Para avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizado o modelo de pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos, com determinação de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) e mieloperoxidase (MPO); enquanto que para a avaliação da nocicepção, empregou-se o modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético e o teste da formalina. No teste da pleurisia induzida por carragenina todas as doses testadas (1, 10 e 100 mg/kg) inibiram a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) em 62%, 72% e 74%, respectivamente. O fármaco utilizado como padrão foi a dexametsona (0,5 mg/kg), que inibiu a migração de PMN em 68%. Em relação a determinação dos níveis de NO e MPO todas as doses testadas demonstraram inibição significantes quando comparados ao grupo controle, os resultados provenientes das dosagens de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF foram igualmente satisfatórios em todas as doses testadas. O R-151 também reduziu o número de PMN em 48,5%, 53,7%, 58,7% e 69,1% na pleurisia induzida por zimosano, histamina, bradicinina e substância P, respectivamente. Na pleurisia induzida por histamina o fármaco utilizado como padrão é a terfenadina (25 mg/kg) que apresentou 63,9% de inibição de PMN. Para os demais agentes indutores da inflamação, foi utilizado como controle a dexametasona (0,5 mg/kg) apresentando estes 67,3%, 87,9%, 48,2%, de inibição de PMN na pleurisia induzida por zimosano, bradicinina e substância P, respectivamente. No teste de contorções, o R-151 reduziu o número de contorções abdominais em 16%, 49% e 41%, respectivamente. O fármaco padrão (ibuprofeno 10 mg/kg), apresentando um percentual de 48% de inibição. No teste de formalina, o R-151, na dose de 10 mg/kg, reduziu o número de lambidas na pata em 28% e de 55% na

primeira e segunda fase respectivamente, e não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparação ao fármaco padrão, dexametasona (0,5 mg/kg). Mediante aos resultados apresentados nos experimentos de pleurisia induzida por carragenina e de contorções abdominais por ácido acético, foi eleita a dose de 10mg/kg da R-151 para dar continuidade aos estudos realizados posteriormente (formalina, pleurisia induzida por vários agentes flogísticos e avaliação da atividade expectorante) devido esta ser a mais eficaz dentre as testadas. Os resultados indicam que o derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 apresentou atividades anti-inflamatória e antinociceptiva promissoras na redução do recrutamento de PMN, citocinas pró inflamatórias como IL1 $\beta$ , do TNF e do MPO, provavelmente inibindo a cascata de eventos envolvidos no processo inflamatório e algico.

**Palavras-chaves:** Pleurisia; Atividade anti-inflamatória; Atividade antinociceptiva; Isoxazolina; Acilhidrazona.

## ABSTRACT

Inflammation is defined as a common mechanism to various diseases in response to physical and / or chemical damages, pathogens, toxic injuries, ischemia or autoimmune and is characterized as a process whose purpose is to protect the body. In response, the body exhibits some reactions known as cardinal signs of inflammation, among which pain is prominent. Pain occurs due to sensitization of the sensory fibers mediated by substances responsible for providing an unpleasant sensation. Attempts to develop new drugs as a therapeutic alternative to existing pharmacotherapy is motivated due to adverse effects caused by the available anti-inflammatories. In this context, this work aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of a new isoxazoline-acylhydrazone derivative (R-151). For the evaluation of the anti-inflammatory activity, the pleurisy model induced by several phlogistic agents with cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), nitric oxide (NO) and myeloperoxidase (MPO) were determined; whereas for the nociception evaluation, the model of abdominal writhings induced by acetic acid and the formalin test were used. In the carrageenan-induced pleurisy test, all doses tested (1, 10 and 100 mg / kg) inhibited the migration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in 62%, 72% and 74%, respectively. The standard drug was dexamethasone (0.5 mg / kg), which inhibited PMN migration by 68%. Regarding the determination of the levels of NO and MPO, all doses tested showed significant inhibition when compared to the control group, results from IL-1 $\beta$  and TNF cytokine dosages were equally satisfactory at all doses tested. R-151 also reduced PMNs by 48.5%, 53.7%, 58.7% and 69.1% in pleuritis induced by zymosan, histamine, bradykinin and substance P, respectively. In histamine-induced pleurisy the drug used as standard is terfenadine (25 mg / kg) which showed 63.9% inhibition of PMN. For the other agents inducing inflammation, dexamethasone (0.5 mg / kg) was used as the control, with 67.3%, 87.9%, 48.2% inhibition of PMN in pleuritis induced by zymosan, bradykinin and substance P, respectively. In the writhing test, R-151 reduced the number of abdominal writhes by 16%, 49% and 41%, respectively. The standard drug (ibuprofen 10 mg / kg), presenting a percentage of 48% inhibition. In the formalin test, R-151, at a dose of 10 mg / kg, reduced the number of licking in the paw by 28% and 55% in the first and second phases respectively, and did not present statistically significant differences when compared to the standard drug , dexamethasone (0.5 mg / kg). Based on the results presented in the experiments of

pleurisy induced by carrageenan and abdominal contortions by acetic acid, the dose of 10mg / kg of R-151 was chosen to give continuity to the studies carried out later (formalin, pleurisy induced by several phlogistic agents and evaluation of expectorant activity) is expected to be the most effective among those tested. The results indicate that the R-151 isoxazoline-acylhydrazone derivative showed promising anti-inflammatory and antinociceptive activities in reducing the recruitment of PMN, proinflammatory cytokines such as IL1 $\beta$ , TNF and MPO, probably inhibiting the cascade of events involved in the inflammatory process and pain.

**Keywords:** Pleurisy; Anti-inflammatory activity; Antinociceptive activity; Isoxazoline; Acilhidrazone;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recrutamento de leucócitos durante processo inflamatório. ....	22
Figura 2 – Cascata do ácido araquidônico COX1 e 2, protetores gástricos pró- inflamatórios PGD2 e outras prostaglandinas. ....	24
Figura 3 – Mecanismo específico da dor nociceptiva. ....	31
Figura 4 – Mecanismo específico da dor inflamatória. ....	33
Figura 5 – Cascata da inflamação e atuação dos anti-inflamatórios. ....	35
Figura 6 – Efeito do R-151 sobre a pleurisia induzida por carragenina. ....	45
Figura 7 – Efeitos da R-151 na concentração de NO e MPO no exsudato dos animais submetidos ao teste de pleurisia induzida por carragenina. ....	47
Figura 8 – Concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no exsudato da cavidade pleural dos animais submetidos à pleurisia induzida por carragenina e tratados com o derivado R-151. ....	49
Figura 9 – Efeito do R-151 sobre a contorção induzida por ácido acético. ....	53
Figura 10 – Efeito do R-151 sobre nocicepção induzida por formalina 2,5%. ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução ponderal e peso absoluto dos órgãos dos grupos controle e tratado com R-151 na toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg.....	44
Tabela 2 – Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com R-151 na toxicidade aguda da dose de 2.000 mg/kg. ....	45
Tabela 3 – Total de leucócitos polimorfonucleares (média ± desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação nos animais dos grupos controle e tratado com o derivado R-151 no teste de pleurisia induzida por zimosano, histamina, substância P e bradicinina. ....	51
Tabela 4 – Efeitos do derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 sobre a mensuração da concentração de vermelho de fenol intratraqueal no modelo de atividade expectorante.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	5-hidroperoxieicosatetraenóico
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AcOH	Ácido acético
ADP	Difosfato de adenosina
AIES	Anti-inflamatórios Esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
cav.	Cavidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
CMC	Carboximetilcelulose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão médio
F. F	Faixa de fusão
FcεRI	Receptor de Imunoglobulina E de alta afinidade
FTCβ	Fator transformador de crescimento β
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
HTAB	Hexadeciltrimetil Brometo de Amônia
IFN-	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4

LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MBL	Lectinas ligadoras de manose
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução tampão fosfato
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaciclina
PLA2	Fosfolipase A2
PMNLs	Leucócitos Polimorfonucleares
R. F	Fator de retenção
SP	Substância P
TX	Tromboxano
TXA2	Tromboxano A2
TXB2	Tromboxano B2
v.ip	Via intrapleural
v.o.	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 OBJETIVOS .....	19
1.1.1 Objetivo geral .....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO .....	21
2.1.1 Inflamação aguda .....	22
2.1.2 Inflamação crônica .....	23
2.2 MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO .....	24
2.2.1 Mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico e os eicosanóides .....	24
2.2.2 Aminas vaso ativas, Peptídeos e Cininas .....	25
2.2.3 Óxido nítrico.....	27
2.2.4 Mieloperoxidase.....	27
2.2.5 Resposta Imune e inflamação .....	28
2.2.6 Citocinas .....	29
2.3 FISIOLOGIA DA DOR .....	30
2.3.1 Dor Nociceptiva .....	31
2.3.2 Dor Neuropática .....	31
2.3.3 Dor Inflamatória .....	32
2.3.4 Mediadores químicos da dor .....	32
2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS E NÃO-ESTEROIDAIIS .....	33
2.4.1 Anti-inflamatórios esteroidais.....	34
2.4.2 Anti-inflamatórios não esteroidais.....	34
2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ISOXAZOLINAS-ACILHIDRAZONAS	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 SUBSTÂNCIAS .....	37
3.2 REAGENTES .....	37

3.3 EQUIPAMENTOS.....	37
3.4 ANIMAIS .....	37
3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA .....	38
3.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	39
<b>3.6.1 Pleurisia induzida por carragenina .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.3 Determinação dos níveis de mieloperoxidase .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.4 Determinação dos Níveis de Citocinas .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.5 Pleurisia induzida por histamina, bradicinina, substância P e zimosano .....</b>	<b>40</b>
3.7 ATIVIDADE EXPECTORANTE .....	41
3.8 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	41
<b>3.8.1 Nocicepção induzida por ácido acético .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8.2 Teste de Formalina .....</b>	<b>42</b>
3.9 ANÁLISE DOS DADOS .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
4.1 TOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ).....	43
4.2 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA .....	45
4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E MIELOPEROXIDASE (PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA) .....	46
4.4 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A E IL-1B (PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA).....	48
4.5 PLEURISIA INDUZIDA POR ZIMOSANO, HISTAMINA, SUBSTÂNCIA P E BRADICININA .....	50
4.6 ATIVIDADE EXPECTORANTE .....	52
4.7 CONTORÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	53
4.8 TESTE DE FORMALINA .....	54
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser definida na dinâmica de sua resposta como aguda ou crônica de acordo com o tempo decorrido de suas manifestações. Cada fase exibe perfis celulares característicos que as diferenciam: macrófagos, neutrófilos e células dendríticas e na fase aguda, já na fase crônica, predominam mononucleares tais como mastócitos, macrófagos e linfócitos. Doenças inflamatórias como hepatite aguda, picadas de insetos ou injúrias na pele são caracterizadas por uma resposta inicial imediata, posterior aos danos e/ou antígenos, os neutrófilos são imediatamente acionados para o sítio inflamatório por sinais químicos responsáveis por direcioná-los, seguida pela invasão de monócitos/macrófagos que se torna o principal tipo de células após 48 horas (GARCIA-PASTOR et al., 1999; FRÖDE; MEDEIROS, 2001; KIRVESKARI et al., 2003; RANKIN, 2004).

A principal função dos neutrófilos é de fagocitar antígenos que são degradados no interior das células através de processos enzimáticos. A sensibilização dos neutrófilos desencadeia a secreção de citocinas que amplificam a resposta inflamatória e resulta num infiltrado linfocitário como também em mudanças estruturais no endotélio vasculares, edema e destruição enzimática. A intenção da fase aguda é de eliminar completamente os antígenos. Contudo, a definição começa já durante a fase inicial da resposta inflamatória. Granulócitos migram em direção ao sítio inflamado e promovem a ativação do ácido araquidônico e metabólitos dos leucotrienos pela lipoxina. Outros mediadores de origem lipídica tais como as protectinas e resolvinas encarregam-se de iniciarem a apoptose dos neutrófilos. Macrófagos que exercem a função de eliminar neutrófilos apoptóticos também são responsáveis por estimularem a resolução pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como o TGFbeta. Quando ocorre discrepância entre a resposta inflamatória e a resolução, o quadro inflamatório pode evoluir para uma cronicidade (FRÖDE; MEDERIOS, 2001; BERGER; MOLLER, 2002; SZÉLES; ÖRÖCSIK; NAGY, 2007).

Embora o mecanismo da nocicepção do mesmo modo que o da inflamação sejam cruciais à homeostase, os problemas relacionados assim como o desconforto provocado devido a essa resposta exige, em alguns casos, a intervenção com o uso de fármacos. Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides e os anti-

inflamatórios não esteroidais (AINEs), são fármacos que apresentam o poder de interferir nestes processos reacionais de defesa ostentados pelo organismo, reduzindo as avarias e propiciando maior conforto (COUTINHO et al, 2009).

Não obstante da eficácia clínica dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os seus efeitos secundários como reações alérgicas, aumento da incidência de doenças cardiovasculares, injúrias gástricas, toxicidade renal e hepática representam um grande problema no tratamento de diversas patologias que apresenta a inflamação como via de resolução e restabelecimento do homeostasia (SIMONS; WAGNER; WESTOVER, 2000; VOGIAGIS et al., 2001; PATRONO; ROCA, 2009).

Encontrar substâncias eficazes ao mesmo tempo em que apresentem baixa toxicidade impulsionam os cientistas e pesquisadores a uma frenética busca por novos fármacos. Entre os métodos de pesquisa, os processos de modificação molecular são os mais promissores (BARREIRO et al., 2002; AMARAL; MONTANARI, 2002).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de um derivado isoxazolina-acilhidrazona como novo protótipos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de um novo derivado isoxazolinacilhidrazona (R-151) como novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar estudos de toxicidade aguda para determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>);
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do derivado R-151 em modelos animais de inflamação aguda como pleurisia induzida por carragenina, histamina, bradicinina, substância P e zimosano;

- Determinar as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO no exsudato inflamatório de animais tratados com o derivado em estudo no modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina;
- Determinar a concentração de MPO em amostras do tecido pulmonar do modelo de pleurisia induzida por carragenina;
- Avaliar a atividade expectorante em modelo experimental murino;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do derivado isoxazolina-acilhidrazona nos modelos experimentais de nocicepção (teste de contorções abdominais, teste da formalina).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é classicamente definida como parte de uma resposta biológica complexa aos danos celulares causados por lesão ou infecção, em que o sistema imunológico tenta eliminar ou neutralizar estímulos prejudiciais e inicia cicatrização e processos regenerativos. (MEDZHITOV, 2008; SHALAPOUR; KARIN, 2015).

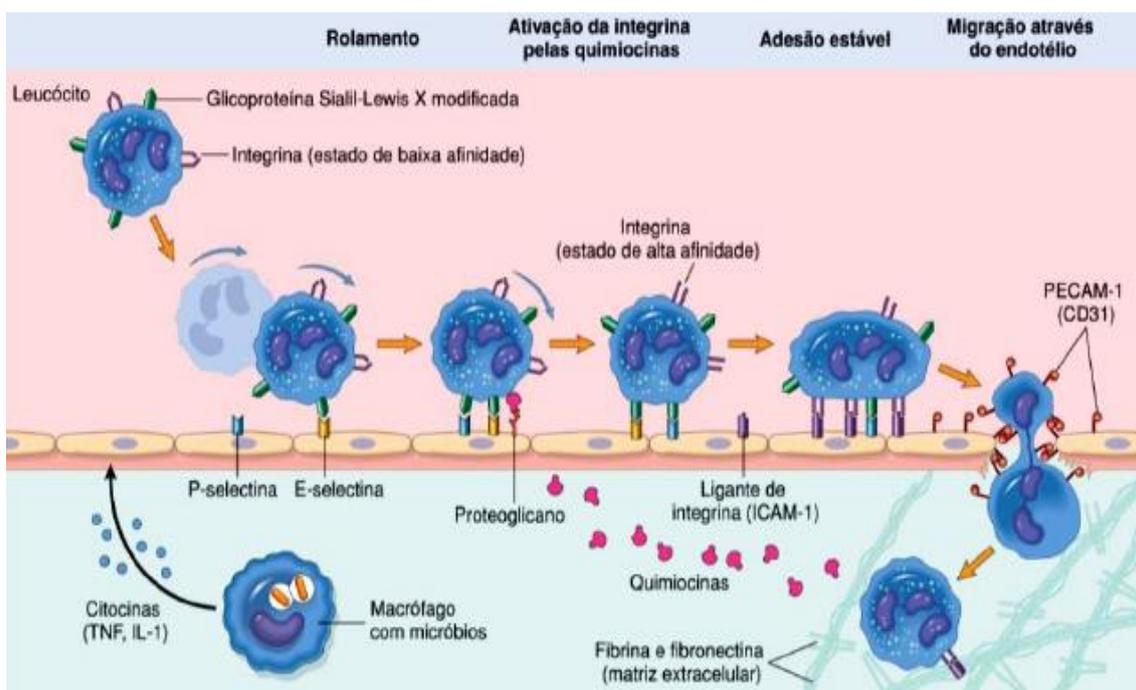
A resposta inflamatória tem como resultado o reestabelecimento da integridade celular contra as agressões, no entanto, uma resposta exacerbada e prolongada pode levar ao desenvolvimento de algumas doenças como artrite reumatoide, diabetes e doença de Alzheimer (SERHAN; CHIANG, 2004; TRACEY, 2002).

Durante o processo inflamatório, muitos mediadores como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas promovem, principalmente, a vasodilatação acompanhada pelo calor e rubor, sinais característicos da reação inflamatória (BANNENBERG; SERHAN, 2010; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Os eventos iniciam-se com a liberação de substâncias quimiotáticas e aminas vasoativas como a serotonina e a histamina liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão tissular, provocando uma vasodilatação e, conseqüentemente, um aumento de fluxo sanguíneo na área afetada. Na seqüência, há movimentação de proteínas e leucócitos do sangue para o tecido extravascular devido a contração do citoesqueleto das células endoteliais, favorecendo assim a permeabilidade vascular (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como: rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme, transmigração ou diapedese e quimiotaxia, como mostra a figura 1. Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão (selectinas que são formadas por três proteínas E-selectina, P-selectina e a L-selectina, as integrinas, as imunoglobulinas e as caderinas), de mediadores quimiotáticos (como a interleucina-8 (IL-8), o fator do complemento C5a e o leucotrieno (LTB<sub>4</sub>), (BILATE, 2007; KELLY; KWANG; KUBES, 2007). Destacam-se

no processo as selectinas, dentre elas a P-selectina, que participa apenas no rolamento, enquanto a E-selectina participa tanto no rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio. As integrinas e as imunoglobulinas, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), medeiam à adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo importantes no processo da diapedese (MILES et al., 2008; SANDBORN; YEDNOCK, 2003).

Figura 1 – Recrutamento de leucócitos durante processo inflamatório.



Fonte: Kumar e colaboradores (2008).

Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda há acúmulo predominante de neutrófilos. Em processos alérgicos e infecções parasitárias pode ocorrer também a migração de eosinófilos. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (FRANCISCHETTI et al., 2010).

### 2.1.1 Inflamação aguda

A inflamação aguda é a reação imediata do organismo frente a um estímulo físico, químico ou biológico, onde mediadores de defesa são sintetizados e direcionados ao local da lesão. É um tipo de resposta normalmente breve, podendo durar alguns minutos ou até mesmo alguns dias. O principal objetivo desta reação inflamatória é possibilitar ao tecido lesado o acesso de células, proteínas e outros elementos originários do sangue através de alterações na microvasculatura, infiltração de neutrófilos seguida por monócitos que se diferenciam em macrófagos para restabelecer a estrutura do tecido lesado. (COLLINS, 1999; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Segundo Contran et al. (2005), o processo inflamatório agudo pode ser dividido em uma sequência de eventos. Primeiramente há uma lesão ao organismo, fazendo com que este produza mediadores inflamatórios. Em seguida há uma vasodilatação devido ao aumento do fluxo sanguíneo local pela retração de células endoteliais, favorecendo assim o encontro entre os mediadores inflamatórios e região inflamada. Posteriormente, a formação do edema é causada por extravasamento de macromoléculas plasmáticas, devido ao aumento da pressão osmótica local e evasão de água. E por último, a quimiotaxia leucocitária, caracterizando o processo inflamatório. (COLLINS, 1999; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

### **2.1.2 Inflamação crônica**

A inflamação crônica é uma evolução da inflamação aguda devido à persistência do estímulo agressor (infecções por microrganismos, agentes de baixo grau de toxicidade, algumas viroses e reações autoimunes), ocasionando uma destruição contínua dos tecidos (DE MARZO et al., 2007; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

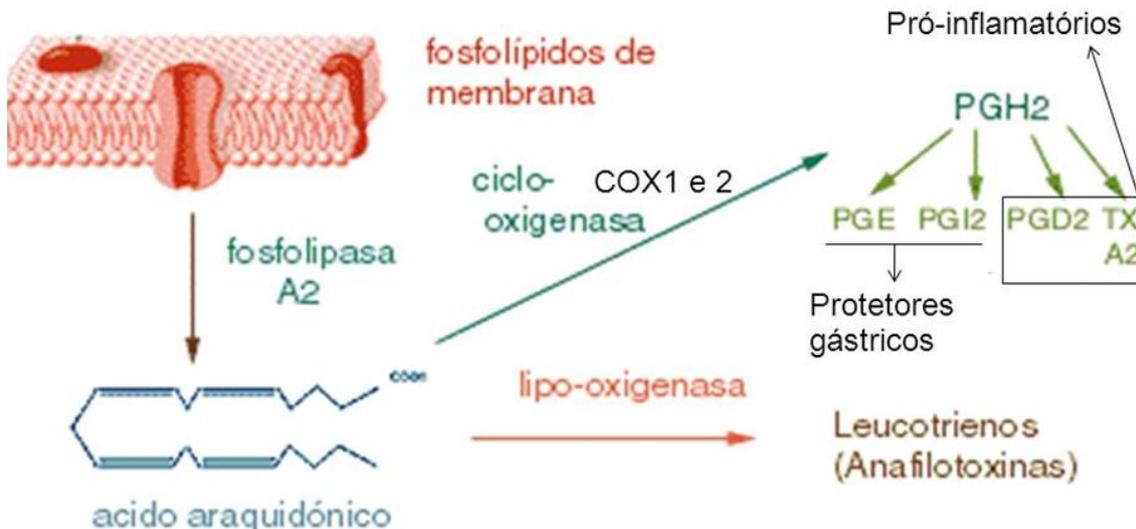
A inflamação crônica se prolonga por períodos bem mais extensos que a inflamação aguda e está associada com alguns processos específicos de alteração histológica como fibrose e necrose do tecido afetado, proliferação de vasos sanguíneos e, principalmente, a participação de linfócitos e macrófagos (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993).

## 2.2 MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO

### 2.2.1 Mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico e os eicosanóides

Os mediadores derivados do ácido araquidônico (AA), conhecidos genericamente como eicosanóides, compreendem os prostanóides, leucotrienos (LTs) e lipoxinas. O AA é um ácido graxo poliinsaturado contendo 20 carbonos presente, normalmente, esterificado nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídeos da membrana celular por ação principalmente da enzima fosfolipase A2 (PLA2) que é ativada por diversos estímulos químicos, físicos e mecânicos ou por outros mediadores (p. ex. C5a). Uma vez liberado o AA é metabolizado por duas principais vias enzimáticas, a via da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e a via da lipooxigenase (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX), como ilustra a figura 2.

Figura 2 – Cascata do ácido araquidônico COX1 e 2, protetores gástricos pró-inflamatórios PGD2 e outras prostaglandinas.



Fonte: Oliveira (2014). Adaptado.

Os produtos da via da COX são os prostanóides (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub>) enquanto os produtos da via da LOX, são os leucotrienos (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>) e lipoxinas. (Rajakariar et al., 2006; Harizi et al., 2008).

Os prostanóides podem ser gerados por duas isoformas enzimáticas, a COX-1 e

COX-2. A COX-1, é expressa constitutivamente em vários tecidos produzindo PGs em baixos níveis e contribui para a manutenção das funções fisiológicas. Por outro lado, a COX-2, também conhecida como induzível, como o nome implica, tem sua expressão altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, citocinas e mitógenos, por isso, a biossíntese de PGs durante processos inflamatórios é creditado à COX-2. Entretanto, a COX-2 também é expressa constitutivamente em algumas regiões cerebrais, no aparato justa glomerular renal e endotélio vascular. Essas duas enzimas catalizam inicialmente a conversão do AA em PGG<sub>2</sub> e depois em PGH<sub>2</sub> que é subsequentemente convertido nos prostanóides biologicamente ativos (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub>). (Gerritsen, 1996; Rajakariar et al., 2006; Harizi et al., 2008).

Os eicosanóides atuam na microcirculação, incluindo coagulação, fibrinólise, reatividade, controle do fluxo sanguíneo vascular, permeabilidade, adesão e migração leucocitária está relacionado com o controle local da função das células do sistema imunológico. Os eicosanóides em conjunto com outros mediadores, participam das mudanças hemodinâmicas e migração celular durante o processo inflamatório. A PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> promovem vasodilatação aumentando o fluxo sanguíneo na microvasculatura. Além disso, potencializam o aumento da permeabilidade vascular e os efeitos quimiotáticos de outros 22 mediadores. A PGE<sub>2</sub> está envolvida no desenvolvimento da febre e dor durante a inflamação. Essa PG sensibiliza os neurônios aferentes primários tornando-os mais responsivos ou sensíveis a estímulos algícos como a bradicinina. Os cisteinil leucotrienos, compreendidos pelo LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, causam intensa vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular em regiões venulares. O LTB<sub>4</sub> é um potente mediador quimiotático promovendo adesão e migração de leucócitos. O tromboxano (TXA<sub>4</sub>) produz vasoconstrição e promoção da agregação plaquetária (Gerritsen, 1996; Rajakariar et al., 2006; Harizi et al., 2008).

### **2.2.2 Aminas vaso ativas, Peptídeos e Cininas**

As aminas vasoativas, histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT) são aminas com ação sobre a vascularização. Esses mediadores encontram-se armazenados em grânulos citoplasmáticos, sendo a histamina encontrada principalmente nos mastócitos, enquanto a serotonina está presente nas células enterocromafins e nas

plaquetas. As aminas são as primeiras substâncias a serem liberadas durante a ativação da cascata da inflamação e são responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática. Essas alterações ocorrem durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório contribuindo para a formação do edema (LAVICH et al, 2003; PARADA et al., 2001).

Vários fatores (químicos ou físicos) induzem a liberação desses mediadores de suas fontes, incluindo reações imunes, anafilatoxinas, substância P, citocinas de em conjunto promovem a liberação de histamina e agregação plaquetária após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato, complexos imunes, fator de agregação plaquetária (PAF) (promovem liberação de serotonina das plaquetas). A liberação de histamina e sua ação principalmente nos receptores H1 na microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular, além da síntese de prostaciclina e indução da liberação de óxido nítrico pelo endotélio. O aumento da permeabilidade vascular ocorre por meio da contração das células endoteliais e subsequente formação de abertura das junções celulares endoteliais. Já a serotonina é responsável pela vasodilatação dependente de óxido nítrico e aumento da permeabilidade vascular (KUMAR et al., 2005; JUTEL et al., 2009).

Entre os peptídeos relacionados com o processo inflamatório podemos citar a substância P. A substância P pertence à família das taquicininas, que apresenta efeitos pró-inflamatórios e ação inflamatória neurogênica. Atuam junto com as neurocininas em receptores NK-1, promove o aumento do aporte sanguíneo e da permeabilidade vascular, e em receptores NK-2, induzindo broncoconstrição (GOUDET et al., 2008; ZHANG et al., 2009). A substância P exerce efeito vasodilatador, aumento da permeabilidade vascular, recruta células provenientes do sistema imune até o local da lesão e liberação de diversos neuromediadores por mastócitos através do processo de degranulação (OTTEN, 1980).

As cininas, representadas pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, originam peptídeos vasoativos liberados a partir de substratos proteicos. A bradicinina é sintetizada por uma enzima (calicreína) pertencente ao sistema enzimático das cininas, a partir da clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogênio (precursor inativo), (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). A

bradicinina é um peptídeo vasoativo que age em receptores situados principalmente na musculatura, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000). Os receptores B<sub>2</sub> da bradicinina são constitutivos e medeiam o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, broncoconstrição e estimulação de receptores algésicos. Os receptores B<sub>1</sub>, pouco expressos na maioria dos tecidos em condições normais, são rapidamente induzidos em condições patológicas por inúmeros estímulos pró-inflamatórios, como as citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-1 e TNF- $\alpha$ . (CALIXTO et al., 2004)

### 2.2.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico é produzido a partir do aminoácido L-arginina através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em diferentes células e tecidos animais. Possui três isoformas de NOS identificadas: NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS) (ZHANG, CAO; ZHONG, 2009).

O papel do NO na inflamação está relacionado ao relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução do recrutamento de leucócitos, redução da agregação e aderência plaquetária, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres. Contudo o NO pode ser lesivo para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (RIBBONS et al., 1997).

### 2.2.4 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase encontrada abundantemente em grânulos no interior de neutrófilos e monócitos onde são armazenadas anteriormente a sua liberação. Entretanto, os monócitos contêm apenas um terço da MPO encontrada quando comparada aos níveis encontrados nos neutrófilos (ARNHOLD, 2004). A MPO é responsável por participar na formação de uma grande variedade de compostos. Ao passo que ocorre a conversão de moléculas de oxigênio em ânions superóxido catalisados pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), a enzima superóxido desmutase converte o ânion em peróxido de hidrogênio, o qual

exerce ação microbicida. Subsequente a esta ação entre a ligação da MPO com o peróxido de hidrogênio e sua conversão em íons hidroxila ou com ácido hipocloroso que também apresentam elevada ação microbicida (ARNHOLD, 2004; JANTSCHKO, et al., 2004).

A MPO é considerada um marcador de leucócitos ativados (LAU; BALDUS, 2006) e, pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008).

### **2.2.5 Resposta Imune e inflamação**

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo. A resposta imune pode ser classificada em imunidade não-específica (inata) e a específica (adquirida) onde estes dois tipos de imunidade atuam de maneira independente.

Na imunidade inata, as células atuantes são principalmente células fagocitárias mononucleares (macrófagos/monócitos) e os granulócitos (ex. neutrófilos) que secretando diversos mediadores, tais como NO, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (IL-8), entre outros (KIRVESKARI et al., 2003; KONSMAN et al., 2002). A indução do processo inflamatório pode ocorrer tanto por estímulo lesivo, agente infectante ou pela ação de outras citocinas (MARTÍN-FONTECHA et al., 2004). A bradicinina está entre estes mediadores que atuam como vasodilatadores e contribuem para a migração leucocitária, além de estimular a produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ ) como também a liberação de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas indutoras da hipernociceção e a dor (CUNHA et al., 2000; VERRI et al, 2006).

Na imunidade adquirida, além das células efectoras, há atuação dos linfócitos (linfócitos T e linfócitos B) (KIRVESKARI et al., 2003). Estas células são primeiramente produzidas no timo ou na medula óssea, depois sofrem amadurecimento nos órgãos linfoides periféricos (baço, linfonodos e tonsilas palatinas), para posteriormente serem liberadas durante a resposta imune (WALKER et al., 1999; MARTÍN-FONTECHA et al., 2004). Os linfócitos T efetores (maduros), quando chegam ao local da injúria liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ ) e

quimiocinas, sendo estas últimas responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

### 2.2.6 Citocinas

As citocinas são glicoproteínas ou polipeptídeos, hidrossolúveis com peso molecular entre 8 e 20 kDa. Elas são produzidas por macrófagos após estimulação, por toxinas, lesão mecânica ou mediadores inflamatórios no local lesionado e atuam regulando a resposta inflamatória e imunológica, entre outros processos (ZHANG, 2008). Através do controle da expressão gênica, as citocinas são capazes de influenciar nas funções celulares, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células do sistema imunológico, além de regular a produção e atividade de outras citocinas, modulando assim o destino do processo inflamatório (OLIVEIRA et al., 2011).

Existem citocinas com ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatória, dependendo do microambiente onde estão localizadas. As interleucinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-1Ra (antagonista da interleucina-1) e o TGF- $\beta$ 1 (fator transformador de crescimento- $\beta$ 1) são anti-inflamatórias, pois inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da COX-2 (CUNHA, 2003). Já as interleucinas IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são pró-inflamatórias, migram e atuam na área lesionada, sinalizando a inflamação. Estas interleucinas também estão associadas com a indução e manutenção da dor aguda e crônica (CUNHA, et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011; VALE et al., 2003).

Um dos principais papéis da IL-1 $\beta$  é aumentar a expressão das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), e conseqüentemente a produção de prostaglandinas. Estas sensibilizam os nociceptores, resultando em hipernocicepção/dor. O uso de inibidores da ciclooxigenase, como a indometacina, inibe o seu efeito algico (OLIVEIRA et al., 2011).

O TNF- $\alpha$ , também conhecido como caquetina, é sintetizado e liberado no local da lesão a partir de diversas células, como: macrófagos, linfócitos Th1, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, astrócitos, células natural killers (NK) e células do sistema nervoso. Além de estar envolvido com o processo inflamatório e hipernocicepção/dor, o TNF- $\alpha$  está relacionado com a indução do catabolismo muscular e caquexia, além de

possuir funções adicionais como estimulação da expressão/liberação de moléculas de adesão, citocinas e fatores de crescimento (MEYERS; ALBITAR; ESTEY, 2005; OMOIGUI, 2007; RAEBURN, et al., 2002).

### 2.3 FISIOLOGIA DA DOR

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial. Além de envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; ZAKARIA et al., 2014).

A dor é importante, pois é através dela que se pode perceber um sinal de alerta para um perigo iminente, estando assim relacionada com a proteção do organismo, exibindo os limites que não podem ser transgredidos. Apesar das sensações dolorosas serem um aviso do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com os outros (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008; SOUZA et al., 2015). 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 (SOUZA et al., 2015).

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor *aguda* é caracterizada por ter início repentino relacionado a traumas, infecções, inflamações ou dano potencial. Este tipo de dor tem um importante papel, pois, está associada a respostas neurovegetativas como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia, agitação psicomotora e ansiedade informando ao indivíduo um perigo proeminente. (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Já a dor *crônica* ocorre em resposta à lesão e é caracterizada pela intensidade que afeta adversamente a função ou o bem-estar do doente persistindo além da cicatrização do tecido normal. Representa um fenômeno de sensibilização nociceptiva, com redução do limiar à dor (alodinia), amplificação da resposta a estímulos nocivos

(hiperalgesia) e sensação de dor prolongada após estimulação (hiperpatia) (HOLMES; CHRISTELIS; ARNOLD, 2012; KOPF; BANZHAF; STEIN, 2005).

Do ponto de vista fisiológico a dor pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos, recebendo assim diferentes denominações:

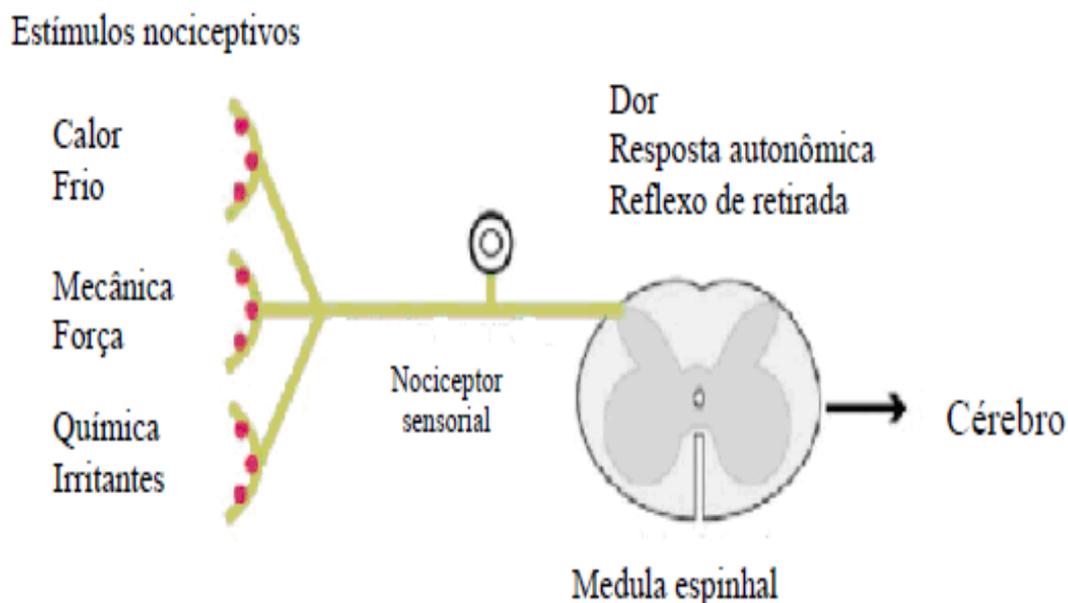
### **2.3.1 Dor Nociceptiva**

Ocorre por estimulação excessiva dos receptores (nociceptores) responsáveis por desencadarem esta sensação, como ilustra a figura 3. Está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares (LOESER; MELZACK, 1999).

### **2.3.2 Dor Neuropática**

A dor neuropática é o resultado da ativação anormal da via nociceptiva e ocorre em áreas ou órgãos envolvidos em lesões ou doenças neurológicas. As principais doenças relacionadas a dor neuropática são: neuralgia pós-herpética, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão medular, entre outros (BENETT et al., 2006). As dores nociceptiva e neuropática muitas vezes podem coexistir. Contudo, a dor neuropática requer abordagens analgésicas específicas, diferentemente das abordagens analgésicas destinadas às dores nociceptivas (SMIDERLE, 2008).

Figura 3 – Mecanismo específico da dor nociceptiva.



Fonte: Woolf (2004). Adaptado.

### 2.3.3 Dor Inflamatória

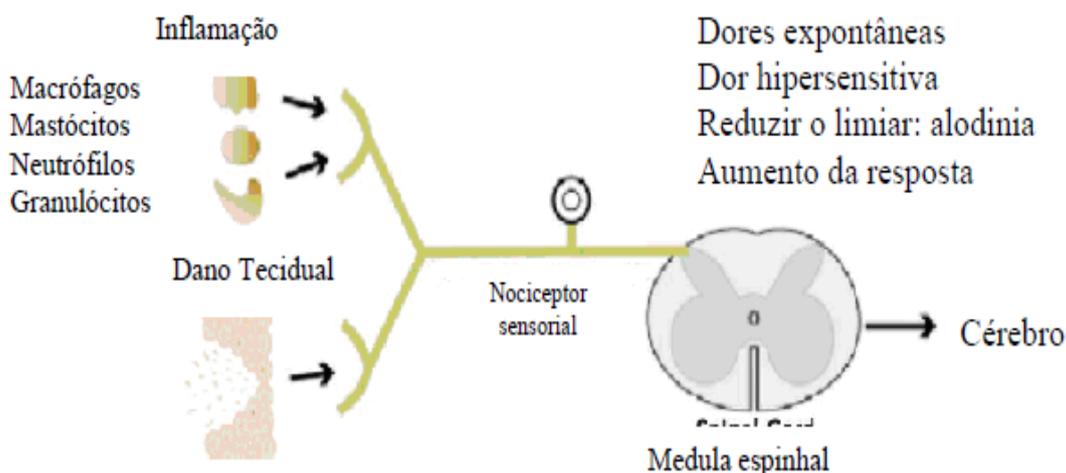
A dor inflamatória resulta da sensibilização dos neurônios sensitivos nociceptivos sensoriais primários por meio de mediadores inflamatórios, conforme é apresentado na figura 4. Após uma lesão tecidual ou inflamação, os nociceptores são ativados pela ação de mediadores químicos. Esses mediadores ativam cascatas de segundos mensageiros, influenciando canais iônicos, enzimas e proteínas de sinalização intracelular nos nociceptores, levando ao aumento da excitabilidade do neurônio, diminuindo o limiar de disparo e aumentando a frequência de potenciais de ação produzidos durante uma estimulação supra-limiar (BASBAUM et al., 2009; VERRI et al., 2006).

### 2.3.4 Mediadores químicos da dor

Os receptores nociceptivos são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia sendo chamados de algogênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina, a histamina, bradicinina, o

leucotrieno, a substância P, o fator de ativação plaquetária (PAF), os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) (BASBAUM et al., 2009; ROCHA et al., 2007).

Figura 4 – Mecanismo específico da dor inflamatória.



Fonte: Woolf (2004). Adaptado.

Quando um estímulo intenso provoca lesão tecidual, há desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação. As células lesionadas liberam enzimas que agem sobre os cininogênios, convertendo-os em cininas. A partir da membrana celular, pela ação da fosfolipase A2, libera-se ácido araquidônico que, por ação da ciclo-oxigenase e da lipoxigenase, origina prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (BASBAUM et al., 2009; SOUZA et al., 2015).

Além dessa resposta inflamatória tecidual, há uma resposta neurogênica com produção de vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ação sobre as células inflamatórias com a liberação de mediadores químicos. Os mediadores inflamatórios agem aumentando a sensibilidade dos nociceptores, reduzindo assim seu limiar de excitabilidade (ROCHA et al., 2007).

#### 2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS ESTEROIDAIIS E NÃO-ESTEROIDAIIS

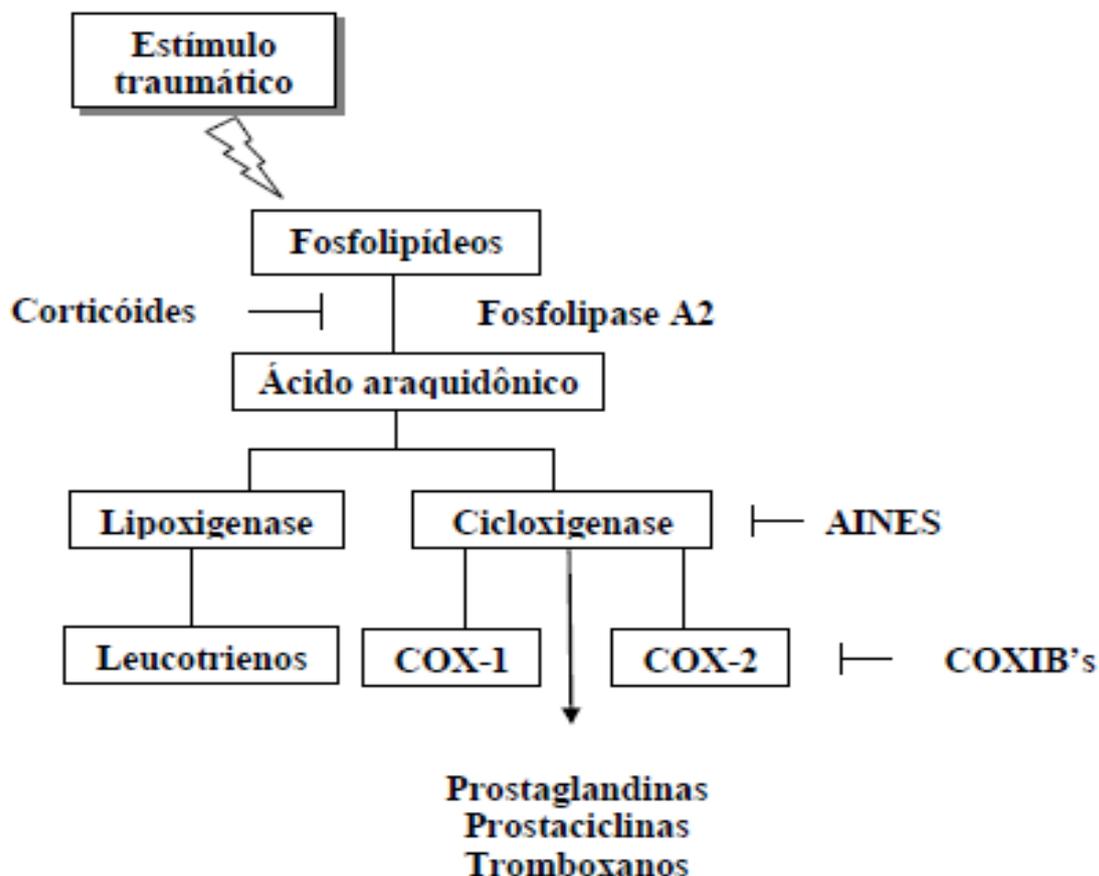
### **2.4.1 Anti-inflamatórios esteroidais**

Os anti-inflamatórios esteroidais, também denominados de glicocorticoides ou corticosteroides, são fármacos amplamente utilizados pelas suas conhecidas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, no tratamento de diversas patologias, tais como as doenças reumatológicas, autoimunes, respiratórias e no processo de transplantação de órgãos. Seu mecanismo de ação envolve a interação com um receptor de glicocorticoides e a regulação da expressão de proteínas (CASTRO; GODINHO, 2003). As drogas anti-inflamatórias esteroidais bloqueiam a liberação de prostaglandinas através da inibição da fosfolipase A<sub>2</sub>, que interfere na cascata do ácido araquidônico. Suas excelentes respostas terapêuticas como anti-inflamatório e imunossupressor são, frequentemente, acompanhadas por efeitos colaterais como diabetes mellitus, úlcera péptica, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outras, ficando o uso limitado (MILLER; STANTON; DERERY, 2001; SCHACKE et al., 2002).

### **2.4.2 Anti-inflamatórios não esteroidais**

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre os mais utilizados dentre todos os agentes terapêuticos, devido a suas três principais ações farmacológicas: anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Esses fármacos são classificados de acordo com sua origem química, em sete grandes grupos: os salicilatos; derivados do paraminofenol (paracetamol); derivados do ácido acético; fenamatos; derivados do ácido propiônico; ácidos enólicos (oxicans); e derivados da pirazolona. Cada um deles apresenta subgrupos que proporcionam uma variedade de produtos no mercado farmacêutico (GILMAN et al., 2006; PALASKA et al., 2002). Os AINES, em geral, tratam o processo inflamatório inibindo de forma variável as isoformas COX-1 e COX-2 em suas doses terapêuticas, como mostra a figura 5; no entanto, apresentam efeitos adversos principalmente no trato gastrointestinal, na função renal e na agregação plaquetária, que tornam limitados o uso desses fármacos (RANG et al., 2012).

Figura 5 – Cascata da inflamação e atuação dos anti-inflamatórios.



Fonte: Oliveira (2014). Adaptado

## 2.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ISOXAZOLINAS-ACILHIDRAZONAS

Moléculas que apresentam em sua estrutura heterocíclicas são de interesse peculiar para a química medicinal. A química de compostos heterocíclicos destaca-se por ser um dos ramos mais complexos da química sendo esta de suma importância para diversas áreas de interesse como na medicina, agricultura, polímeros, e várias indústrias. Compostos que trazem em sua estrutura anéis pentagonais que apresentam dois ou mais heteroátomos a exemplo do oxigênio, nitrogênio, selênio ou enxofre em sua estrutura apresenta importante função para a síntese e desenvolvimento de novos fármacos. Drogas heterocíclicas de origem sintética são utilizadas no tratamento de diversas patologias por apresentarem atividades como anticonvulsivantes, antissépticos, anticâncer, antivirais, anti-inflamatória, antimicótica, anticonvulsivante e anti-histamínicos (MISHRA, 2011; MENDES, 2010; TAVARES, 2010).

A diversidade nas atividades apresentadas por esses compostos orgânicos deve-se a alterações causadas pelo heteroátomo nas propriedades estruturais e eletrônicas da molécula devido a presença de pares de elétrons e diferença em sua eletronegatividade produzida entre o carbono presente na estrutura cíclica e o heteroátomo levando assim a novas propriedades físico-químicas, desta forma despertam interesse na preparação de compostos com propriedades específicas (TAVARES, 2010).

Fato semelhante acontece com os derivados acilhidrazônicos, onde há relatos em que estes compostos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas como: atividade anti-inflamatória, anticonvulsivante, antiplaquetária, antidepressiva, analgésica, antimalárica, antileishmania e antimicrobiana. Com base nestes estudos, através da utilização do método de hibridização molecular, foram obtidas novas moléculas contendo o núcleo isoxazolínico com a formação de um novo *scaffold*. Partindo-se deste, foram executadas reações de condensação para obter novas moléculas que apresentam a função acilhidrazona. Alguns destes derivados apresentaram atividade anti-inflamatória em screening inicial (MENDES, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SUBSTÂNCIAS

O derivado Isoxazolina-acilhidrazona, foi fornecido pelo Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### 3.2 REAGENTES

Kits de citocinas: Mouse TNF- $\alpha$  Elisa, Mouse IL-1 $\beta$  Elisa (eBioscience); Reagentes: ácido acético glacial C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (VETEC), heparina sódica 5.000 UI/mL (Cristalia), HEMSTAB EDTA 15 gl/dl (Labtest), cloridrato de ketamina (Vetbrands), cloridrato de xilazina (Vetbrands).

#### 3.3 EQUIPAMENTOS

Balança analítica, câmara de fluxo laminar, câmara de CO<sub>2</sub>, centrífuga, analisador hematológico ABX micros 60 - Horiba, aparelho de ELISA.

#### 3.4 ANIMAIS

Foram utilizados, 173 camundongos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) machos e fêmeas, albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Foram usados em média um (n) de 06 animais por grupo. 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 em ambiente com temperatura 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. Os animais foram mantidos de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.030374/2016-85. Este projeto encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Para avaliação da toxicologia aguda foi utilizada a metodologia recomendada pela Organization for economic cooperation and development - Guideline 423 (OECD, 2001). Camundongos fêmeas (60 dias) foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos de seis animais cada. Uma dose única foi administrada oralmente aos grupos de animais teste. O grupo controle recebeu o veículo carboximetilcelulose (CMC) 1% + 50µL de glicerina, n=6, o grupo tratado (n=6) recebeu o derivado R-151 na dose de 2.000mg/kg. Os animais foram observados nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas diariamente durante 14 dias após a administração do derivado. A avaliação foi realizada pelo método de screening hipocrático, além disso, o peso, o consumo de água e ração foram avaliados diariamente. No 14º dia, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (2:1; v/v) por via intraperitoneal para coleta de sangue, por punção cardíaca, e realização dos exames hematológicos e bioquímicos. O fígado, rim, baço e estômago foram coletados para análise micro e macroscópica bem como para a determinação do peso relativo dos órgãos.

O peso relativo dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Peso relativo dos \u00f3rg\u00e3os} = \frac{\text{Peso do \u00d3rg\u00e3o (g)}}{\text{Peso do Animal (g)}} \times 10$$

### 3.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória do derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 foi utilizada a técnica de pleurisia induzida por vários agentes flogísticos, com determinação dos níveis de NO, MPO e citocinas.

#### 3.6.1 Peurisia induzida por carragenina

Os animais foram pré-tratados por via oral com o derivado isoxazolina-acilhidrazonas R-151 nas doses de (1, 10 e 100 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo Carboximetilcelulose (CMC) 1% + 50 $\mu$ L de glicerina. Após uma hora, os animais foram anestesiados com uma solução associada cetamina e xilazina (2:1; v/v). A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de 0,1 mL de carragenina (1%) (FRODE; MEDEIROS, 2001). Após 4 horas os animais foram sacrificados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de uma solução tampão fosfato estéril contendo heparina (20 UI/mL). A contagem total de leucócitos foi feita em analisador hematológico ABX micros 60.

#### 3.6.2 Determinação dos níveis de óxido nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrito (metabolito estável do NO) foram medidas no sobrenadante do exsudato da pleurisia induzida por carragenina 1%. Uma alíquota de 50  $\mu$ L da amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50  $\mu$ L de reagente de Griess modificado (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato 0,1%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%) por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor

de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (GIUSTARINI et al., 2008).

### **3.6.3 Determinação dos níveis de mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de polimorfonucleares que migram para o local do estímulo inflamatório. A atividade da enzima MPO foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Bradley et al. (1982), com algumas adaptações. As amostras dos pulmões do modelo de pleurisia induzida por carragenina foram colhidos 4 horas após a indução da inflamação e foram imediatamente armazenadas em 500 µl de tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia – Sigma – diluído em 1 litro de tampão fosfato de potássio) a -20° C, para posterior determinação dos níveis teciduais de MPO. Para a determinação dessa enzima as amostras foram homogeneizadas com tampão HTAB e centrifugadas (10 minutos, 14.000 rpm a 4°C). O sobrenadante foi coletado e 7,0 µl foi distribuído em duplicatas numa microplaca de 96 poços, adicionando-se logo em seguida o-dianisidine (16,7 mg de o-dianisidine – Sigma; 90 ml de água deionizada; 10 ml de tampão fosfato de potássio; 50 µl de peróxido de hidrogênio 1%). A concentração de MPO foi estimada por meio de medida colorimétrica (absorbância a 450 nm) através de um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em mU/ml.

### **3.6.4 Determinação dos Níveis de Citocinas**

Os exsudatos recolhidos durante os testes do bolsão de ar e pleurisia induzida por carragenina foram armazenados em um freezer -20°C, para a determinação dos níveis citocinas. A quantificação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  desses exsudatos foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).

### **3.6.5 Pleurisia induzida por histamina, bradicinina, substância P e zimosano**

Os animais foram pré-tratados por via oral com o derivado isoxazolina-acilhidrazonas R-151 (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo Carboximetilcelulose (CMC) 1% + 50µL de glicerina. Após uma hora, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, numa proporção de 2:1. A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de histamina (100 µg/cav), bradicinina (10 nmol/cav), substância P (20 nmol/cav) (GOULART, et al., 2007) e zimosano (200 µg/cav) (FERREIRA, et al., 2012). Após 4 horas os animais foram sacrificados, tiveram o tórax aberto e a cavidade pleural lavada com 1,0 ml de uma solução tampão fosfato estéril contendo heparina (20 UI/ml). A contagem total de leucócitos foi feita em analisador hematológico ABX micros 60.

### 3.7 ATIVIDADE EXPECTORANTE

A atividade expectorante foi determinada por medição de vermelho de fenol. Os animais foram pré-tratados por via oral com o derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 (10 mg/kg), ambroxol (5 mg/kg) ou veículo (Carboximetilcelulose CMC1% + Uma gota de Glicerina). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de vermelho de fenol (5%). Trinta minutos após a administração de vermelho de fenol, os animais foram eutanasiados por exposição a CO<sub>2</sub>. Toda a traqueia foi cuidadosamente retirada e colocada em 1 ml de solução salina imediatamente e levada ao ultrassom por um período de 30 min. Posteriormente foi adicionado 0,1 ml de NaOH 1M para estabilizar o pH do lavado. A concentração de vermelho de fenol, foi medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 546 nm e os resultados foram expressos em µg/ml

### 3.8 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Para a avaliação da atividade antinociceptiva do derivado isoxazolina-acilhidrazonas R-151, os animais foram submetidos a estímulo químico, para a realização do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste de formalina.

### **3.8.1 Nociceção induzida por ácido acético**

Neste ensaio os animais receberam tratamento por via oral com o derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 na dose de 10 mg/kg, ibuprofeno na dose de 10 mg/kg (substância padrão) e o veículo Carboximetilcelulose (CMC) 1% + 50µL de glicerina. Após uma hora, o ácido acético 1% foi injetado (0,1 mL/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 individualmente em gaiolas de polietileno transparentes, onde foram observados e registrou-se o número de contorções abdominais durante 20 minutos de cada um dos animais. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções do grupo tratado com o a média do grupo controle (KOSTER, 1959; GUERRA et al., 2011).

### **3.8.2 Teste de Formalina**

O derivado de isoxazolina-acilhidrazona R-151 (10 mg/kg) foi administrado oralmente nos animais. Um grupo recebeu a dexametasona (0,5 mg/kg s.c.), enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo (Carboximetilcelulose CMC1% + Uma gota de Glicerina). Depois de 60 minutos da administração oral do composto testado, ou 45 minutos da administração subcutânea da morfina foi injetado formalina (20 µL, 2,5%) na região subplantar da pata traseira direita dos animais. Após a injeção de formalina o tempo de duração em que os animais permanecerem lambendo as patas foi determinado em 0-5 minutos na primeira fase e de 15-30 minutos na segunda fase. (GUERRA et al, 2011; HUNSKAAR; HOLE, 1987).

## **3.9 ANÁLISE DOS DADOS**

O experimento de Formalina foi estatisticamente avaliado por meio de análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 99%, utilizando-se o software Graph Pad prism. 7.0. Valores de “p”

menores que 0,01 ( $p < 0,01$ ) foram considerados como indicativos de significância. Os demais experimentos e a mensuração da concentração de NO foram estatisticamente avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 99%, utilizando-se o software Graph Pad prism.

7.0. Valores de “p” menores que 0,01 ( $p < 0,01$ ) foram considerados como indicativos de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>)

Várias substâncias são responsáveis por apresentarem efeitos tóxicos e são consideradas como potencialmente perigosas, esses riscos podem ser avaliados por meio testes toxicológicos pré-clínicos, estes podem ser avaliados *in vitro* ou *in vivo* e/ou através de estudos clínicos, divididos em fases (1 a 4) para uma melhor avaliação. Em relação aos estudos pré-clínicos *in vivo*, a toxicidade aguda é um dos mais relevantes testes com o qual é possível avaliar sinais sugestivos de intoxicação, determinar a DL<sub>50</sub> e assim estipular doses a serem usadas em estudos posteriores (MONTENEGRO, 2011).

Desta maneira, a avaliação toxicológica comportamental foi realizada com a intenção de determinar possíveis alterações relacionadas ao sistema nervoso central e autônomo, através de sinais ou modificações exibidas no comportamento, incluindo tempo percorrido para o surgimento, a evolução e tempo de duração destes sintomas, outros parâmetros como os de variação de peso e o consumo de água e ração, e o número de animais que vão a óbitos e exames bioquímicos e histopatológicos (ALMEIDA *et al.* 1999; CRAVEIRO *et al.* 2008).

Neste experimento os animais (n=3) receberam uma dose de 2000 mg/kg (v.o.) do derivado isoxazolina-acilhidrazona. Durante a avaliação do *screening* hipocrático, os grupos que receberam o tratamento não apresentaram piloereção, ptose ou sinais de sonolência, logo após a gavagem, (na primeira hora de observação), nenhum animal veio a óbito em 24 horas ou ao longo dos 14 dias de experimento. Não foi observada nenhuma variação significativa no peso, consumo de ração e água em relação aos animais dos grupos controles durante 14 dias de observação.

As alterações no peso dos animais e nos dos órgãos sugerem efeitos adversos relacionados a droga em teste. É aceito como um sinal de toxicidade quando o animal perde mais que 10% do seu peso corpóreo quando comparado ao de início do experimento (RAZA *et al.* 2002; TEO *et al.* 2002).

Não houve diferença no peso dos órgãos e na análise macroscópica dos mesmos todos demonstraram-se inalterados quando comparados aos do grupo controle. Posteriormente o experimento foi repetido utilizando-se a mesma dose e o mesmo número de animais por grupo.

Os resultados indicam que o derivado em estudo apresentou baixa toxicidade, tendo o valor da DL<sub>50</sub> estimado em 2500 mg/kg, sendo considerada uma substância segura. Os resultados deste teste estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Evolução ponderal e peso absoluto dos órgãos dos grupos controle e tratado com R-151 na toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg.

Variáveis Analisadas		Controle	R-151
Peso (g)	Inicial	21,1±1,58	24,7 ±1,81
	Final	32,0 ±1,08	34,4 ±2,67
Consumo de água por animal (ml)		9,67 ± 0,95	5,25±0,41
Consumo de ração por animal (g)		11,20*± 0,74*	6,49*±0,18*
Índice de órgãos (mg/g)	Rim	6,00±064	5,72±0,45
	Fígado	52,82±2,52	53,15±5,86
	Baço	6,27 ± 0,69	7,30 ± 0,85
	Estômago	10,81 ± 1,07	10,01 ± 1,69

\*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.  
Fonte: Autor (2017).

Em relação aos parâmetros bioquímicos apresentados na tabela 2, pode-se observar que, não houve diferença estatisticamente significativa, entre o grupo tratado com o R-151 2.000 mg/Kg, do grupo controle, evidenciando mais uma vez que o R-151 apresenta baixa toxicidade, sendo uma substância segura para uso como fármaco.

Tabela 2 – Valores bioquímicos dos grupos controle e tratado com R-151 na toxicidade aguda da dose de 2.000 mg/kg.

<b>Analitos Bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>R-151</b>
<b>Ureia (mg/dL)</b>	49,4 ± 9,73	47,4 ± 7,33
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,41 ± 0,03	0,32 ± 0,03
<b>TGO (U/L)</b>	184,8 ± 63,3	176,4 ± 34,6
<b>TGP (U/L)</b>	45,5 ± 9,50	46,2 ± 23,6
<b>F. Alcalina (U/L)</b>	130,4 ± 36,7	136,3 ± 30,2
<b>P. Total (g/dL)</b>	5,67 ± 1,12	5,63 ± 0,62
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,08 ± 0,26	2,68 ± 0,11
<b>Glicose (mg/dL)</b>	101,3 ± 10,8	72,5 ± 9,21

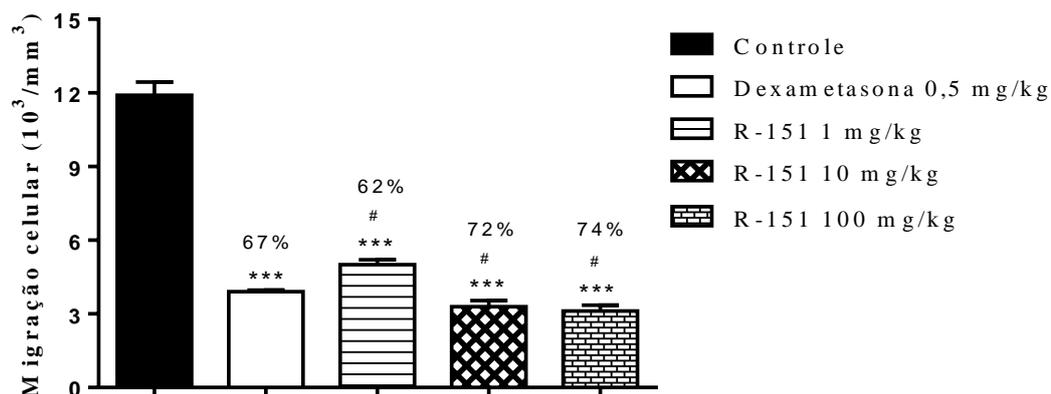
\*p<0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Fonte: Autor (2017).

#### 4.2 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

Os resultados da atividade anti-inflamatória pelo teste da pleurisia induzida por carragenina encontram-se na figura 6. O composto R-151 nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg apresentaram inibição de 62%, 72% e 74%, respectivamente, sobre a migração leucocitária na cavidade torácica. Todas as doses testada do composto apresentaram atividade anti-inflamatória, indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparadas ao grupo controle e não apresentaram diferença quando comparado ao fármaco padrão, dexametasona. As doses de 10 e 100 mg/kg não apresentaram diferença estatística. Portanto, foi determinada a dose de 10 mg/kg como dose de escolha para continuar com os demais experimentos.

Figura 6 – Efeito do R-151 sobre a pleurisia induzida por carragenina.



Valores expressos em média  $\pm$  DP representam a migração de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade pleural (n = 6), \*\*\* p < 0.001 v.s controle. # - não significativo v.s dexametasona. ANOVA, teste de Bonferroni.

Fonte: Autor (2017).

A inflamação provocada na cavidade pleural, está relacionada a uma elevada reação inflamatória das vias respiratórias, processo semelhante ao que acontece com a asma em humanos. É reproduzida experimentalmente através da administração de agentes pró-inflamatórios introduzidos na cavidade pleural, como por exemplo, a carragenina (DALMARCO; FRODE, 2007; MOORE et al., 2010). A carragenina é um agente pró-inflamatório que, uma vez administrado na cavidade pleural, desencadeia eventos estritos ao processo inflamatório agudo bem como ao de ativação da imunidade inata (SALEH et al., 1996; MOORE, 2003; MOORE et al., 2010). Posterior a aplicação deste agente, dá-se início ao processo inflamatório que apresenta uma fase inicial (4 horas) caracterizada por um pico na liberação de mediadores químicos entre eles estão a histamina, bradicinina e prostaglandinas entre outros, logo após esta uma fase tardia inicia-se atingindo o seu ápice em torno das 48 horas, que abrange principalmente a participação de leucotrienos e PAF. Dessa forma, este modelo mostra sua relevância demonstrando-se uma ferramenta muito útil na análise do papel dos mediadores e vias relacionadas à inflamação aguda e os possíveis efeitos anti-inflamatórios apresentados por potenciais agentes terapêuticos (MOORE, 2003; MOORE et al., 2010).

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E MIELOPEROXIDASE (PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA)

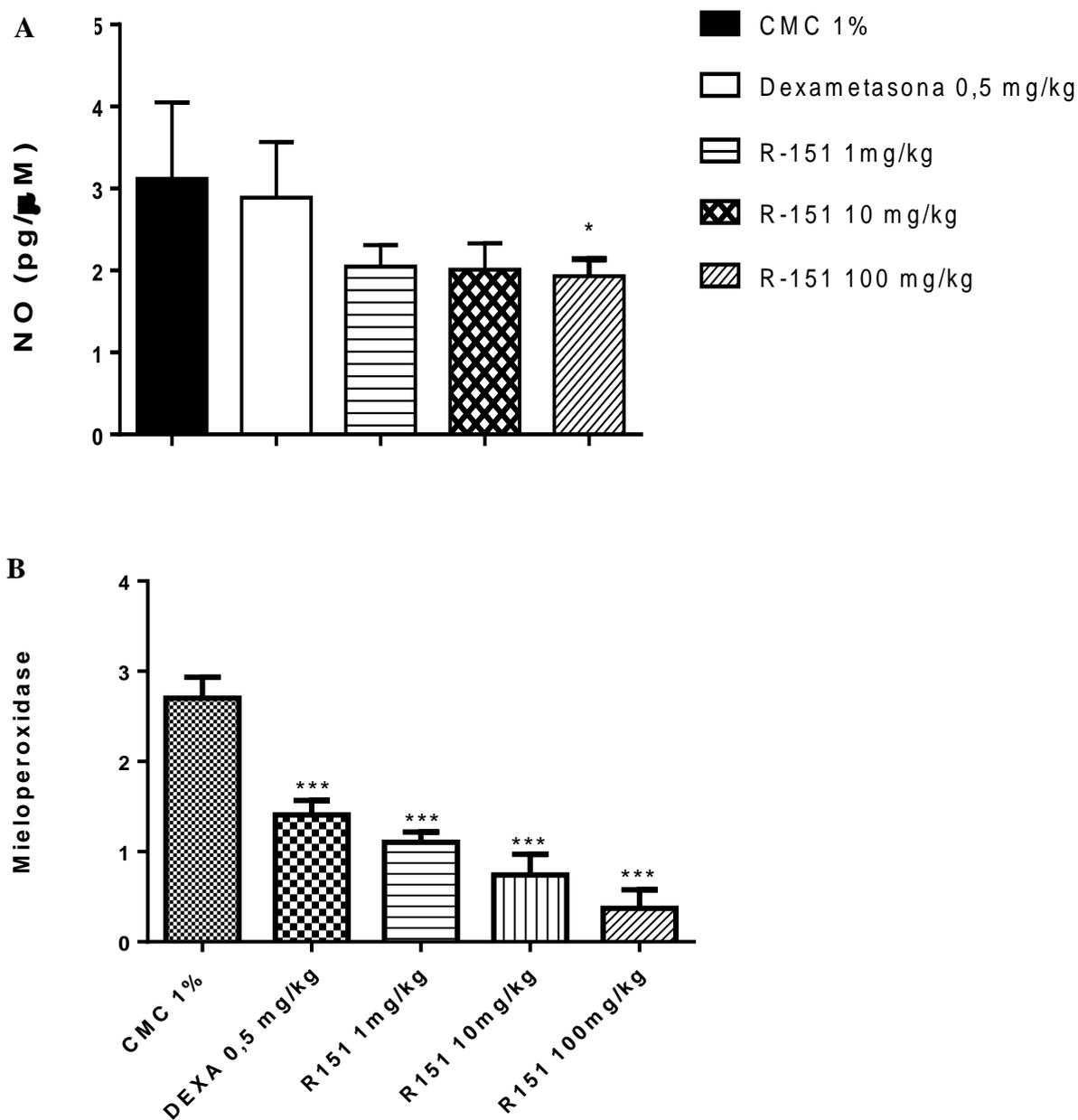
Os animais tratados com o derivado R-151 (1, 10 e 100 mg/kg) apresentaram redução considerável dos níveis de NO quando comparado com o grupo controle, conforme mostra a figura 7A. Os grupos tratados com o R-151 em todas as doses demonstraram redução significativa dos níveis de MPO quando comparado com o grupo controle, como mostra a figura 7B.

Em homeostase, o NO atua funcionalmente como agente protetor, enquanto em condições elevadas de sua produção, pode acarretar lesões teciduais. Verificou-se que altas concentrações de NO está diretamente relacionado a uma série de doenças como: artrite reumatoide, esclerose múltipla e sepsis, bem como a suas progressões (SMITH; LASSMANN, 2002; REDDY et al., 2005).

Portanto, estudos que utilizem novos fármacos que demostrem a inibição de NO são valiosíssimos para a descoberta de novos medicamentos que atenuem a resposta inflamatória (DALMARCO et al., 2002). Uma hipótese para que este fato tenha ocorrido é que o composto R-151 ao inibir a concentração de TNF- $\alpha$ , consequentemente reduza a produção de NO.

Outro relevante fator a relatar é que o composto R-151 não só apenas reduz a migração de leucócitos, mas também a atividade da mieloperoxidase, uma das enzimas consideradas como marcador de células neutrófilicas ativadas. No modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, Fröde et al. (2001) observaram que o aumento da atividade da mieloperoxidase estava associado com o aumento da migração do número de leucócitos para a cavidade pleural em camundongos submetidos ao processo inflamatório.

Figura 7 – Efeitos da R-151 na concentração de NO e MPO no exsudato dos animais submetidos ao teste de pleurisia induzida por carragenina.



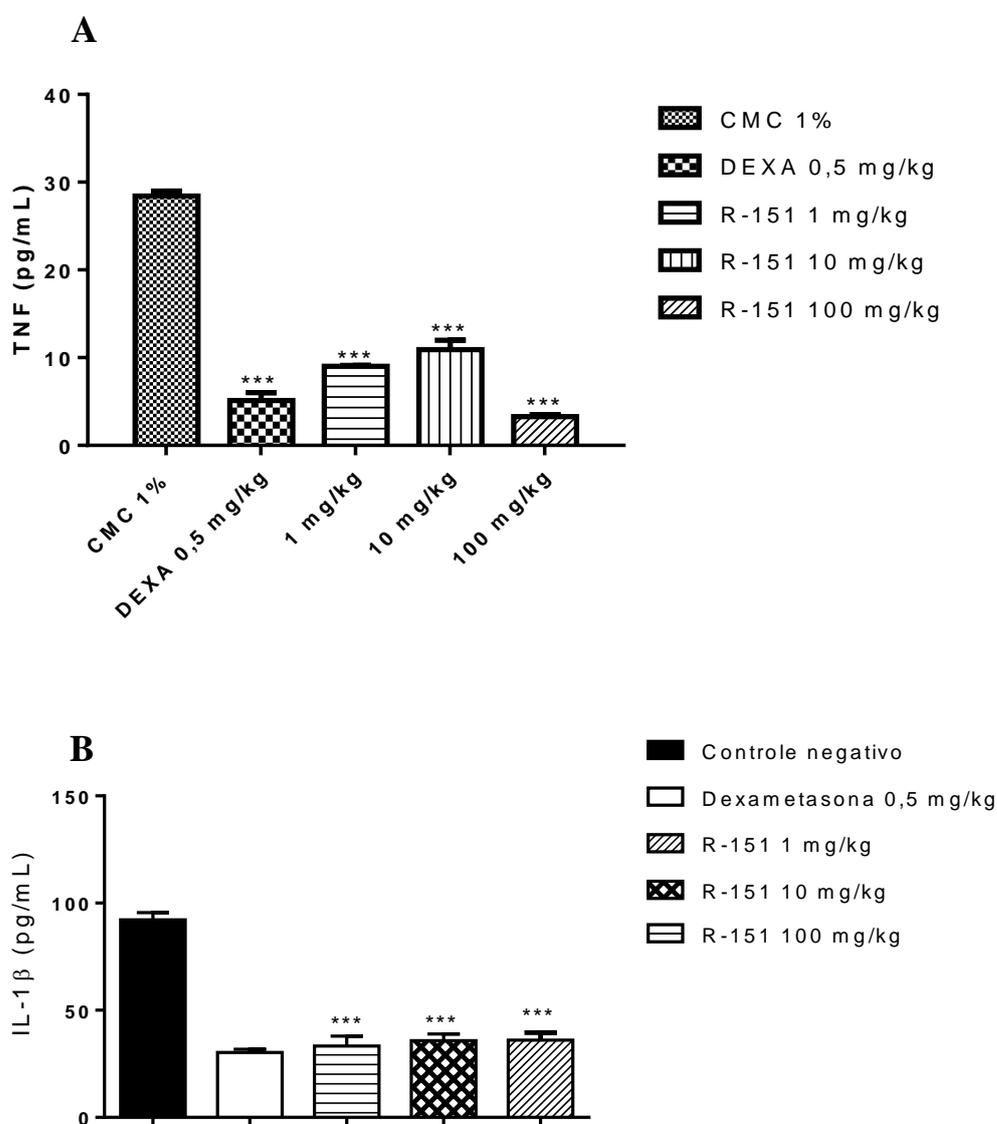
\*\*\*p <0,01 em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Autor (2017).

#### 4.4 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A E IL-1B (PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA)

O composto R-151 apresentou diminuição significativa na expressão de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural em todas as doses quando comparadas ao controle. A dexametasona, apresentou uma concentração média de TNF- $\alpha$  de 5,12 pg/mL, como mostra a figura 8A. Com relação à produção de IL-1 $\beta$ , o R-151 também diminuiu a produção desta citocina quando comparado ao controle, conforme ilustra a figura 8B.

Figura 8 – Concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no exsudato da cavidade pleural dos animais submetidos à pleurisia induzida por carragenina e tratados com o derivado R-151.



\*p <0,05 em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

Fonte: Autor (2017)

Neste estudo o composto R151 reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no lavado pleural de camundongos com pleurisia. Estes resultados corroboram com estudos realizados por MOTA (2013) que revelaram que derivados isoxazolina-acilhidrazonas inibiram a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em estudos com moléculas desta classe. Resultados semelhantes também foram obtidos por MELO (2014) que também demonstraram que derivados acilhidrazônicos híbridos inibiram a liberação de TNF- $\alpha$  *in vitro*.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina já foi relatado que tanto a IL-1 $\beta$  como o TNF- $\alpha$  promoveram aumento da migração de leucócitos e de neutrófilos para o lavado pleural de camundongos (FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2001). Com base nos resultados obtidos podemos sugerir uma relação entre a diminuição da migração celular e redução na liberação destas citocinas pró-inflamatórias.

#### 4.5 PLEURISIA INDUZIDA POR ZIMOSANO, HISTAMINA, SUBSTÂNCIA P E BRADICININA

O derivado R-151 na dose de 10 mg/kg demonstrou-se eficaz em reduzir a migração celular para a cavidade pleural dos camundongos nos testes de pleurisia, como mostra a tabela 3.

Várias substâncias são conhecidas por induzir a pleurisia em camundongos desencadeando a liberação de diferentes mediadores envolvidos nos processos inflamatórios (GOULART et al., 2007). A evasão de leucócitos do sangue em direção ao local inflamado exerce um importante papel na modulação da resposta inflamatória (SALEH et al, 1996).

Além da carragenina, também foi utilizado para indução da pleurisia o zimosano, uma substância formada principalmente por carboidratos obtidos da parede celular de leveduras. Além de estimular a liberação de citocinas (UTSUNOMIYA et al., 1998) e mediadores lipídicos (KIKUCHI et al., 1995), a injeção de zimosano provoca principalmente a ativação dos componentes do sistema complemento (IMAI et al., 1991), estimulando a produção de mediadores que irão contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória através de vias distintas as da carragenina.

Outro mediador envolvido na pleurisia em camundongos é a histamina. A conclusão é baseada nos resultados em que a terfenadina, antagonista do receptor H1 da histamina, causou diminuição considerável tanto frente a migração celular como da exsudação do processo inflamatório (FRODE, 2000). A histamina age também no recrutamento de neutrófilos em diversos modelos de inflamação. Estudos feitos por Yamashiro e colaboradores (2001) verificaram que a histamina é capaz de induzir a quimiotaxia de leucócitos em capilares encontrados na retina de ratos quando administrada por via intraorbital. É comprovado que esse mediador liberado dos mastócitos exerce papel fundamental facilitando o aumento da permeabilidade vascular, no sítio inflamatório (EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999). os resultados obtidos com o antagonista do receptor H1 da histamina permitem ainda sugerir que tal mediador está envolvido no processo de migração celular.

Tabela 3 – Total de leucócitos polimorfonucleares (média  $\pm$  desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação nos animais dos grupos controle e tratado com o derivado R-151 no teste de pleurisia induzida por zimosano, histamina, substância P e bradicinina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de Leucócitos/mL ( $\times 10^6$ ) / % de Inibição				
		Salina	Zimosano	Histamina	Substância P	Bradicinina
Sham		0,78 $\pm$ 0,23	-	-	-	-
Controle	-	-	6,6 $\pm$ 0,73	5,44 $\pm$ 0,61	9,44 $\pm$ 0,55	10,02 $\pm$ 1,14
Dexametasona	0,5	-	2,16 $\pm$ 0,23 (67,3%)	-	1,14 $\pm$ 0,16 (88%)	4,14 $\pm$ 0,67 (58,7%)
Terfenadina	25	-	-	1,96 $\pm$ ,15 (69,9%)	-	-
R-151	10	-	3,40 $\pm$ 0,26 (48,5%)	2,52 $\pm$ 0,39 (54%)	2,92 $\pm$ 0,58 (69,1%)	2,32 $\pm$ 0,23 (76,8%)

\*p <0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Fonte: Autor (2017).

Da mesma forma que ocorreu nos modelos experimentais utilizando a carragenina como agente desencadeador da inflamação, os grupos tratados com o derivado R-151 também inibiram a migração leucocitária induzida por zimosano em

48,5%, por histamina em 54%, Substância P em 69,1% e bradicinina em 76,8% quando comparados ao grupo controle. Dessa maneira, os resultados apresentados neste estudo, sugerem uma possível ação dessa substância sobre a histamina, substância P e principalmente sobre a bradicinina visto a apresentar resultados superiores aos apresentados pelo fármaco de referência bem como frente a intermediários produzidos após a ativação do complemento, visto que já foi estabelecido que a resposta inflamatória induzida pelo zimosano está em grande parte relacionada à ativação desse sistema (PILLEMER et al., 1953; IMAI et al., 1991).

De uma forma geral, os dados obtidos nos experimentos demonstram que o derivado R-151 apresenta propriedades anti-inflamatórias promissoras. Na pleurisia o R-151 atenuou a inflamação induzida por carragenina, zimosano, histamina, substância P e bradicinina sugerindo a participação de citocinas, mediadores lipídicos e sistema complemento.

#### 4.6 ATIVIDADE EXPECTORANTE

Os resultados da atividade expectorante encontram-se dispostos na tabela 4. O derivado apresentou atividade expectorante evidenciada pelo aumento na excreção do vermelho de fenol pela via respiratória quando é comparado ao grupo controle. O R-151 demonstrou um aumento na expectoração de muco em 69,3%. O fármaco padrão utilizado neste experimento foi o ambroxol vindo a apresentar um aumento na expectoração de muco em 79,5%.

Tabela 4 – Efeitos do derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 sobre a mensuração da concentração de vermelho de fenol intratraqueal no modelo de atividade expectorante.

\*p<0,001 Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Fonte: Autor (2017).

O R-151 apresentou elevado aumento na secreção de muco, essa conclusão é baseada através da mensuração dos níveis de vermelho de fenol que foi expectorado. Drogas expectorantes agem diluindo ou propiciando um aumento na expectoração do muco por facilitar os movimentos ciliares promovendo a eliminação deste pelo trato respiratório.

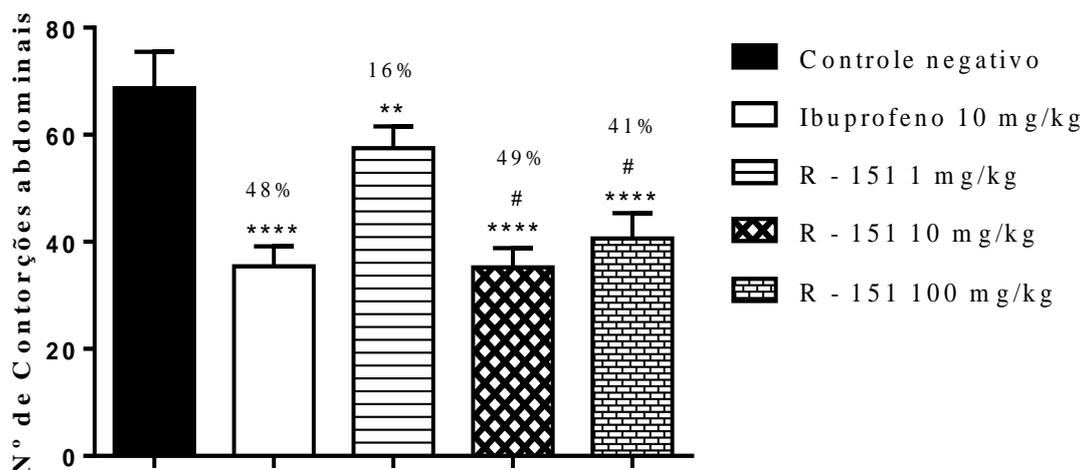
#### 4.7 CONTORÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

A atividade antinociceptiva foi inicialmente avaliada pelo modelo das contorções abdominais. A atividade antinociceptiva do derivado isoxazolina-acilhidrazona está demonstrada na Figura 9. A substância testada, R-151 nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg promoveram redução no número de contorções abdominais em comparação ao grupo controle e apenas a dose de 10 e 100 mg/kg não apresentaram diferenças significativas em comparação ao fármaco padrão, ibuprofeno. Essa redução ao estímulo álgico do ácido acético demonstra que os derivados em estudo possuem atividade antinociceptiva frente à nocicepção visceral.

<b>Tratamento</b>	<b>Dose (mg/Kg)</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Concentração vermelho de fenol (ug/mL)</b>	<b>Aumento na expectoração (%)</b>
<b>Controle</b>	-	0,133 ± 0,03	1,20 ± 0,31	-
<b>Ambroxol</b>	5	0,610 ± 0,11	5,82 ± 1,06*	79,5
<b>R-151</b>	10	0,530 ± 0,09	5,03 ± 0,93	69,3

A dose escolhida para a realização de testes posteriores foi a de 10 mg/kg por ser a menor dose utilizada que apresentou ação.

Figura 9 – Efeito do R-151 sobre a contorção induzida por ácido acético.



Valores expressos em média  $\pm$  DP representam o número de contorções induzidas por ácido acético 1% (n = 6), \*\* p <0.01, \*\*\*\* p <0.0001 v.s controle. # - não significativo v.s ibuprofeno. ANOVA, teste de Bonferroni.

Fonte: Autor (2017).

O teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético é um modelo inespecífico utilizado para avaliar a atividade analgésica de várias drogas, este modelo detecta substâncias de ação central e periférica. Um aspecto relevante é que a patologia da dor é uma resposta complexa, e os efeitos da substância não podem ser investigados num único modelo experimental, sendo necessário outros modelos de dor para confirmar a ação analgésica desta substância (COLLIER et al., 1967).

O ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos como PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>, histamina, bradicinina e serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH (FRANÇA et al., 2001, GUO et al., 2008). Contudo, a inibição ou redução do número de contorções abdominais em resposta ao ácido acético é obtida com uma variedade muito grande de substâncias, agindo de diferentes maneiras, como por exemplo: anti-inflamatórios não-esteroidais, anticolinérgicos, narcóticos, anti-histamínicos bloqueadores de receptores H1 e H2 e anticonvulsivantes (STEPANOVIC-PETROVI et al., 2008; ZANBOORI et al., 2008).

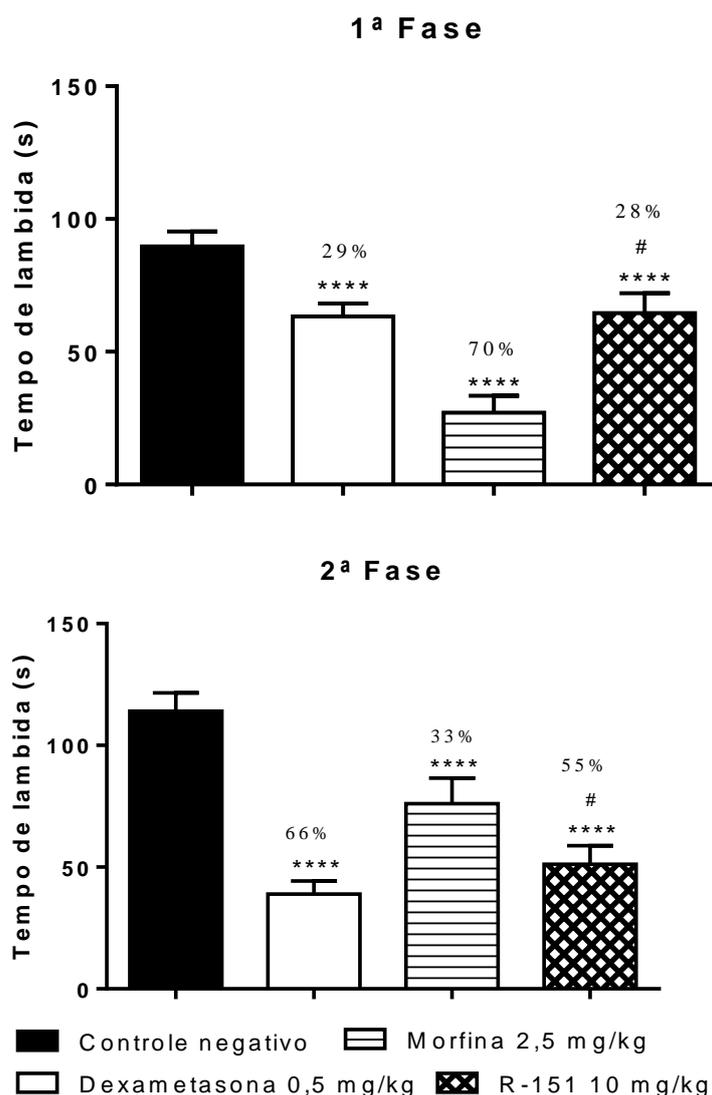
#### 4.8 TESTE DE FORMALINA

A injeção intraplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica, como mostra a figura 10. Os valores de inibição do tempo de lambida na

primeira fase (0-5 min) em relação ao grupo controle foram de 28% na dose de 10 mg/kg, 29% na Dexametasona (0,5 mg/kg), e de 70% na morfina (2,5 mg/kg). Já na segunda fase (15-30 min) foram de 55% na dose de 10 mg/kg, 66% na Dexametasona (0,5 mg/kg) e 33% na morfina (2,5 mg/kg). Após 60 minutos de tratamento, a dose de 10 mg/kg da substância R-151 inibiu a primeira fase em 28%. E na segunda fase ocorreu uma diminuição de 55% do tempo de lambidas. Portanto, a substância testada, R-151 na dose, 10 mg/kg apresentou atividade antinociceptiva em ambas as fases do modelo de formalina, tanto na primeira fase considerada de neurogênica como na segunda fase considerada como inflamatória, uma vez que, promoveu a redução de lambidas em comparação ao grupo controle e não apresentou diferenças significativas em comparação ao fármaco padrão utilizado no teste, Dexametasona.

Esse modelo de nocicepção induzido pela formalina nos permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção bem como a ação de fármacos analgésicos, sendo considerado um modelo confiável de avaliação de dor. Neste experimento, a injeção de uma substância irritante (formalina) no espaço subcutâneo da pata posterior direita dos animais determinou o surgimento de alterações comportamentais, interpretadas por respostas motoras características que nos permitiram avaliar a intensidade da resposta nociceptiva ao estímulo químico. Tais comportamentos incluem morder, lambe ou elevar a pata, bem como agitação vigorosa do membro (BENEDITO, 2009).

Figura 10 – Efeito do R-151 sobre nocicepção induzida por formalina 2,5%.



Valores expressos em média  $\pm$  DP (n = 6), \*\*\*\* p <0.0001 v.s controle. # - não significativo v.s Dexametasona. ANOVA, teste de Bonferroni.

Fonte: Autor (2017)

Com este modelo experimental, podemos evidenciar uma resposta bifásica (SOUSA, 2008): a primeira, de origem neurogênica que é caracterizada por um curto período (de 0-15 minutos) que em geral é atribuída à ativação direta de nociceptores, levando a ativação das fibras C e liberação de substância P (SHIBATA et al.,1989) e a segunda fase, de origem inflamatória que consiste em um período mais longo (15-60 minutos) e está associada à liberação de mediadores endógenos locais, serotonina, bradicinina e histamina que orquestram as respostas inflamatórias responsáveis pela ativação e sensibilização de neurônios aferentes primários (BENEDITO, 2009;SANTOS, 2008;EMMEL, 2008).

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- O derivado isoxazolina-acilhidrazona R-151 apresentou atividade anti-inflamatória frente ao experimento de pleurisia induzida por carragenina, com redução significativa da migração leucocitária;
- O derivado R-151, em todas as doses testadas, inibiu a produção de óxido nítrico;
- O derivado R-151 possui atividade inibitória sobre a ação/liberação de histamina;
- Os resultados nos testes de ácido acético indicam que o composto R-151 possui atividade antinociceptiva;
- O R-151 apresenta atividade expectorante sobre a eliminação de muco;
- Os resultados no teste de ácido acético sugerem que o composto em estudo atua por mecanismos periféricos, atuando na dor inflamatória.
- O composto R-151 diminuiu a migração celular na pleurisia induzida por zimosano, histamina, substância P e bradicinina
- O composto R-151 inibiu significativamente a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , óxido nítrico e mieloperoxidase;

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A.; Química Medicinal: 25 Anos De Planejamento Racional De Fármacos. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, 2002.

ARNHOLD J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**. v. 69, n.1, p. 4-9. 2004.

BANNENBERG, G.; SERHAN, C. N. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in the Inflammatory Response: **An Update. Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 1260–1273, 2010.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell Journal**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BENNETT, M. I. Can pain can be more or less neuropathic? **Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. Pain**. v. 122, n. 3, p. 289-294, 2006.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The Mechanisms of Action of PPAR's. Resultados da pesquisa. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409-435 2002.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50. 2007.

CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D. A.; CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**. v.143, n. 7, p. 803-818. 2004.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 137-158, 1998.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.;

COLLINS, T.; ROBBINS. Pathologic basis of disease. **Philadelphia: WB Saunders Company**, 1999.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. **Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório**. Rev. Virtual Química, v.1, n. 3, p.241-256 Jul/Set 2009.

CRAVEIRO, A.C.S.; CARVALHO, D.M.M.; NUNES, R.S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S.A.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.739-743, 2008.

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.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**. v. 112, n. 4, p. 935 – 945. 2008.

DALMARCO E.M, FRODE T.S, MEDEIROS Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**. v. 11, n. 5, p. 299-306. 2002.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.  
Drugs, Acetaminophen, Cyclooxygenase 2, and Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 211-218, 2000.

EVILEVITCH, V; WU, TT; LINDGREN, L; GREIFF, L; NORRGREN, K; WOLLMERM P. Time course of the inflammatory response to histamine and allergen skin prick test in guinea-pigs. **Acta Physiol. Scand.**, v.165, p. 409-513,1999.

FERREIRA S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227–1231, novembro. 1993.

FERREIRA, R. G.; MATSUI, T. C.; GODIN, A. M.; GOMIDES, L. F.; PEREIRA-SILVA, P. E. M.; DUARTE, I. D.G.; MENEZES, G.B.; COELHO, M. M.; KLEIN, A. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 685, p. 198–204, 2012.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S. M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 25, n.4, p.575-584. 2010.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**. v. 13, n. 3, p. 162-8. 2001.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in FRÖDE-SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. **Peptides**. v. 20, p. 259- 265, 1999.

GARCIA-PASTOR, P.; RANDAZZO, A.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J.; GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**. v. 440, p. 361-380, 2008.

GOUDET, C.; CHAPUY, E.; ALLOUI, A.; ACHER, F.; PIN, J. P.; ESCHALIER, A. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. **Pain**. v.137, p.112-24. 2008.

GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; LANG, K. L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113, p. 346–353, 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, inflammation, and cancer**. Cell, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, B. M.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C.; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of índole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 1816-22. 2011.

HOLMES, A.; CHRISTELIS, N.; ARNOLD, C. Depression and chronic pain. **Medical Journal of Australia**, v. 1, n. 2, p. 17-20, 2012.

IMAI, Y.; HAYASHI, M.; OH-ISHI, S. Key role of complement activation and platelet-activating factor in exudate formation in zymosan-induced rat pleurisy. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 57, n. 2, p. 225-32. 1991.

ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v.65, p.297-303. 1994.

- ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C.P. sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 47, n. 1, p. 41-51. 2001.
- JUTEL, M. et al. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009.
- KELLY, M.; KWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.120, p.3-10. 2007.
- KIKUCHI, M.; TSUZURAHARA, K.; NAITO, K. Involvement of leukotriene B4 in zymosan-induced rat pleurisy: inhibition of leukocyte infiltration by the 5-lipoxygenase inhibitor T-0757. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 18, n. 9, p. 1302-4. 1995.
- 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.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.
- KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**. v. 25, p. 154–159. 2002.
- 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, 2005.
- KUMAR V.; ABBAS A. K.; FAUSTO N. Robbins & Cotran: **Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- KUMAR, V. et al. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th. ed. **Philadelphia**: Elsevier Saunders, 2005.
- KUMARI, K.D.K.P.; WEERAKOON, T.C.S.; HANDUNNETTI, S.M.; SAMARASINGHE, K.; SURESH, T.S. Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of Aegle marmelos in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, 2014.
- LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S.; CALIXTO, J. B.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1-3, p.185-192, 2003.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- MARTIN-FONTECHA, A.; Lindy L Thomsen, L. L.; Brett, S.; Gerard, C.; Martin

- Lipp, M.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. . Induced recruitment of NK cells to lymphnodes provides IFN- $\gamma$  for TH1 priming. **Nature Immunology**, v. 5, p. 1260 – 1265, 2004.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.
- MEYERS, C.; ALBITAR, M.; ESTEY, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancer**. v. 104, n. 4, p. 788-793, 2005.
- MILES, A.; LIASKOU, E.; EKSTEEN, B.; LALOR, P.F.; ADAMS, D.H. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 1257-1267, 2008.
- MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, ROSALEEN. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **LIPIDS**, v. 36, n. 10, p. 1161-1168, 2001.
- MONTENEGRO, C.A. **Atividade gastroprotetora de *Xylopiangsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.
- MOTA, FVB. Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K. TSA.; ISSY A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.
- OMOIGUI S. The biochemical origin of pain--proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 1 of 3--a unifying law of pain. **Medicinal Hypotheses**, v. 69, n. 1, p. 70-82, 2007.
- OTTEN, U.; GOEDERT, M.; MAYER, N.; LEMBECK, F. Requirement of nerve growth factor for development of substance P-containing sensory neurones. **Nature**. v.287, p.158-159. 1980.
- PALASKA, E.; SAHIN, G.; KELICEN, P; DURLE, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. **IL Farmaco**, v. 57, p. 101-107, 2002.
- PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalininduced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-944. 2001.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, v. 59, n.5, p. 285-289, 2009.

PAYA, M., Effects of Petrosaspongiolide M, a Novel Phospholipase A2 Inhibitor, on Acute and Chronic Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 1, p. 166-172, 1999.

RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. A.; ARYA, J.; HARKEN, A. H. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, p. 268–273, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

RAO T. S.; CURRIE J. L.; SHAFFER A. F.; ISAKSON P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Mediators of Inflammation**. v. 2, n. 5, p. 357-362, 1993.

RAZA, M. AL-SHABANAH O.A.; EL-HADIYAH T.M.; AL-MAJED A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Phamraceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.

REDDY, L.V.; SUMAN, A.; BEEVI, S. S. *et al.* Design and synthesis of 1-Aroyl-2-ylidene Hydrazines under conventional and microwave irradiation conditions and their citotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.21, n.1, p.98-104. 2010.

RIBBONS, K. A.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T.; ALLEN, P. C.; DIDIER, P.; RATTERREE, M. S.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 1008-1115. 1997.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 57, n.1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n.1, p. 61-65, 2010.

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.

SANDBORN, W.J.; YEDNOCK, T.A. Novel approaches to treating inflammatory

bowel disease: targeting alpha-4 integrin. **American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. 2372-2382, 2003.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 23 - 43, 2002.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: **to resolve or not?** **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: **entrée for resolomics.** **Rheumatic Disease Clinics of North America**. v. 30, p. 69-95. 2004.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 9, 2015.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIMMONS, D. L.; WAGNER, D.; WESTOVER, K. Nonsteroidal Anti-Inflammatory SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69 p. 2731–2736, 2008.

SMITH KJ, LASSMANN H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Lancet Neurol**. v. 1, n. 4, p. 232-41. 2002.

SOUZA, G. V.; , ALEX S. SIMAS, A. S.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; GISELE R. A. FROIS, G. R. A.; RIBAS, J. L. C.; VERDAN, M. H.; 2 , KASSUYA1, C. A. L.; STEFANELLO, M. E.; ZAMPRONIO, A. R. Antinociceptive Activity of the Ethanollic Extract, Fractions, and Aggregatin D Isolated from *Sinningia aggregata* Tubers. **PlosOne**, p. 1-22, 2015.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**. v. 83, n. 2, p. 209-15. 1985.

SUIQUEIRA-JUNIOR, J.F. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: SUIQUEIRA-JUNIOR, J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 73-82, 2000.

SZÉLES, L.; TÖRÖCSIK, D.; NAGY, L. PPAR $\gamma$  in immunity and inflammation: cell TAVARES, A. Isoxazolinás. Uma classe de materiais avançados revistada. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v.179, p. 183-196, 2002.

the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**, v. 10, p. 223–227, 2001.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

types and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1014-1030, 2007.

UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine**. v. 10, n. 12, p. 956-63. 1998.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 102–108, 2003.

VERRI, J. R. W. A. J.; CUNHA T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VOGIAGIS, D.; BROWN, W.; GLARE, E. M.; O'BRIEN, P. E. Rat colorectal tumours treated with a range of non-steroidal anti-inflammatory drugs show altered cyclooxygenase-2 and cyclooxygenase-1 splice variant mRNA expression levels. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 6, p. 869-874, 2001.

WALKER, P. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; KRIEG, A. M.; LOVE-HOMAN, L.; ROWTON, E. D.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p. 6970–6975. 1999.

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

WHO - World Health Organization, Chronic rheumatic conditions. Disponível em: <<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>> Acesso em: 20 jan.2017.

WOOLF, C. J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**.v. 140, p. 441-451, 2004.

ZAKARIA, Z. A.; SANI, M. H. M.; CHEEMA, M. S.; KADER, A. A.; KEK, T. L.; SALLEH, M. Z. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Muntingia calabura* leaves: further elucidation of the possible mechanisms. **BMC Complementary and**

**Alternative Medicine**, p. 1-12, 2014.

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

ZHANG, H. M.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**. v.158, p.875-884. 2009.

ZHANG, X.; CAO, J.; ZHONG, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells Naunyn-Schmied. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. V. 379, p. 581–586. 2009.