

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA - ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
PPGCF

SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE 4-
AMINOQUINOLINA**

Maceió – AL

2019

SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE 4-
AMINOQUINOLINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Campesatto.

Maceió – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586a Silva, Suellen Maria Albuquerque da.
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina / Suellen Maria Albuquerque da Silva. - 2019.
99 f. : il.

Orientadora: Eliane Aparecida Campesatto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 85-94.

Apêndices: f. 95-96.

Anexos: f. 97-99.

1. Cloroquina. 2. Medição da dor. 3. Nociceptividade.
4. Anti-inflamatórios. 5. 4-aminoquinolina. I. Título.

CDU: 615.276

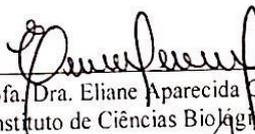
SUELLEN MARIA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE 4-
AMINOQUINOLINA**

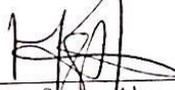
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data da aprovação: 12/02/2019.

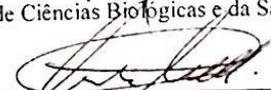
BANCA EXAMINADORA



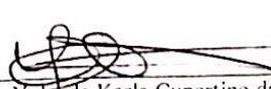
Profª. Dra. Eliane Aparecida Camposatto (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Profª. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira (Titular)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Profo. Dr. Mário Roberto Meneghetti (Titular)
Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL



Profª. Dra. Volanda Karla Cupertino da Silva (Titular)
Centro Universitário CESMAC

*Dedico este trabalho especialmente
à minha mãe Maria da Conceição, minha avó
Selina Francisca (in memoriam) e minha irmã
Maria Darleia e a todos que me ajudaram
e torceram pelo meu sucesso.*

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para DEUS, que me ajudou até aqui, me deu forças nos momentos difíceis e paciência para concluir esse trabalho;

Agradeço a minha mãe Conceição por todo amor, paciência e por ter me dado forças em toda essa caminhada. A minha avó Selina (*in memorian*) por tudo o que fez por mim e onde quer que esteja que esse agradecimento chegue até ela;

Aos meus avós paternos José Vicente e Maria Inácio que sempre me apoiaram para que eu chegasse até aqui;

A minha irmã querida Darleia e toda minha família pela força enorme e toda confiança que depositam em mim;

A minha orientadora Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Campesatto pela oportunidade que me proporcionou de participar da equipe do seu laboratório, confiança, amizade e pela orientação nesse trabalho, me rendendo um vasto conhecimento e experiência;

A professora Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira por todo auxílio na pesquisa, confiança, por dividir seu conhecimento e por aceitar fazer parte da banca, contribuindo com essa pesquisa. Ao Prof Dr Mario Roberto Meneghetti por ceder as substâncias testadas nesse projeto e por aceitar fazer parte da banca, contribuindo ainda mais na pesquisa. A Prof^a Dr^a Yolanda Karla Cupertino da Silva por aceitar contribuir na banca, bem como o Prof^o Dr^o Anderson Brandão Leite por todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, apoio e por fazer parte da banca enquanto suplente;

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFAL, em especial à Prof^a Dr^a Camila Braga Dornelas, ao Prof Dr Luciano Aparecido Meireles Grillo por todo incentivo e oportunidade no início e ao decorrer desse curso e, por fazerem parte da banca, enquanto suplentes. Ao Prof Dr Ticiano Gomes do Nascimento por todo apoio e contribuição acadêmica;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Daniel Ricarte, pela paciência, acessibilidade e resolutividade;

Aos alunos do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCAR/IQB/UFAL), que sintetizaram as substâncias testadas, em especial a Daniele pelo apoio e contribuição;

A toda a equipe do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFi/ICBS/UFAL), em especial aos que contribuíram com esse projeto, meus amigos Max Denisson, Geraldo Neto, Gessyca, Flávio, Alyne, Pedro, Kaycke, Karoline, Morgana, Amanda e José Clementino. A todos os alunos de iniciação científica que ajudaram nesse projeto: Ingrid, Iara, Raphael e Monike;

Aos meus amigos que me incentivaram nessa jornada, em especial: Tamires Alves, Erika, Karynna, Tammyrys Nutels, Ana Karla e Mayara;

A toda equipe do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em especial ao Marvin pelo apoio e cuidado com os animais que foram destinados a esta pesquisa;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

OBRIGADA!!!

“...mas os que confiam no Senhor
recebem sempre novas forças.
Voam nas alturas como águias,
correm e não perdem as forças,
andam e não se cansam.”

(Isaías 40:31)

RESUMO

A alta prevalência de doenças que causam dor e inflamação, junto a terapias longas que causam muitos efeitos adversos, tem incentivado o desenvolvimento de novas substâncias com ações analgésica e anti-inflamatória. O tratamento farmacológico geralmente consiste no uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), esteroidais (AIEs), imunossuppressores e fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) sintéticos e biológicos. A cloroquina, uma 4-aminoquinolina da classe dos FMCDs, já é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias como malária, lúpus eritematoso sistêmico e discoides, sarcoidose e artrite reumatoide. A busca por novas terapias no tratamento da dor e inflamação objetivou esse trabalho a investigar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória de quatro novos derivados sintéticos 4-aminoquinolínicos (DS4AMQs), desenvolvidos e cedidos pelo Grupo de Catálise e Reatividade Química – GCaR/IQB/UFAL. Para os modelos *in vivo* foram utilizados camundongos do gênero *Swiss* (n = 6), adultos, de ambos os sexos, com 25-35 g, provenientes do Biotério Central da UFAL, sob aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (04/2018). Foram realizados os seguintes testes toxicológicos para avaliação a toxicidade dos DS4AMQs: ensaio toxicidade *in vitro* pelo método de MTT e ensaio de toxicidade aguda por via oral *in vivo*. Para triagem da dose foi realizado o ensaio de nocicepção induzida por formalina. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo ensaio de peritonite induzida por Zymosan. A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada através dos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e placa quente. E por fim, foi realizada a avaliação da performance motora através do ensaio da barra giratória. Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI/ICBS/UFAL). No ensaio de MTT, as concentrações de 0,1, 1 e 10 μM não apresentaram citotoxicidade para nenhum dos quatro DS4AMQs testados, apenas a concentração de 100 μM demonstrou toxicidade celular para DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3. No teste de toxicidade oral aguda foi estimada a DL50: DS4AMQ1 e DS4AMQ2 112,95 mg/kg; DS4AMQ3 >175 mg/kg <310 mg/kg e DS4AMQ4 232,95 mg/kg. No ensaio de nocicepção induzida por formalina, a dose de 50 mg/kg reduziu estatisticamente a fase inflamatória nos animais tratados com DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3; o tratamento com DS4AMQ4 não demonstrou diminuição estatística neste ensaio, com isso os ensaios seguintes prosseguiram apenas com os derivados que apresentaram redução estatística. O ensaio de peritonite induzida por Zymosan, demonstrou diminuição significativa da quantidade de leucócitos totais, com percentual de inibição entre 88% a 92%, e na dosagem de citocinas os DS4AMQs reduziram estatisticamente IL-6 e aumentaram estatisticamente IL-10. No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, os DS4AMQs testados reduziram estatisticamente em 71% a 77% o número de contorções e, no ensaio de nocicepção induzida por glutamato, eles demonstraram uma redução estatística de 53% a 68% do parâmetro nociceptivo avaliado. Os DS4AMQs testados no ensaio da placa quente demonstraram redução estatística do tempo de permanência na placa e, no ensaio da barra giratória, os animais tratados com os DS4AMQ não tiveram sua performance motora afetada. Diante dos resultados, é possível afirmar que os DS4AMQs induzem uma ação anti-inflamatória aguda e antinociceptiva periférica e central, sem interferências na performance motora dos animais, corroborando a pesquisa de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Análogos da Cloroquina. 4-aminoquinolina. Dor. Nocicepção. Inflamação.

ABSTRACT

The high prevalence of diseases that cause pain and inflammation, in addition to long-term therapies that cause many adverse effects, has encouraged the development of new substances with analgesic and anti-inflammatory actions. Pharmacological treatment usually consists of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), steroidal anti-inflammatory drugs (EAI), immunosuppressants, and biological and synthetic disease-modifying drugs (DMDs). Chloroquine, a 4-aminoquinoline included in the DMDs, is already used in the treatment of inflammatory diseases, such as malaria, systemic and discoid lupus erythematosus, sarcoidosis, and rheumatoid arthritis. Considering the need for new alternatives in the treatment of pain and inflammation, this study aimed to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory potential of four new synthetic derivatives of 4-aminoquinoline (DS4AMQs), developed by the Catalysis and Chemical Reactivity Group – GCAR/IQB/UFAL. For the *in vivo* models, Swiss mice (n = 6), adults, both sexes, with 25-35 g, from the Central Animal Facility of the UFAL were used. The following toxicological tests were performed to assess the toxicity of DS4AMQs: *in vitro* toxicity test by the MTT method and *in vivo* oral acute toxicity test. The formalin-induced nociception assay was performed for dose screening. Acute anti-inflammatory activity was assessed by the Zymosan-induced peritonitis assay. The evaluation of antinociceptive activity was performed through the acetic acid-induced writhing test, glutamate-induced nociception test and hot plate test. Finally, the motor performance evaluation was conducted by the rotarod test. All the tests were performed in the Laboratory of Pharmacology and Immunity (LaFi/ICBS/UFAL). In the MTT assay, 0.1, 1 e 10 μM concentrations of all four DS4AMQs did not show signs of cytotoxicity; only in the 100 μM concentration, DS4AMQ1, DS4AMQ2, and DS4AMQ3 demonstrated cellular toxicity. In *in vivo* toxicology test, the estimated LD50s were: DS4AMQ1 and DS4AMQ2, 112,95 mg/kg; DS4AMQ3 > 175 mg/kg; DS4AMQ4, 232,95 mg/kg. In the formalin-induced nociception test, the 50 mg/kg dose statistically reduced the evaluated parameter in the inflammatory phase in all animals treated with DS4AMQ1, DS4AMQ2, and DS4AMQ3; the treatment with DS4AMQ4 did not present a statistically decrease. Thus, the following tests were conducted only with the derivatives that presented statistical results. In the Zymosan-induced peritonitis test, results showed a significant decrease in total number of recruited leukocytes, with an inhibition percentage between 88% and 92% for the tested DS4AMQs, and in the cytokine dosage the DS4AMQs statistically reduced IL-6 and statistically increased IL-10. In the acetic acid-induced writhing test, all DS4AMQs statically decrease the number of writhes, presenting an inhibition percentage between 71% and 77%; while in the glutamate-induced nociception test, the tested derivatives statistically reduced the nociceptive parameter, presenting an inhibition percentage between 53% and 68%. All tested DS4AMQs were able to statistically reduce the latency time in the hot plate test and were not able to affect the motor performance of animals in the rotarod test. In view of the results, it is possible to affirm that the DS4AMQs induce an acute anti-inflammatory action, as well as a central and peripheral antinociceptive potential, without interfering in the motor performance of animals, corroborating the research of new analgesic and anti-inflammatory drugs.

Keywords: Chloroquine analogues. 4-aminoquinoline. Pain. Nociception. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1 - | Mecanismo de nociceção a partir do estímulo de nociceptores periféricos, transferido para regiões no Sistema Nervoso Central..... | 21 |
| Figura 2 - | Esquemática das quatro fases da nociceção: transdução, transmissão, percepção e modulação..... | 22 |
| Figura 3 - | Mediadores químicos da dor..... | 24 |
| Figura 4 - | Esquemática da cascata do ácido araquidônico..... | 30 |
| Figura 5 - | Estrutura química da Cloroquina. Fórmula molecular: $C_{18}H_{26}ClN_3$; nomenclatura IUPAC: 4-(7-cloro-4-quinolilamino) pentildietilaminoildietilamina..... | 38 |
| Figura 6 - | Estrutura do núcleo quinolínico, grupo farmacofórico responsável pelas atividades farmacológicas da Cloroquina..... | 40 |
| Figura 7 - | Estruturas químicas dos derivados de 4-aminoquinolina..... | 44 |
| Figura 8 - | Reação de redução de MTT a Formazan..... | 46 |
| Figura 9 - | Esquemática do ensaio de nociceção induzido por formalina..... | 50 |
| Figura 10 - | Esquemática do ensaio de peritonite induzida por Zymosan..... | 51 |
| Figura 11 - | Esquemática do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético..... | 52 |
| Figura 12 - | Esquemática do ensaio de nociceção induzido por glutamato..... | 53 |
| Figura 13 - | Esquemática do ensaio da placa quente..... | 54 |
| Figura 14 - | Esquemática do ensaio da barra giratória..... | 55 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4, Dipirona, Dexametasona e Cloroquina (todos nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT..... | 57 |
| Gráfico 2 - Variação de peso dos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs nas doses de 310, 175, 99 e 55 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral..... | 60 |
| Gráfico 3 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nocicepção induzida por formalina em camundongos..... | 66 |
| Gráfico 4 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de peritonite induzida por Zymosan em camundongos..... | 69 |
| Gráfico 5 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos..... | 71 |
| Gráfico 6 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos..... | 73 |
| Gráfico 7 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio da placa quente em camundongos..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Principais Citocinas presentes no processo inflamatório..... | 32 |
| Tabela 2 - | Parâmetros de avaliação de animais após a exposição aguda..... | 48 |
| Tabela 3 - | Sinais críticos de dor e sofrimento para animais após exposição aguda..... | 49 |
| Tabela 4 - | Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4, Dipirona, Dexametasona e Cloroquina (todos nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT..... | 58 |
| Tabela 5 - | Reações tóxicas apresentadas pelos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs na dose de 175 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral..... | 63 |
| Tabela 6 - | Reações tóxicas apresentadas pelos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs nas doses de 99 e 310 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral..... | 64 |
| Tabela 7 - | Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4 sobre o ensaio de toxicidade aguda por via oral..... | 65 |
| Tabela 8 - | Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nocicepção induzida por formalina em camundongos..... | 68 |
| Tabela 9 - | Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de peritonite induzida por Zymosan em camundongos..... | 70 |
| Tabela 10 - | Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos..... | 72 |
| Tabela 11 - | Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos..... | 73 |
| Tabela 12 - | Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs na coordenação motora de camundongos no teste da barra giratória..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|--|
| AINES | Anti-inflamatórios Não Esteroidais |
| AIES | Anti-inflamatórios Esteroidais |
| ANOVA | Análise de Variância |
| AP-1 | Proteína-1 Ativada |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CL 50 | Concentração Letal de 50% |
| CLO | Cloroquina |
| CONCEA | Conselho Nacional de Experimentação Animal |
| COXs | Ciclooxigenases |
| COX-1 | Ciclooxigenase 1 |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| CO₂ | Gás Carbônico |
| DEXA | Dexametasona |
| DIP | Dipirona |
| DL 50 | Dose Letal Média |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| DS4AMQs | Derivados Sintéticos de 4-aminoquinolina |
| DZP | Diazepan |
| EP | Prostaglandina E |
| e.p.m. | Erro Padrão da Média |
| FMCDs | Fármacos Modificadores de Curso da Doença |
| g | Gramas |
| GCs | Glicocorticoides |
| GMCSF | Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos |
| h | Hora |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucinas |
| IND | Indometacina |
| i.p. | Intra-peritoneal |
| kg | Quilograma |
| mg | Miligrama |
| min | Minutos |

| | |
|---------------|---|
| MIP | Proteína Inflamatória de Macrófagos |
| mL | Mililitro |
| MM | Massa molecular |
| MTT | [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NF-κB | Fator Nuclear-Kappa B |
| NK-1 | Receptor Neurocinina-1 |
| Nm | Nanômetro |
| NMDA | Receptores N-Metil-D-Aspartato |
| NO | Óxido Nítrico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PFF2α | Prostaglandina F2α |
| PGD2 | Prostaglandina D2 |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PGI2 | Prostaglandina I2 |
| PGs | Prostaglandinas |
| r.p.m. | Rotações por Minuto |
| RPMI | Meio Roswell Park Memorial Institute |
| s | Segundos |
| SAL | Salina |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral α |
| TH | Células T efectoras |
| v.o. | Via oral |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| μmol | Micromol |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| °C | Graus Celcius |
| 5-HT | Serotonina |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Dor e Nociceção | 17 |
| 1.1.1 | Caracterização da dor..... | 18 |
| 1.1.2 | Fisiopatologia da dor..... | 20 |
| 1.1.3 | Mediadores químicos da algesia..... | 24 |
| 1.2 | Inflamação | 27 |
| 1.2.1 | Mediadores químicos da inflamação..... | 29 |
| 1.2.2 | Tratamento farmacológico..... | 34 |
| 1.3 | Cloroquina | 37 |
| 1.3.1 | Derivados quinolínicos..... | 40 |
| 1.4 | Justificativa | 42 |
| 2 | OBJETIVOS | 43 |
| 2.1 | Objetivo geral | 43 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 43 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 3.1 | Obtenção das substâncias teste | 44 |
| 3.2 | Substâncias e reagentes | 44 |
| 3.3 | Animais | 45 |
| 3.4 | Ensaio <i>in vitro</i> | 46 |
| 3.4.1 | Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT..... | 46 |
| 3.5 | Ensaios <i>in vivo</i> | 47 |
| 3.5.1 | Teste de toxicidade aguda por via oral – “Up-and-Down-Procedure”..... | 47 |
| 3.5.2 | Ensaio de nociceção induzida por formalina..... | 49 |
| 3.5.3 | Avaliação da atividade anti-inflamatória..... | 50 |
| 3.5.3.1 | <i>Ensaio de peritonite induzida por Zymosan</i> | 50 |
| 3.5.4 | Avaliação da atividade antinociceptiva..... | 51 |
| 3.5.4.1 | <i>Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético</i> | 51 |
| 3.5.4.2 | <i>Ensaio de nociceção induzido por glutamato</i> | 52 |
| 3.5.4.3 | <i>Ensaio da placa quente</i> | 53 |
| 3.5.5 | Avaliação da performance motora..... | 54 |
| 3.5.5.1 | <i>Ensaio da Barra Giratória</i> | 54 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.6 | Análise estatística | 55 |
| 4 | RESULTADOS | 56 |
| 4.1 | Ensaio <i>in vitro</i> | 56 |
| 4.1.1 | Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT..... | 56 |
| 4.2 | Ensaio <i>in vivo</i> | 59 |
| 4.2.1 | Teste de toxicidade aguda por via oral – “ <i>Up-and-Down-Procedure</i> ”..... | 59 |
| 4.2.2 | Ensaio de nocicepção induzida por formalina..... | 65 |
| 4.2.3 | Avaliação da atividade anti-inflamatória..... | 68 |
| 4.2.3.1 | <i>Ensaio de peritonite induzida por Zymosan</i> | 68 |
| 4.2.4 | Avaliação da atividade antinociceptiva..... | 70 |
| 4.2.4.1 | <i>Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético</i> | 70 |
| 4.2.4.2 | <i>Ensaio de nocicepção induzido por glutamato</i> | 72 |
| 4.2.4.3 | <i>Ensaio da placa quente</i> | 74 |
| 4.2.5 | Avaliação da performance motora..... | 75 |
| 4.2.5.1 | <i>Ensaio da Barra Giratória</i> | 75 |
| 5 | DISCUSSÃO | 76 |
| 6 | CONCLUSÃO | 86 |
| | REFERÊNCIAS | 87 |
| | ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL..... | 97 |
| | ANEXO B - Progressões de dose para a diretriz do teste de toxicidade aguda por via oral – “ <i>Up-and-Down-Procedure</i> ” (teste 425) da OECD..... | 98 |
| | ANEXO C - Progressões de dose para a diretriz do teste de toxicidade aguda por via oral – “ <i>Up-and-Down-Procedure</i> ” (teste 425) da OECD..... | 99 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

Uma das principais razões pelas quais a população procura atendimento médico é devido a quadros de dor, sendo este um fator importante como problema de saúde pública. A dor interfere prevalentemente na qualidade de vida, fazendo com que esta seja limitada e haja diminuição na produtividade na maioria da população (SALDANHA et al., 2017). Estima-se que a dor afeta 30% da população mundial, sendo ela crônica, gerando uma condição persistente e inadaptada (ZORINA-LICHTENWALTER; KHOURY; DIATCHENKO, 2016).

Durante muitos anos, a forma como um sentimento físico pode influenciar um comportamento individual ou de um grupo social, vem sendo discutida, analisada e pesquisada por várias áreas de conhecimento. De acordo com sociólogos, um indivíduo não sofre sozinho, sentimento que algumas vezes pode ser desenvolvido pela sociedade em um todo, o que vem a gerar fatores sociais e culturais (CARVALHO; OTA 2016).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor compreende um tipo de experiência desagradável que pode ser sensorial e emocional relacionada a lesões em tecidos. O desenvolvimento anatômico, etiopatogênico, fisiopatogênico, epidemiológico, clínico, avaliador, terapêutico, junto com contextos de prognóstico, reabilitação e reinserção estão envolvidos para essa definição precisa da dor (TEIXIRA; ALMEIDA; YENG, 2016).

Muitas doenças crônicas fazem com que o organismo desenvolva o sintoma de dor, sendo um primeiro sinal clínico a ser observado, que, sem dúvida é, de suma importância para que haja um tratamento adequado. Geralmente, com a finalidade de diferenciar a percepção de dor (nociceptivo) da dor patológica, que frequentemente é desencadeada através de inflamações ou neuropatias, essa é classificada como aguda ou crônica (PRA et al., 2017).

Geralmente, além de uma percepção desagradável, a dor é uma sensação nociceptiva, onde ocorrem vários eventos lineares e não lineares associados, levando a um estado de hiperatividade defensiva, o que aumenta a chance para detecção de outros estímulos e assim, pode ocorrer uma otimização do sistema de defesa (JÚNIOR et al., 2016). A dor não vem a ser apenas uma sensação, ela vem acompanhada de uma dimensão emocional significativa e influente, o que vem de convicções, expectativas, cultura e

experiências passadas (FONG; SCHUG, 2014), já o termo nociceção é o estímulo doloroso propriamente dito, sem influência do componente emocional, envolvendo apenas as vias neuroanatômicas e os mecanismos neurológicos com seus receptores específicos, que irão detectar o estímulo de lesão (SILVA et al., 2013). Devido a estes fatores a percepção da dor é um processo bastante complexo (FONG; SCHUG, 2014).

1.1.1 Caracterização da dor

A partir do momento em que o organismo tem a percepção de dor, ocorrem alterações comportamentais juntamente com ativação de mecanismos relacionados a proteção, tanto neuroquímicos como biomecânicos, para buscar a supressão do sinal de lesão. Diante deste fator, a dor aguda viabiliza a integridade do corpo humano, enquanto que a dor crônica pode persistir mesmo na ausência de lesão tecidual que justifique o sintoma (SOUZA, 2017).

A progressão de alguns processos patológicos crônicos, de forma contínua ou recorrente, podem vir a desenvolver dores crônicas, o que é frequentemente associado a doenças de mesmo caráter, implicando em alto impacto social nos sistemas de saúde e na economia. De fato, com o passar dos anos, a dor crônica passou a ser um problema de saúde específico, devido aos seus sintomas serem bem característicos, como a incapacidade de desenvolver funções motoras e alguns aspectos de saúde mental abalados, que em maioria são independentes da doença ou trauma (SOUZA et al., 2017).

Há mais de 60 anos, a dor pode ser classificada em três principais categorias, estas são: dor nociceptiva, que pode ser desencadeada de várias formas como por queimaduras, traumas, infecções, tumores, cirurgias, o que vem a afetar vários tecidos do organismo como pele, articulações, músculos, vísceras, estando associada a inflamação; síndromes de dor neuropática, relacionadas a lesões no sistema nervoso periférico ou central, onde seus efeitos são crônicos e podem vir a gerar dor, tornando o indivíduo incapacitado de realizar suas funções; dor “disfuncional” ou “primária” onde se incluirão várias síndromes de dor crônica, como por exemplo fibromialgia, lesão neurológica e síndrome do intestino irritável (BOUHASSIRA; ATTAL, 2016).

A dor nociceptiva é desenvolvida a partir de um dano ao tecido que pode ser real, ou apenas uma ameaça ao tecido não neural, ela se dá a partir da ativação de receptores de dor ou nociceptores, presentes nos tecidos, onde estes sofrem intensos estímulos nocivos. A dor nociceptiva tem um papel fundamental de proteção importante, devido a sua percepção causar uma sensação dolorosa, o que imediatamente chama atenção para a

região afetada causando o reflexo de retirada, para que não ocorram outros ferimentos ou maiores danos aquela região (FONG; SCHUG, 2014).

Diante de traumas e/ou funcionamento anormal do sistema nervoso, pode-se desenvolver a dor neuropática, esta não tem função biológica ou protetora, sendo mal-adaptativa e patológica. Ela pode surgir a partir de lesões ou doenças do sistema nervoso central causando dor disfuncional, mesmo quando não existem danos. Ambas as condições são classificadas como dor neuropática e, resultam do aumento e da diminuição da atividade inibitória excitatória do sistema nervoso central (FONG; SCHUNG, 2014).

A dor neuropática é considerada uma síndrome ou um estado de dor, onde ocorre um aumento da potencialização de mecanismos de nocicepção, gerando sintomas extremamente desagradáveis, dentre esses, dor espontânea sem a necessidade de um estímulo nocivo, dor alodínea tátil e dinâmica, podendo ocorrer hiperalgesia, que em sua maioria se dá pela existência de outras terapias, frustrando o paciente e o médico que prescreveu o tratamento (MIRANDA; JUNIOR, PELLOSO, 2016). Algumas doenças e lesões no sistema nervoso central ou periférico podem alterar o processo inflamatório nervoso como também induzir a dor neuropática. Nessas condições patológicas, pode não ser identificada a ligação entre a dor neuropática e os estímulos dolorosos, como também a relação entre processo inflamatório e presença de agentes nocivos (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016).

A diferenciação da dor neuropática para outros tipos de dor se dá a partir de características específicas, dentre estas: dor e sintomas que persistem, mesmo após a cicatrização ou cura; sintomas sensitivos como hiperestesia, parestesia, disestesia, considerados sintomas positivos e hipoestesia, anestesia como sintomas negativos, onde ocorre presença de dor em grau variável; e dor em grau variável de outros sinais e sintomas neurológicos como motor e autonômico manifestados por esses fenômenos negativos e positivos (MIRANDA; JUNIOR, PELLOSO, 2016).

Dentre as dores mais prevalentes na população adulta e idosa estão as dores articulares. As articulações, quando saudáveis, consistem no eixo do movimento garantindo a funcionalidade e autonomia do ser humano, através dos movimentos que este realiza para que possa se locomover e até para respirar. Muitas vezes esses movimentos ficam restritos devido a sintomas de dor articular, sendo a segunda maior causa de incapacidade física e a quarta de maior impacto na população mundial, a partir do momento em que essa é considerada causa de incapacidade associada a morte.

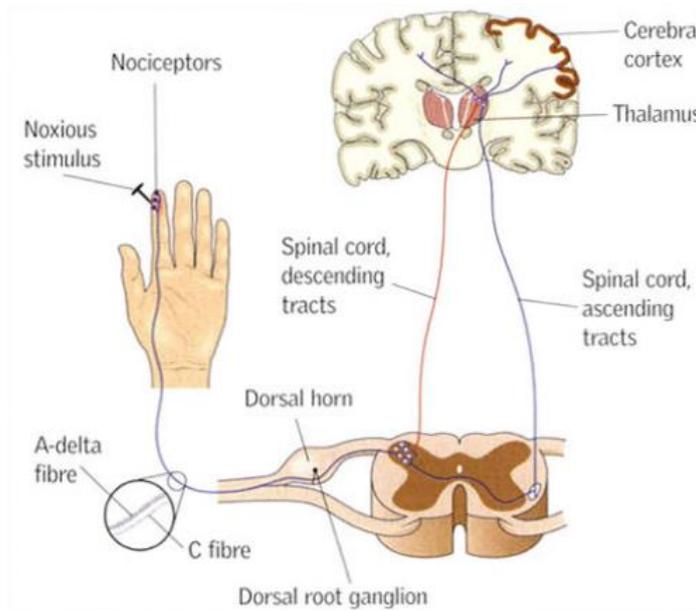
Mediante ao aumento da expectativa de vida da população mundial, a incidência e a prevalência de dor articular crônica tende a ser aumentada (SOUZA, 2016).

Um quadro clínico mais crítico pode se desenvolver a partir de lesões teciduais que podem levar a ativação do sistema imunológico e como decorrência causar dores inflamatórias, situação que ocorre devido a um papel adaptativo e protetor do próprio organismo. A sensibilização periférica é ativada quando existe um possível aumento da sensibilidade à dor, quando ocorrem traumas em tecidos (incluindo cirurgia), a partir de ferimentos, infecções ou isquemias, o que afeta diretamente nas mudanças comportamentais, reduzindo alguns movimentos e contato físico, para que haja uma cura da parte do tecido em que houve o trauma (FONG; SCHUNG, 2014).

1.1.2 Fisiopatologia da dor

A dor trata-se de uma percepção desagradável juntamente com uma sensação nociceptiva, onde ocorrem sucessões de eventos que decorrem para um estado de hiperatividade defensiva, com o objetivo de aumentar a detecção da dor, otimizando o sistema de defesa (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016). Quando ocorre uma lesão tecidual, os neurônios sensoriais (nociceptores) são estimulados e transferem a informação para o sistema nervoso central, a partir da codificação pelas terminações nervosas dessas informações, que geram potenciais de ação em nervos periféricos e assim passam a atingir o corno dorsal da substância cinzenta da medula espinhal (**Figura 1**) (TEIXEIRA; ALMEIDA; YENG, 2016).

Figura 1 - Mecanismo de nociceção a partir do estímulo de nociceptores periféricos, transferido para regiões no Sistema Nervoso Central.



Fonte: Briggs, 2010.

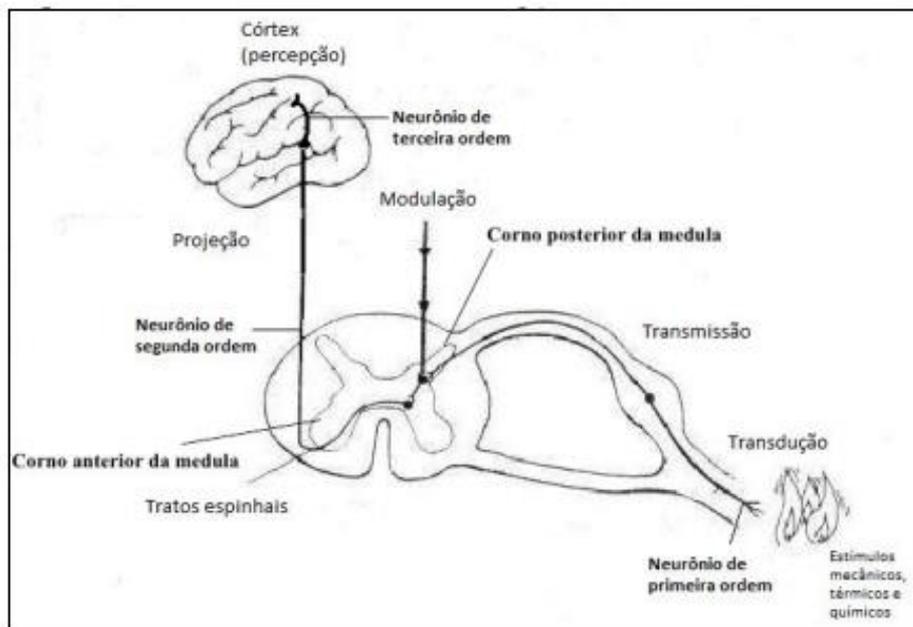
Um nociceptor é uma terminação nervosa livre, sensível a estímulos nocivos de fato ou aqueles que podem se tornar nocivos em períodos prolongados. Vários nociceptores são caracterizados como um subconjunto especializado constituído de neurônios sensoriais primários capazes de responder aos estímulos de dor como também converter esses a impulsos nervosos que são levados ao cérebro para produzir a interpretação de dor. Os nociceptores podem ser mielinizados ou não-mielinizados, dependendo de como respondem ao tipo de estimulação que pode ser química, mecânica e térmica (ELLISON, 2017).

Os receptores nociceptivos são encontrados nas extremidades dos neurônios sensoriais, livres de encapsulação em suas terminações nervosas e contém fibras sensoriais com diâmetro de 0,5 a 20 mm que podem conduzir impulsos nervosos entre velocidades de 0,5 a 120 m/s. Essas fibras nervosas são divididas em tipo A, que compreendem neurônios médios, mielinizados e de grande diâmetro e tipo C, onde são incluídos neurônios não mielinizados e de pequeno diâmetro. As fibras A ainda são subdivididas em A-delta, relativamente pequenas (1-6 m) e A-beta, fibras grandes (6-12 m) e de alta velocidade de condução (BOURNE et al., 2014).

Diante de um trauma, esses receptores nociceptivos tendem a modular-se lentamente, o que leva a dor se estender por períodos prolongados como decorrência da

alteração estrutural e funcional, além de concomitante liberação de substâncias algioênicas nos tecidos (MARTELLI; ZAVARIZE, 2013). A nocicepção da dor se divide em quatro fases, transdução, transmissão, percepção e modulação (ELLISON, 2017) como observa-se na **Figura 2**.

Figura 2 – Esquemática das quatro fases da nocicepção: transdução, transmissão, percepção e modulação.



Fonte: Sarmento, 2014.

Na transdução ocorre a passagem de componentes mecânicos, químicos e térmicos para corrente iônica através dos nociceptores, primeiramente, se convertem a potenciais de ação que partem do sítio periférico sensorial e são conduzidos até a sinapse no sistema nervoso central, resultando na liberação de neurotransmissores no terminal pré-sináptico. Essa função é dependente de proteínas integrantes da membrana, ou seja, de canais iônicos que regulam a passagem seletiva de íons específicos ou moléculas através da membrana, controlados por potencial elétrico, que realizam a despolarização ou hiperpolarização sendo importantes na geração e transmissão de sinais elétricos (potencial de ação) ao longo dos axônios nervosos. Sendo assim, quando ocorre um estímulo nocivo, os canais iônicos relacionados aos nociceptores serão abertos induzindo a passagem de íons pela membrana, consequentemente aumentando seu potencial, este pode ultrapassar seu limiar fazendo com que mais canais sejam abertos e colaborando

com a despolarização da membrana o que resultará no potencial de ação (XU; LIN; LU, 2010).

Após o processo de transdução é realizada a transmissão da nocicepção da dor. A transmissão se dá a partir de duas etapas: rápida, onde as fibras A-delta irão detectar e transmitir a dor rapidamente e lenta, que envolve fibras C que irão conduzir lentamente o impulso e monitorar a condição do tecido (BOURNE et al., 2014).

A condução do impulso de dor se dá através do sistema sináptico, onde é realizada sua transferência de um neurônio para outro, a partir da passagem de potenciais de ação do terminal periférico ao longo dos axônios chegando assim, até a central terminal dos nociceptores no sistema nervoso central. No processo, esses impulsos percorrem as fibras A-delta e C no corno dorsal da medula espinhal, para formar sinapses com neurônios de segunda ordem (interneurônios) (ELLISON, 2017).

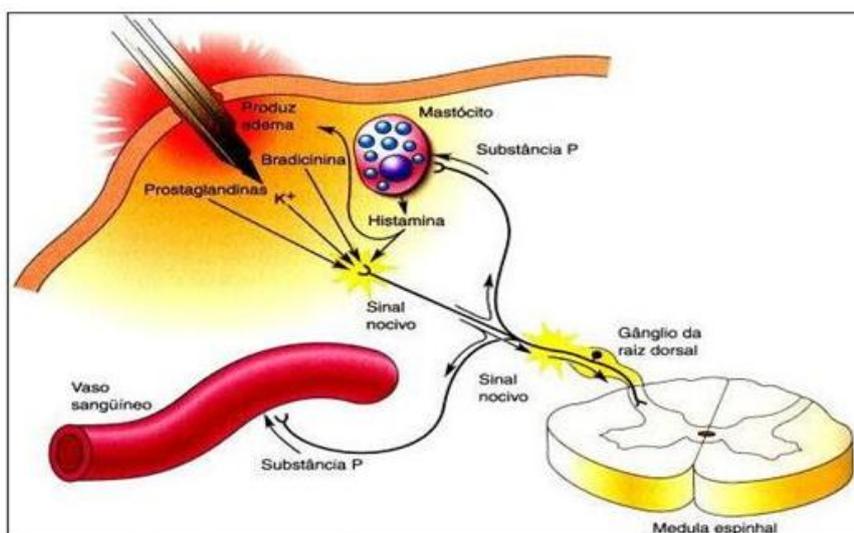
A percepção da dor é o terceiro processo envolvido, ela ocorre já no cérebro, onde é auxiliada por uma extensa rede, incluindo o sistema somatossensorial, córtex insular, cingulado e pré-frontal (SCHULZ et al., 2011). No cérebro a transmissão dos estímulos dolorosos chegam aos sistemas reticulares e límbicos no córtex e são decodificados/interpretados dando origem a experiência sensorial específica de cada indivíduo, consistindo na percepção da dor. Essa interpretação da dor pode ser influenciada por diversos fatores como, genética, cultura, experiências e saúde, além do fator relacionado ao limiar e tolerância à dor de cada indivíduo (ELLISON, 2017).

A modulação da dor é o último processo da nocicepção, ela atinge múltiplas áreas cerebrais, incluindo hipotálamo, amígdala e o córtex cingulado, onde os impulsos dolorosos são modulados, direcionados a região cinzenta periaquedural do mesencéfalo após atingem os neurônios presentes na medula (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Durante essa etapa as vias descendentes do cérebro que se estendem até o corno dorsal da medula espinhal, levam esses estímulos, que podem atuar como um mecanismo de controle para os sinais de dor, diminuindo ou aumentando as mensagens que chegam ao cérebro, devido a produção de opioides endógenos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas) destinados a inibir estímulos que podem ser nocivos, o que explica porque algumas pessoas submetidas ao mesmo procedimento apresentam níveis diferentes de dor (BRIGGS, 2010).

1.1.3 Mediadores químicos da algésia

Os receptores nervosos periféricos e todo o sistema de mecanismo da dor evoluíram para contribuir na preservação da vida através de mecanismos de neuplasticidade, mudanças estruturais e funcionais que garantiram uma adequação da adaptação e da memória, principalmente para estímulos nociceptivos gerados a partir de danos teciduais graves com o intuito de responder de forma eficiente e adaptativa. Vários mediadores da dor são liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, que são responsáveis pela ativação dos nociceptores associados as fibras nervosas tipo A-delta e tipo C, facilitando a transmissão de sinais associados a dor e inflamação, atingindo o estado de hiperalgésia primária (TRETTO; PINTO, 2015) como demonstrado na **Figura 3**.

Figura 3 - Mediadores químicos da dor.



Fonte: Bear; Connors; Paradiso, 2002.

Os mastócitos são células altamente granuladas, contendo histamina, heparina, serotonina, fatores quimiotáticos e várias proteases como peroxidase, triptase, quimase, carboxidase, beta-glucuronidases como mediadores primários. A sua ativação resulta na formação de mediadores secundários, como prostaglandinas, leucotrienos, fator ativado de plaquetas e várias citocinas, dentre elas interleucina (IL) IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 β , MIP-1 α e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Os mastócitos podem produzir diversas alterações fisiopatológicas, devido a síntese e liberação desses diversos tipos de mediadores inflamatórios (ANAND et al., 2012).

Ao ocorrer uma lesão em algum tecido periférico, substâncias são liberadas do interior das células para agir como sensibilizadoras dos nociceptores periféricos, quando ativos esses tornam-se hiperativos e não ativos passam a ser ativos. Os limiares desses nociceptores são reduzidos e as substâncias pró-inflamatórias que causam dilatação e alteração na permeabilidade vascular, levando ao desenvolvimento de rubor, calor e edema na região, chamadas de algogênicas, são liberadas para o interstício difundindo-se por difusão osmótica passiva para outras áreas vizinhas, esses efeitos são proporcionais à medida que se distanciam da lesão primária (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016).

As substâncias algogênicas estão envolvidas no processo de sensibilização periférica, como decorrência de um dano ao tecido, as células que foram lesionadas passam a extravasar enzimas no meio extracelular e irão ciclizar ácidos graxos de cadeia longa, agindo dessa forma, sobre os cininogênios, precursores da formação de cininas, principalmente bradicinina, que além de algogênica é uma substância vasoativa (ALVES et al., 2017).

Dentre a família das cininas a Bradicinina é um nonapeptídeo, formado por 9 aminoácidos, que possui baixo peso molecular e meia vida curta no plasma com níveis baixos na circulação sanguínea. Sua atividade biológica é mediada por receptores conhecidos como B1 e B2, que após ativação são responsáveis por induzir a inflamação via liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da permeabilidade vascular. O receptor B2 é expresso constitutivamente pelos tecidos periféricos e centrais, encontrado no sistema nervoso em situações normais, em diferentes tipos de células incluindo neurônios sensoriais e células microgliais, enquanto o receptor B1 é induzido e regulado de acordo com a evolução da infecção, inflamação ou trauma, sensibilizado em células da micróglia, astrócitos e neurônios após lesão tecidual (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016).

A passagem de estímulos nociceptivos através do corno posterior da medula espinhal em direção ao sistema nervoso central, depende da ação de vários neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Esses sistemas modulatórios e sua farmacologia estão inteiramente associados ao funcionamento de receptores específicos. O corno posterior da medula espinhal libera neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídios a partir dos terminais de seus aferentes primários, passando a atuar na modulação da transmissão nociceptiva. Dentre estes, destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, neurotransmissores e neuropeptídios, que incluem as taquicininas, substância P, neurocinina A, neurocinina B, peptídeo gene relacionado à

calcitonina, colescistocinina, somatostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina, encefalinas e endorfinas (CALLEGARI et al., 2015).

A substância P está estreitamente relacionada a regulação da dor. Neuropeptídeo de onze aminoácidos a substância P funciona como um neurotransmissor, liberado nos terminais de nervos sensoriais específicos e também encontrada em neurônios no sistema nervoso central, tem seu processo mediado por receptores endógenos conhecidos como neurocinina-1 (NK1), derivados da taquicinina e receptores acoplados a proteína G. Tanto a substância P como seu receptor NK1 são amplamente distribuídos no sistema nervoso central, especificamente nas regiões límbicas, incluindo o hipotálamo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal, também apresentam estreita associação a serotonina e neurônios contendo epinefrina (COCCARO et al., 2012).

O organismo também possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor, após o estímulo de diferentes núcleos do tálamo, diversas áreas do córtex sensorial somático, como substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo, passam a receber os sinais de transmissão. A partir dessa etapa, um circuito modulador endógeno descendente se conecta a substância cinzenta periaquedutal e ao corno dorsal da medula, ocasionando a ativação de outras conexões que facilitam ou inibem a nocicepção, que depende da lesão pois esta pode induzir tipos diferentes de respostas devido a plasticidade do sistema, desenvolvendo um controle da dor principalmente nas dores crônicas. Os sistemas de neurotransmissão que estão mais relacionados com esse controle são glutamatérgico, GABAérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioidérgico e adrenérgico (GUGINSKI, 2008).

Dos aminoácidos excitatórios o glutamato atua como principal neurotransmissor do sistema nervoso central, suas ações sofrem a participação de receptores de glutamato ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores metabotrópicos desempenham um papel modulatório de inibição excitatória nas sinapses e liberação de neurotransmissores, além de participarem do processo de modulação e expressão generalizada na via da dor. A estimulação desses receptores pode inibir ou facilitar a percepção da dor, o que depende do subtipo específico de receptor estimulado, sua localização celular, sináptica e anatômica. São encontrados em abundância na periferia do sistema nervoso central, trompa dorsal da medula espinhal e cérebro, atuando no controle de consequências afetivas relacionadas a dor crônica (PALAZZO et al., 2014).

A serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) também é conhecida por modular o controle da nocicepção em mecanismos centrais e periféricos, além de estar altamente

relacionada a regulação do humor, ambos de uma forma indireta e direta modulam a dor (HORJALES-ARAUJO, et al., 2013). Esta monoamina pode aumentar ou diminuir repostas nociceptivas, o que depende do local, tipo de célula e ainda do subtipo de receptor ativado, sendo capaz de interagir com sete classes de receptores diferentes, dentre eles 14 subtipos e alguns destes estão presentes junto ao núcleo da medula espinhal modulando a plasticidade neuronal como resposta a dor neuropática (BATISTA-DE-SOUZA et al., 2014).

Outro mediador nociceptivo é o óxido nítrico (NO) uma molécula de sinalização que desempenha papel fundamental nos processos de algesia agudo, e crônico, central e periférico. Ele atua como regulador da dor no sistema nervoso central, localizado no chifre dorsal da medula espinhal, derivado de diversas fontes incluindo as células da glia. A ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) é responsável pela produção de NO, esse processo influencia na plasticidade sináptica e em múltiplos mecanismo desenvolvidos na sensibilização central. NO pode atuar como neurotransmissor, quando desprendido do neurônio para agir em terminações nervosas e processos astrocitários, também ajuda na melhor liberação de substância P e de produtos à base de calcitonina um peptídeo encontrado em terminais de fibras C, o que influencia o surgimento de hiperalgesia secundária. Ainda, quando presente na coluna vertebral, participa do mecanismo glutamatérgico desencadeado por doenças e inflamações, enfraquecendo a influência da inibição algica descendente nos neurônios do corno dorsal (CURY et al., 2011).

1.2 Inflamação

O processo fisiológico que realiza um papel essencial na defesa do hospedeiro é a inflamação. Fatores exógenos, como por exemplo infecções ou exposições a micro-organismos, mais comuns e conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos, e ainda produtos químicos irritantes ou outras moléculas estranhas desencadeiam esse processo. Também existe relação com fatores endógenos, que são em maioria das vezes sintetizados pelas células, como resultado de lesões, morte celular, necrose ou algum comprometimento do metabolismo celular. Sua função primária é remover os agentes nocivos, protegendo o organismo da lesão e iniciando o processo de cicatrização que irá reparar danos a este tecido lesado, recuperando a atividade fisiológica normal (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017).

O processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares que participam diretamente no processo inflamatório, incluindo extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores (BELLÓ et al., 2015).

A resposta inflamatória desencadeia migração de células imunes com o intuito de defesa do organismo, ao estresse e/ou lesões teciduais. Quando essa lesão não é suprimida e progride, a inflamação pode passar ao estágio crônico levando a distúrbios inflamatórios mais graves. O processo inflamatório tem sido bastante estudado universalmente com o objetivo de combater seus efeitos deletérios ao organismo humano, pois, embora ele desempenhe um papel importante na patogênese de muitas doenças como artrite reumatoide, câncer, diabetes, obesidade, complicações cardiovasculares, e outras, a depender da enfermidade, vem a gerar impactos distintos (JAGADISH et al., 2016).

A inflamação é um processo caracterizado por cinco sinais típicos: rubor (vermelhidão local), calor, tumor (inchaço da região), dor e perda da função. Esse processo não é apenas uma soma de sinais clínicos e descritivos, mas uma complexa rede de sinais integrados entre células imunes e tecidos que passaram por algum processo de lesão. Pode ser dividida em sistêmica, quando a causa é decorrida de um trauma, cirurgia ou infecção grave, ou local, quando é causada por algum tipo de lesão externa (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A resposta inflamatória sistêmica desencadeia uma mudança nos glóbulos brancos e reagentes de fase aguda, para que cada um possa corresponder ao processo de acordo com a sua importância diante da reação do organismo ao trauma, o que dependerá do tamanho e da natureza dessa resposta a qual estão correlacionados de acordo com a medida do trauma (KOKOTOVIC et al., 2017).

A primeira reação a agentes agressores como mecanismo de defesa normal do organismo, é uma resposta não específica direcionada a uma fase aguda, desencadeada por uma reação sistêmica que ocorre após a exposição do organismo a estes distúrbios locais ou sistêmicos. Esta fase de inflamação aguda caracteriza-se pelo recrutamento de polimorfonucleares e granulócitos, acompanhados por monócitos que diferenciam-se em macrófagos e irão atuar em receptores específicos do processo inflamatório, para posterior liberação de mediadores inflamatórios (eicosanoides, citocinas, quimiocinas e proteases) como consequência do recrutamento e ativação leucocitária (LEE, 2012).

O estado crônico da inflamação difere-se em relação a inflamação aguda, este ocorre quando o quadro persiste por semanas, meses e até anos, o que provoca uma

degeneração do tecido e está estreitamente relacionado a ocorrência de várias doenças crônicas (NASEF; MEHTA; FERGUSON, 2017), dentre elas psoríase, artrite reumatoide, osteoartrite, síndrome metabólica, doença de Crohn e doenças neurológicas (MACHADO, 2017).

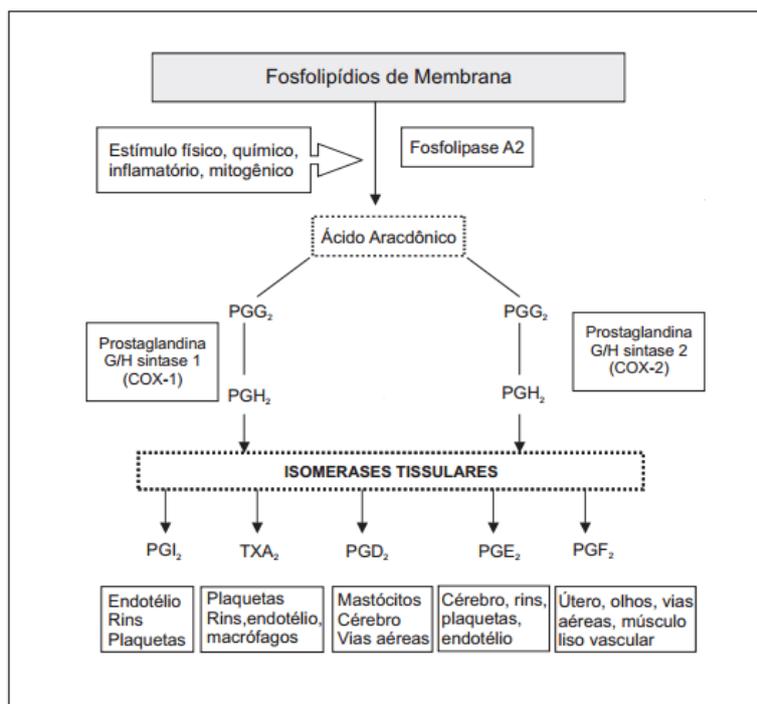
Artrite reumatoide e osteoartrite são umas das principais doenças inflamatórias que afetam grande parte da população, e comumente tem se tornando cada vez mais, parte do envelhecimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças inflamatórias são a terceira maior causa de mortes, sendo cerca de 3,46 milhões de óbitos em dados do ano de 2012, o que contabiliza 10,8% do total de mortes naquele ano (MARMITT et al., 2015).

1.2.1 Mediadores químicos da inflamação

O início da resposta inflamatória ocorre quando receptores reconhecem padrões moleculares que são expressos por células inflamatórias, devido a ativação de vias de sinalização inflamatórias, dentre esses incluem-se o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), proteína-1 ativada (AP-1) e fatores reguladores de interferon. Como resultado, tem-se a produção de citocinas pró-inflamatórias e genes como fator de necrose tumoral, interleucinas, sintetase induzida de óxido nítrico, ciclo-oxigenases (COXs), juntamente com prostaglandinas (PGs) e nitritos (PARK et al., 2017).

O ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado, é liberado na membrana por fosfolipases a partir do plasma e metabolizado por suas respectivas enzimas ou por COXs, que resultam na formação de tromboxano A₂ e PGs (**Figura 4**). As PGs têm papel fundamental no desenvolvimento da resposta inflamatória, geralmente é muito baixo seu nível em tecidos não inflamados, porém é consideravelmente imediato o aumento na inflamação aguda, antes mesmo do recrutamento de leucócitos e infiltração de células imunes, o que contribui na decorrência dos sinais cardinais da inflamação aguda. São quatro as principais PGs geradas *in vivo*: prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂) e prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Figura 4 – Esquemática da cascata do ácido aracdônico.



Fonte: Adaptado de Kummer; Coelho, 2002.

A conversão de ácido araquidônico em prostanoides é realizada pelas enzimas COXs. Existem dois tipos de COXs, ciclo-oxigenase 2 (COX-2) que é uma isoforma predominante e expressa no cérebro, induzida em tecidos lesados por Interleucina 1 β (IL-1 β), Interferon α (IFN- α) e IL-6, porém não é fonte exclusiva de PGs; e ciclo-oxigenase 1 (COX-1) que é a principal fonte de prostanoides relacionada a mediação de funções fisiológicas, estando envolvida também, em processos patológicos (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

COX-2 é responsável por transformar o ácido araquidônico em prostaglandina E2, esta promove vasodilatação local, ativação e migração de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, o que pode desencadear diretamente nociceptores através de receptores da prostaglandina E (EP). PGE2 é considerada um agente sensibilizante devido a sua relação com o aumento da sensibilização de nociceptores diminuindo o limiar de canais de sódio, modulação do canal para sensação de calor e sensibilização dos neurônios aferentes primários, na sensibilização periférica, a bradicina. A liberação de bradicina pelos mastócitos e tecidos danificados, sensibiliza receptores de bradicina 2 localizados em todos os tecidos, principalmente os que são constitutivamente expressos nos neurônios, e como consequência há uma diminuição do limiar de calor causando uma dor de longa duração que vem acompanhada da inflamação, além da produção central de PGE estar

estritamente relacionada a causa de febre durante o processo (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

Como decorrência do processo inflamatório, o organismo realiza o recrutamento de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, que irão desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação mediante a liberação de fatores de regulação da fase aguda, conhecidos como citocinas, no sítio da inflamação. Esses macrófagos juntamente com neutrófilos e as células teciduais que sofreram lesão, liberam uma gama de substâncias antioxidantes e algumas enzimas. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são amplamente induzidas para promover a produção de fatores transcricionais, essenciais para expressão de enzimas como catalase e colagenase. As mitocôndrias sofrem rompimento, o que faz com que haja liberação de enzimas líticas, peroxidação e destruição de membranas e ainda, dano ao DNA (BELLÓ et al., 2015).

As citocinas são um grupo de polipeptídeos de baixo peso molecular, divididas em várias classes, dentre essas: interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral, interferons e quimiocinas, os quais fazem parte da regulação da resposta inflamatória e imune (CARVALHO; DOMINGUETI, 2016). A deflagração da cascata de citocinas pró-inflamatórias faz com que seja induzida uma produção e secreção de citocinas, nomeadas como posteriores ou distais que perpetuam a resposta inflamatória, o que causa sensibilização de nociceptores e interação com o sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 2018). Nas citocinas pró-inflamatórias estão incluídas IL-1, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon (IFN) entre outros, nas anti-inflamatórias estão presentes IL-4, IL-10 e IL-13, responsáveis pela diminuição do processo inflamatório (SILVA, et al., 2017).

As células T CD4⁺ são responsáveis pela regulação da resposta imune e também de doenças inflamatórias. Elas são ativadas depois de encontrar o antígeno específico e assim, expandem suas populações e realizam uma diferenciação em vários subconjuntos de células T efectoras (TH) (LU et al., 2011). As citocinas são originadas a partir da diferenciação de células CD4⁺ T em células que podem ser TH1, TH2 TH9, TH17, TH22 e células T efectoras foliculares, de acordo com o perfil de citocina. As células TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33 que contribuem para intensidade e resposta inflamatória. As células TH17 nos processos inflamatórios, autoimunidade e resposta imune, expressam IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-22 e IL-26. TH22 é responsável por expressar IL-22 e TH9, IL-9 e IL-10 (AKIDS et al., 2016). As principais citocinas pré e pós-inflamatórias estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Principais Citocinas presentes no processo inflamatório.

| Citocinas | Funções | |
|--------------------------------|---|--|
| IL-6 | Estimulador dominante da maioria das proteínas de fase aguda, produzida por todas as células e tecidos. | |
| TNF-α | Mediador precoce e potente da inflamação, produzido por monócitos e células T. | |
| Pró-inflamatórias | IL-1 | Mediador precoce produzido por macrófagos e células endoteliais. |
| | INF-γ | Induz IL-12 e IL-18 e ativa macrófagos. |
| | IL-8 | Associada a IL-6, atrai e ativa neutrófilos. |
| | IL-2RA | Receptor solúvel circulante para IL-2, que promove linfócitos T, imunoglobulinas e integridade intersticial. |
| | IL-17 | Propicia a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias. |
| Anti-inflamatórias | IL-10 | Modula a atividade do TNF- α |
| | IL-13 | Modula a função dos macrófagos e inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias. |
| | IL-4 | Desempenha um papel na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias. |
| | IL-1RA | Antagonista do receptor de IL-1, inibindo-a. |
| | sTNF-R | Antagonista do receptor de TNF- α . |

Fonte: Adaptado de Kokotovic et al., 2017.

As células TH17 são capazes de produzir IL-17, citocina característica destas células. Ela encontra-se aumentada em doenças crônicas inflamatórias, e podem ser secretadas pelas células TH17, CD8⁺, células linfoides inatas e células NK (HA et al., 2014). IL-17, também é denominada como IL-17A, tem seu receptor IL-17RA, e quando ativada propicia a expressão de outras citocinas, quimiocinas e metaloproteases pró-inflamatórias, atraindo neutrófilos para mediar as defesas contra vários tipos de patógenos. TH17 juntamente com IL-17A estão envolvidas em vários distúrbios como artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase, doença inflamatória intestinal, asma alérgica e dermatite atópica (AKDIS et al., 2016).

IL-1 faz parte de um grupo único nomeado de citocinas de dupla função, presentes constitutivamente em células em repouso sob condições homeostáticas. Elas possuem características que são geralmente atribuídas a componentes intracelulares, mais especificamente a proteínas nucleares, dentre essas estão os fatores de transcrição. Podem ser encontradas no citosol ou no núcleo, quando se translocam através de localizações

nucleares sequenciadas (RIDER et al., 2013). Compreende duas proteínas, IL-1 α que é uma forma já biologicamente ativa e IL-1 β , que sua atividade biológica depende da ativação através de enzimas. IL-1 α e IL-1 β exercem efeitos similares ao se ligarem ao receptor IL-1 do tipo I (AKIDS et al., 2016). Níveis aumentados de IL-1 α estão relacionados a várias doenças autoimunes. Em pacientes com artrite reumatoide esses níveis são elevados no líquido sinovial, na psoríase sua gravidade decorre da concentração dessa interleucina, presente também em células em repouso, o que corrobora com o fato da correlação com eventos inflamatórios que envolvem necrose celular e dano tecidual (RIDER et al., 2013).

Outra citocina pró-inflamatória importante é o IFN- γ . Ele é liberado por células T e ativam macrófagos, aumentando a sinalização pró-inflamatória que acarreta em captação de lipídios e formação de células espumosas, ainda estimulam a expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento do número de monócitos e macrófagos no local da lesão (CHISTIakov et al., 2018).

IL-6 é produzido por vários tipos de células, porém na inflamação aguda e durante a inflamação crônica, as principais fontes desta citocina são respectivamente, células mielóides, como monócitos e macrófagos, e células T. Ainda pode ser produzida por fibroblastos, queratinócitos, células B, células endoteliais e alguns tipos de células tumorais, sendo sua expressão regulada por vários fatores de transcrição, particularmente NF- κ B. IL-6 é sintetizada em praticamente qualquer tipo de inflamação em vários tecidos, seu nível sistêmico é correlacionado com a gravidade da enfermidade, como em sepse, obesidade, diabetes, doença intestinal inflamatória, artrite e vários tipos de câncer (DMITRIeva et al., 2016).

A principal interleucina efetiva na ativação e recrutamento de neutrófilos é a IL-8, classificada como pertencente à família de quimiocinas, justamente por ser um fator quimiotático específico para os neutrófilos. É produzida por várias células além dos neutrófilos, como por exemplo monócitos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais após o estímulo de outras interleucinas, dentre elas IL-1a, IL-1b, IL-17 e TNF- α . Seus receptores são CXCR1 (IL-8RA) e CXCR2 (IL-8RB), e são capazes de recrutar também, células T, basófilos, eosinófilos e células NK. Encontram-se em concentrações elevadas em locais onde ocorrem inflamações, principalmente em pacientes com psoríase, artrite reumatoide e infecções no sistema respiratório (AKDIS et al., 2016).

TNF- α é conhecido por ser uma citocina inflamatória de resposta a fase aguda, mediando precocemente a inflamação e induzindo a produção e expressão de IL-6, IL-8

e ainda proteína C-reativa (JUNIOR et al., 2015). Produzida principalmente por macrófagos, é capaz de induzir outras citocinas inflamatórias e estimular a expressão de moléculas de adesão pelos fibroblastos, dessa forma desenvolve o papel de um dos principais mediadores inflamatórios, tanto na inflamação propriamente dita, como na destruição, principalmente articular. Membro da família de TNF a linfotóxina α (LT- α), antes conhecida como fator de necrose tumoral β (TNF- β), induz respostas inflamatórias ao se ligar ao receptor de TNF 1 e ainda, desencadeia a apoptose celular, a partir da ligação ao receptor de TNF do tipo 2 (SHAKER et al., 2016).

IL-10 é a principal citocina que participa na supressão da inflamação, como potente marcador anti-inflamatório, atuando nas fases posteriores da resposta imune, além de manter o equilíbrio dos níveis de expressão de citoninas no intervalo entre pró-inflamação e anti-inflamação (ZHANG et al, 2017). IL-10 desenvolve múltiplos efeitos na imunorregulação e anti-inflamação, regulando além dos níveis de expressão de citocinas por TH1, como também histocompatibilidade de antígenos complexos da classe II e moléculas co-estimulatórias em macrófagos, aumentando a sobrevivência de células B e a proliferação juntamente com a produção de anticorpos (NIKOU et al., 2016).

IL-4 e IL-13 também desempenham papel regulatório do processo inflamatório, são importantes na formação da natureza de respostas imunes, podem ativar células da linhagem mieloide, como macrófagos, células dendríticas e eosinófilos. IL-4 participa ainda da indução de anticorpos IgE pelas células B, e subsequente desenvolvimento de células T CD4⁺ em células TH2 (MOSHKOVITS et al., 2015).

1.2.2 Tratamento farmacológico

Vários agentes anti-inflamatórios, atualmente, estão direcionados para o tratamento de diferentes tipos de dor associada a inflamação, que dispõe de grande eficiência na maioria dos casos, porém são elevadas as quantidades de efeitos colaterais provocados, principalmente quando o uso é crônico (COSTA et al., 2013).

Uma das classes de fármacos mais utilizadas para tratamento de inflamação é a classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Os AINEs bloqueiam as proteínas COXs, envolvidas na produção tanto de PGs como também de tromboxanos, ambos mediadores envolvidos no processo inflamatório. Alguns AINEs são capazes de inibir COX-1 e COX-2, conhecidos como não seletivos, outros podem ser seletivos inibindo apenas COX-2, proteína extremamente relacionada aos efeitos desenvolvidos pela inflamação (JIN, 2015).

Na inflamação crônica do tecido, como por exemplo na artrite reumatoide, as PGs são responsáveis por estimular a angiogênese, proveniente do processo artrítico, o que influencia a proliferação tecidual e a síntese das proteases, colagenases e metaloproteinases que provocam a destruição tecidual local (CARVALHO; CARDOSO; ERRANTE, 2016).

É segura a utilização de uma dose baixa de AINEs, porém por um curto período de tempo, no entanto, seu uso prolongado e em doses mais altas pode desenvolver efeitos colaterais graves, aumentando o risco de acidente vascular cerebral, ataque cardíaco, hemorragia gastrointestinal e doença renal, principalmente em usuários que já possuem histórico desses problemas. Os fármacos seletivos têm menos efeitos colaterais com relação aos efeitos gastrointestinais, mas são maiores os casos de efeitos cardiovasculares (JIN, 2015).

A literatura indica que tanto o bloqueio da COX-1 como da COX-2 pode provocar uma diminuição na síntese de PGs que tem a função de proteger a mucosa gástrica, devido a esse fator problemas clínicos podem ser desenvolvidos como ulceração, hemorragia, hipermotilidade gástrica, além de possíveis efeitos adversos no fígado, apontados por recentes estudos com animais de laboratório (BELLÓ et al., 2015).

Como consequência dos efeitos colaterais, o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios é uma forte necessidade clínica. A descoberta de novos alvos anti-inflamatórios impulsiona o desenvolvimento de moléculas terapêuticas para tratamento, no intuito de reduzir ou abolir a toxicidade gastrointestinal ocasionada pelo mecanismo de ação dos AINEs (YADAV; SINGH; TEWARI, 2014).

Outra classe utilizada que é bastante comum e que faz parte da estratégia no tratamento de quadros de inflamação aguda e crônica são os anti-inflamatórios esteroides (AIEs) ou glicocorticoides (GCs). Os GCs possuem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, muito utilizados para doenças reumáticas, vasculite, artrite reumatoide e outras. Seu início de ação e sua eficácia são bastante rápidas, principalmente em doses altas e de maior duração, o que permite o tratamento de crises graves e exacerbações agudas (SPIES et al., 2011), porém esta terapia consiste na alta ocorrência de muitos efeitos adversos, associadas a longas dosagens (GAUJOUX-VIALA; LAURE GOSSEC, 2014).

O mecanismo de ação dos GCs, que está relacionado ao seu efeito terapêutico, se dá por: mecanismos genômicos e mecanismos secundários ou não genômicos provocados pela ativação de receptores citosólicos de GCs; efeitos não genômicos dos receptores GCs

ligados a membrana; e efeitos não genômicos específicos causados por interações membranas celulares (SPIES et al., 2011). Estes fármacos irão interagir com receptores intracelulares controladores da transcrição gênica que codifica COX-2, NF-kB, IL-2 e NO sintase induzível, além de inibir osteocalcina nos osteoblastos e síntese de colagenase, tornando-se uma das terapias mais utilizadas nos tratamentos de doenças reumáticas (CARVALHO; CARDOSO; ERRANTE, 2016).

Na inflamação crônica e sistêmica, o tratamento farmacológico visa controlar e prevenir a dor, lesão articular e perda da função, otimizando a qualidade de vida do portador. Geralmente são utilizados além dos AINES e GCs, imunossupressores e fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) que podem ser sintéticos ou biológicos (CARVALHO; CARDOSO; ERRANTE, 2016).

A patogênese de doenças inflamatórias levou a inclusão de novas terapias direcionadas que aumentaram significativamente o resultado clínico e o prognóstico a longo prazo para vários pacientes. A descoberta do papel desempenhado pelos processos imunológicos, principalmente, mediados pela função das células T no desenvolvimento do processo inflamatório crônico, como também TNF, ILs e células B, introduziram o tratamento com imunossupressores como resposta aos efeitos da doença (SCHWARTZ; MENGLE-GAW, 2006). Os imunossupressores mais utilizados incluem-se ciclosporina, tacrolimo, rapamicina, azatioprina, e micofenolato de mofetila (CARVALHO; CARDOSO; ERRANTE, 2016).

Outra classe são os fármacos modificadores do curso da doença biológicos, que podem ser anticorpos ou proteínas recombinantes, atuando como bloqueadores da atividade de mediadores inflamatórios ou sinalização das moléculas envolvidas nesse processo, a partir do esgotamento das células B que produzem auto-anticorpos característicos da doença ou bloqueios dos sinais co-estimulatórios necessários para ativar as células T, que possuem alvos biológicos como as citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 (ALDRICH et al., 2017).

Os fármacos preferenciais no tratamento inicial além dos AINES e GCs são os FMCDs (MORETTO; PILOTO, 2014), dentre eles incluem-se cloroquina, hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato e ciclosporinas (SANTOS et al., 2015). Os FMCDs podem ser indicados ainda para os portadores de artrite reumatoide que já tem um diagnóstico definido e, possuem biomarcadores preditores da doença, como anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclico e/ou fator reumatoide e ainda portadores que não responderam a tratamentos com outras classes de fármacos (MOTA et al., 2013).

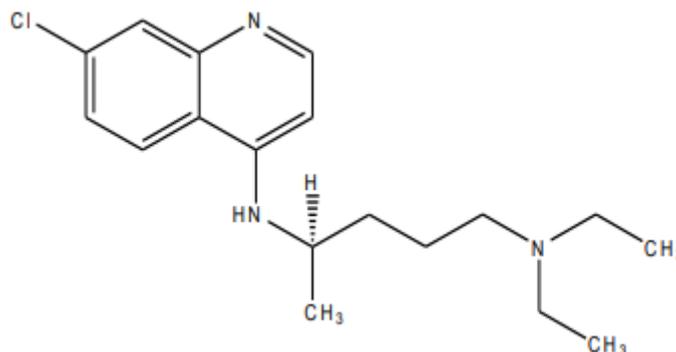
Os FMCDs alteram o curso e a progressão da doença, agindo na erosão provocada na cartilagem do osso e deficiência, através do bloqueio na produção e/ou atividade de mediadores inflamatórios, em contraste com os AINEs e GCs que mesmo sendo agindo mais rapidamente, não atuam nas deformidades causadas pela doença, apenas suprimem a dor e a inflamação. Atualmente seu uso pode ser individual ou em terapia combinada com outros grupos anti-inflamatórios, o que vem diminuindo ambos efeitos adversos, aumentando a eficácia do tratamento e também minimizando a dose efetiva de cada medicamento, porém a descoberta de novos fármacos que podem fornecer essa dupla vantagem, com efeito modificador da doença prolongado juntamente com rápido efeito anti-inflamatório sintomático sem risco de efeitos adversos potenciais, seria uma melhor forma de adequação e aderência por parte dos pacientes ao tratamento (KASHMIRA et al., 2015).

Com base no desenvolvimento de novos fármacos, durante a segunda guerra mundial já se tinha o propósito de projeção de fármacos melhorados a partir de outros já utilizados comercialmente. Assim, a partir da Cloroquina, em 1946, foi sintetizada a hidroxicloroquina, ambas utilizadas para o tratamento da malária, porém, alguns anos após foi descoberto seu uso em doenças anti-inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, atualmente hidroxicloroquina é o composto mais utilizado comercialmente dentre as 4-aminoquinolinas, e ainda, ambos são considerados os mais baratos dentre os FMCDs atualmente disponíveis e sensivelmente menos dispendiosos do que os fármacos biológicos (RAINSFORD et al., 2015).

1.3 Cloroquina

No ano de 1981 foram testados análogos de quinina buscando um novo tratamento para malária, a partir de estudos foi descoberta a resoquina de onde foi possível realizar a síntese da cloroquina, tornando-se um dos agentes mais efetivos no tratamento. Durante o período da segunda guerra mundial, soldados que faziam uso dos compostos como profilaxia a malária, demonstraram melhoras significativas de erupções cutâneas e artrite reumatoide, o que levou ao indício do seu uso para outras enfermidades (THOMAZ, 2018). A estrutura química da cloroquina é representada na **Figura 5**.

Figura 5 - Estrutura química da Cloroquina. Fórmula molecular: $C_{18}H_{26}ClN_3$; nomenclatura IUPAC: 4-(7-cloro-4-quinolilamino) pentildietilaminoildietilamina.



Fonte: Thomaz, 2018.

A cloroquina é um fármaco da classe de 4-aminoquinolinas utilizado amplamente como profilático no tratamento da malária, com mais de seis décadas de uso como medicamento de escolha, devido a sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo. Sua propriedade anti-inflamatória tem tornado essa classe útil no tratamento de algumas doenças reumáticas. Ela é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, o que corrobora com os efeitos terapêuticos demonstrados em casos de inflamação crônica (SOLOMON; LEE, 2009).

Os compostos de cloroquina além de serem usados no tratamento da malária, são eficazes para doenças crônicas como lúpus eritematoso sistêmico, lúpus discoide, sarcoidose (SANTOS et al., 2015) e são usados no tratamento de artrite reumatoide há mais de 50 anos. Estes compostos são bastante utilizados em casos iniciais de artrite reumatoide, em que as lesões são leves ou moderadas e, são considerados eficazes e seguros. Podem apresentar-se em duas formas: difosfato de cloroquina e sulfato de hidroxicloroquina (MORETTO; PILOTO, 2014).

O mecanismo de ação da cloroquina ainda não é totalmente conhecido, porém acredita-se que diminua a produção de PGs e, sua atividade anti-inflamatória esteja relacionada a inibição de enzimas lisossomais pela estabilização das membranas lisossomais, quimiotaxia e fagocitose de polimorfonucleares. Por serem bases fracas penetram livremente nas células atingindo os lisossomos (interior ácido), o que aumenta o pH do meio, prejudicando a ação de enzimas que dependem do pH ácido para atuarem e ainda, evita a sua liberação do interior celular. Podem inibir também a interação antígeno anticorpo e formação de imunocomplexos, diminuindo a expressão de IL-1 e

citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 induzidas por macrófagos, devido a uma alteração na estabilidade a nível de RNA mensageiro e de células TH, através da redução de apresentação de antígeno, alterando o sistema imune (MORETTO; PILOTO, 2014).

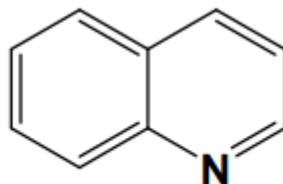
Os efeitos colaterais mais comuns são gastrointestinais relacionados a anorexia, cólicas, náuseas e diarreias; dermatológicos como prurido, alterações pigmentares na pele e mucosas e fotossensibilidade. Também podem ocorrer efeitos raros como hematológicos; neurológicos (cefaleia, insônia, nervosismo, irritabilidade) que somem nas primeiras semanas; neuromusculares como fadiga, mialgia e cardiológicos. Efeitos oculares podem ser comuns e ocorrem devido a toxicidade retiniana (retinopatia) que é o efeito mais grave e irreversível, e ainda, depósitos do fármaco na córnea e ceratopatia (mais comum) que são reversíveis com a descontinuidade da droga (MORETTO; PILOTO, 2014).

A cloroquina tem alta afinidade pelos tecidos, principalmente fígado, baço, rins, pulmões, tecidos que contém melanina, em menor extensão pelo cérebro e medula espinhal (MORETTO; PILOTO, 2014), e ainda pela retina. Com o tratamento prolongado, o fármaco passa a se acumular nos tecidos (BERGHOLZ et al., 2013), tornando mais propício o surgimento dos efeitos adversos e da toxicidade característicos.

O depósito do fármaco em tecidos de afinidade e proveniente desenvolvimento de efeitos colaterais importantes, implica no controle da concentração de cloroquina no plasma, o que leva o tratamento a ter doses restritas, limitando seu uso. Devido a isso, existe uma grande necessidade do desenvolvimento e descoberta de novas terapias, juntamente com novos fármacos, que possam trazer menos efeitos adversos e maior confiabilidade no tratamento.

A cloroquina possui um grupamento farmacofórico em seu núcleo quinolínico (**Figura 6**) caracterizado pela composição de seus compostos bioativos, responsável por suas diferentes atividades farmacológicas: antimicrobiana, antituberculosa, anticâncer, anti-HIV, leshmanicida, antimalárica e anti-inflamatória (ARANGO et al., 2012; GUO et al., 2013).

Figura 6 – Estrutura do núcleo quinolínico, grupamento farmacofórico responsável pelas atividades farmacológicas da Cloroquina.



Fonte: Adaptado de Almeida, 2014.

A síntese de novos derivados a partir da cloroquina tem gerado atividades farmacológicas e biológicas significativas, a partir de substituições no núcleo quinolínico e mantendo esse grupamento farmacofórico. Toche e seus colaboradores (2010), indicam que o átomo de cloro na posição C-4 é um ponto extremamente reativo e apto para mecanismos de inclusão e exclusão, além da sua cadeia lateral. Modificações nessas estruturas proporcionaram novos candidatos antimaláricos e atividades contra várias linhagens de tumores humanos clinicamente isolados.

1.3.1 Derivados quinolínicos

Os compostos quinolínicos são heterocíclicos que possuem nitrogênio em suas unidades estruturais, indispensáveis para sua infinidade de propriedades farmacológicas como: anticancerígenas, antioxidantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias (GHORAB; AL-SAID; ARAFA, 2014).

Estudos realizados com derivados de quinolinas, 4-carboxilquinolinas, a partir da incorporação do grupo metil sulfonil em seu grupamento farmacofórico na posição para em C-2 e C-4 do anel fenilo, demonstraram-se como potentes inibidores de COX-2, além de serem seletivos a essa enzima. Outros ensaios com modificações em derivados quinolínicos que formaram 7-cloro-4-fenilselenilquinolina, mostraram potencial anti-inflamatório e antinociceptivo semelhante ao meloxicam, fármaco utilizado como referência em tratamento de inflamação, com atividade seletiva para COX-2 (PINZ et al., 2017).

Santos e colaboradores (2015) a partir de substituições no grupamento farmacofórico, a partir do fármaco cloroquina, observaram que os derivados sintetizados demonstraram capacidade de modular a nocicepção, reduzir a migração celular sugerindo

atividade anti-inflamatória aguda e modulação da atividade anti-inflamatória crônica, com base em experimentos *in vivo*.

1.4 Justificativa

Muitas enfermidades que acometem a população mundial, estão relacionadas a sintomas de dor e inflamação, principalmente em casos que desenvolvem sinais crônicos resultantes de doenças como artrite reumatoide, reumatismo, artrose, dentre outros.

O tratamento é bastante convencional e envolve principalmente analgésicos opioides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (GCs), porém estas classes desenvolvem um grande número de efeitos adversos, principalmente no uso prolongado e crônico, que limitam seu uso e fazem com que muitos usuários interrompam ou abandonem o tratamento, além de não atuarem devidamente para tratar a doença, mas como tratamento para apenas minimizar os sintomas. Devido a isto, nos últimos anos foram incluídos classes de imunossuppressores e fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) no tratamento de algumas doenças crônicas relacionadas e, é cada vez maior o número de pesquisas para o desenvolvimentos de novas terapias e novas drogas capazes de atuar, com menos efeitos adversos e que atuem no tratamento de fato, não só como efeito paliativo.

Os FMCDs são utilizados para tratar de fato a problemática da doença que cause dor e inflamação crônica. Dentre eles tem-se cloroquina, hidroxicloroquina, ciclosporinas e sulfasalazina. A cloroquina, uma 4-aminoquinolina, é um dos mais antigos utilizados no tratamento de artrite reumatoide, doença crônica e autoimune.

A partir desses princípios surge a necessidade de testar os derivados 4-aminoquinolínicos, em comparação com fármacos anti-inflamatórios e analgésicos, como também o próprio protótipo, a nível nociceptivo e inflamatório *in vivo*, promovendo o descobrimento de novos fármacos nesse âmbito, como também na elucidação de novas drogas derivadas de outras já utilizados, com o princípio de melhoria dessa terapia analgésica e anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de derivados sintéticos com o núcleo 4-aminoquinolínico: $C_{12}H_9ClN_2$ (DS4AMQ1), $C_{11}H_9ClN_2O_2$ (DS4AMQ2), $C_{17}H_{20}ClN_3$ (DS4AMQ3), $C_{11}H_{12}ClN_3$ (DS4AMQ4) através de modelos experimentais *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

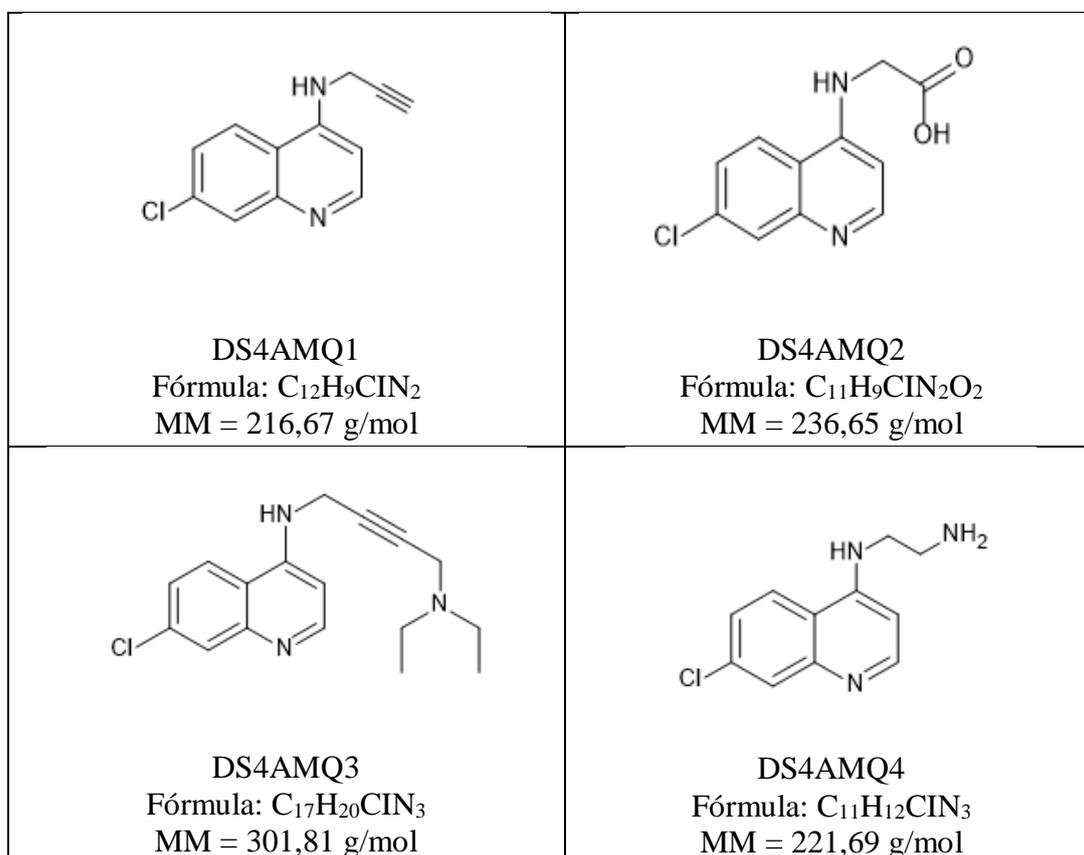
- Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de peritonite induzida por Zymosan;
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético;
- Avaliar atividade antinociceptiva dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de nocicepção induzida por formalina;
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de nocicepção induzida por glutamato;
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de nocicepção induzida por placa quente (hot plate);
- Avaliar a performance motora dos animais pós-tratamento com os derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (v.o.) no modelo de barra giratória.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das substâncias teste

As substâncias para teste utilizadas foram previamente sintetizadas a partir da 4-aminoquinolina, desenvolvidas pelo Grupo de Catálise e Reatividade Química – GCaR/IQB/UFAL e cedidas pelo Professor Dr Mario Roberto Meneghetti, resultando em quatro derivados sintéticos de 4-aminoquinolina (DS4AMQs): N-(prop-2-ínil)-7-cloroquinolin-4-amina (DS4AMQ1), Ácido 2-(7-cloroquinolin-4-ilamino) acético (DS4AMQ2), N-(4-(dietilamino)but-2-ínil)-7-cloroquinolin-4-amina (DS4AMQ3) e N-(2-aminoetil)-7-cloroquinolin-4-amina (DS4AMQ4) (**Figura 7**).

Figura 7 – Estruturas químicas dos derivados de 4-aminoquinolina.



Fonte: Autor, 2019.

3.2 Substâncias e reagentes

No ensaio de viabilidade celular *in vitro*, pelo método de MTT as substâncias testes foram utilizadas nas doses de 0,1, 1, 10, 100 µM, como também os fármacos padrões utilizados: Dipirona (DIP, Gemini), Cloroquina (CLO, Difosfato de Cloroquina,

Fagron) e Dexametasona (DEXA, Fagron). Foram utilizados ainda, meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CUT-LAB) e 1 mL de aminoácidos não essenciais, de piruvato (Sigma-Aldrich) e de glutamina (Sigma-Aldrich), Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich) como veículo, Triton™ X-100 para controle negativo e [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich).

Nos ensaios *in vivo* as substâncias teste foram utilizadas nas doses de 1, 10, 50, 55, 99, 310 mg/kg e os fármacos padrão de referência nas seguintes doses: 10 mg/kg Cloroquina (CLO, Difosfato de Cloroquina, Fagron), 30 mg/kg Dipirona (DIP, Gemini), 30 µmol/kg Indometacina (IND, Henrifarma), 1 mg/kg Dexametasona (DEXA, Fagron), 5,7 mg/kg Morfina (MOR, Dimorf®, Cristália) e 1,5mg/kg Diazepan (DZP, Compaz®, Cristália). A administração das substâncias teste e dos fármacos foi realizada 40 minutos antes do início do experimento, através de via oral (v.o) menos a Morfina e o Diazepan que foram administrados por via intraperitoneal (i.p).

Os padrões e substâncias teste administrados por v.o. foram emulsificados com Monoleato Polioxietilenossorbitano (Tween 80®, Sigma-Aldrich, 0,01% (v/v)) e solução salina (NaCl, 0,9%). Para a Morfina e o Diazepan que foram administrados por via i.p. utilizou-se apenas solução salina (NaCl, 0,9%) para diluição.

No ensaio de nocicepção induzido por formalina, esta foi preparada a partir de Formaldeído (P.A., Sigma-Aldrich) a 100% diluído em solução salina (NaCl, 0,9%), até atingir 2,5% de concentração. Foi utilizado 250 µL (10mg/mL) de solução estéril de Zymosan (Sigma-Aldrich) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan. O ácido acético (Ácido acético glacial P.A., Sigma-Aldrich) 100% foi diluído a 0,1 N, para realização do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Para o ensaio de nocicepção induzida por glutamato, o Ácido glutâmico (Sigma-Aldrich) foi utilizado na concentração de 30 µmol/pata.

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* (25-35 g) de ambos os gêneros, adultos com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram dispostos em caixas de acrílico com tampa de ferro cromado, subdivididos em grupos de 6 animais por caixa e acomodados em aparelho microisolador com exaustão de ar no biotério setorial do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI). No decorrer da pesquisa, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade

(ciclo de claro/escuro de 12 horas – fase escura: 19:00 às 7:00h), tratados com água e ração *ad libitum*.

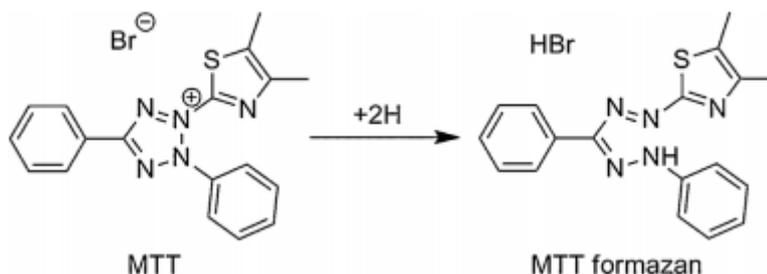
Todos os animais utilizados nessa pesquisa foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), aprovado pelo protocolo de número 04/2018 (**Anexo A**).

3.4 Ensaio *in vitro*

3.4.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT (MOSMANN, 1983)

O ensaio de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] tem como base a redução do sal de tetrazólio (amarelo, solúvel em água) em Formazan (roxo, insolúvel) (**Figura 8**). Essa redução só é possível se as mitocôndrias celulares estiverem viáveis, promovendo ao ensaio colorimétrico, quantificar essa viabilidade celular (KARAKAS; ARI; ULUKAYA, 2017).

Figura 8 – Reação de redução de MTT a Formazan



Fonte: Grela; Kozłowski; Grabowiecka, 2018.

Em uma microplaca com 96 poços foram plaqueados macrófagos da linhagem J774, numa densidade de 1×10^4 células por poço, sendo estas cultivadas em 200 μL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de aminoácidos não essenciais, de piruvato e de glutamina, nas respectivas concentrações, 100 mM e 200 mM. As células plaqueadas foram mantidas em estufa à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 , em *over night* para melhor aderência antes do tratamento. As células foram tratadas com as substâncias teste nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 μM , além dos fármacos padrões: cloroquina, dipirona e dexametasona nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 μM e ainda os controles: meio (dimetilsulfóxido –

DMSO 0,1% – veículo) e lise (Triton™ X-100) utilizado como padrão de morte celular, pois é capaz de promover a lise das células.

Após o tratamento, as células foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente por um período de 48 h. Ao término do período de incubação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado a cada poço 100 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL e reincubadas por 1 h em estufa, sob temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) e 5% de CO₂, para que ocorra a reação de redução do MTT a Formazan. 1 h antes da adição do MTT, o sobrenadante foi desprezado nos poços com o controle de lise e adicionado Triton™ X-100. Logo após a reincubação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas com 100 µL de DMSO, solvente capaz de solubilizar o Formazan encontrado no interior das células viáveis. Por fim, para a avaliação quantitativa, os poços foram analisados em um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm (*ThermoPlate*).

3.5 Ensaios *in vivo*

3.5.1 Teste de toxicidade aguda por via oral – “*Up-and-Down-Procedure*” (OECD, 2008)

No teste “*Up-and-Dow*” as doses são administradas podendo haver seu aumento ou diminuição, até que se obtenha o valor da dose letal média (DL50), dose em que metade do grupo venha a óbito, e o valor da dose de segurança, que não causará sinais de toxicidade aos animais. Para substâncias desconhecidas e em que não houver uma estimativa da letalidade, a dosagem inicial é de 175 mg/kg, pois na maioria dos casos, esta dose é subletal e, portanto, serve para reduzir o nível de dor e sofrimento.

Os animais foram divididos em cinco grupos ($n = 5$), um grupo para cada substância e um grupo controle utilizando o veículo salina (NaCl, 0,9%) v.o.. No 1º dia foram tratados com as substâncias testes na dose inicial de 175 mg/kg v.o., administrada individualmente, e após 48 h foi feita a administração no próximo animal de cada grupo, até completar o número de cinco animais por grupo. Além da dose de 175 mg/kg v.o., todas as substâncias foram administradas na dose de 55 mg/kg v.o da mesma forma, e ainda para DS4AMQ1 e DS4AMQ2 foi utilizada a dose de 99 mg/kg v.o., e DS4AMQ3 e DS4AMQ4 a dose de 310 mg/kg v.o. seguindo o mesmo padrão e utilizando o fator de progressão 4,0 escolhido (**Anexo B e C**). Os animais foram observados nas primeiras 4 h após administração e uma vez ao dia durante 14 dias após o tratamento, realizando a pesagem, analisando e anotando parâmetros de toxicidade, descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Parâmetros de avaliação de animais após a exposição aguda.

| Parâmetro | | Descrição |
|--|-----------------------------|--|
| Estado consciente | Atividade geral | Verificar a locomoção dentro da caixa, bem como o ato de levantar e farejar do animal. |
| | Resposta ao toque | Tocar o animal por 15 segundos e examinar a resposta imediata dele. |
| | Resposta ao aperto da cauda | Apertar a ponta da cauda do animal com pinça e observar a reação do mesmo. |
| | Endireitamento | Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que volta à posição normal. |
| | Força para agarrar | Colocar animal sobre grade e avaliar intensidade em que se segura na mesma. |
| Atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular | Tônus do corpo Auricular | Verificar sua presença ou não e o grau. Estalar os dedos e observar a posição da orelha após o estímulo. |
| | Reflexos Corneal | Aproximar uma pinça até os olhos, sem tocá-los, e observar se o animal os fecha. |
| | Tremores | Observar se estão presentes e qual intensidade. |
| | Convulsões | Observar a presença ou ausência. |
| Atividades sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) | Cauda em straub | Verificar cauda em posição normal ou ereta. |
| | Sedação | Animal sem movimento, mas responde a estímulos. |
| | Anestesia | Animal sem movimento e sem resposta a estímulos. |
| | Ataxia | Movimentos descoordenados. |
| Atividades sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) | Lacrimação | Observar se está presente e o grau. |
| | Cianose | Pele azulada. |
| | Ptose | Olho fechado, pálpebras caídas. |
| | Salivação | Observar se está presente e o grau. |
| | Piloereção | Pêlos erguidos. |

Fonte: Traesel, 2014.

Quando os três primeiros animais chegaram a óbito ou foi necessária a eutanásia, não foi administrado a substância nos dois animais restantes, e logo após foram retirados

os órgãos como: cérebro, coração, rins, pulmão, fígado, baço e estômago, para análise macroscópica e histopatológica. Os animais sobreviventes tiveram seus órgãos retirados no 15º dia.

No caso da eutanásia ter sido realizada foram seguidas as normas indicadas pela metodologia, como descrito na **Tabela 3**, baseada em sinais de dor e sofrimento significativos para os animais, impedindo casos de dor, sofrimento e angústia.

Tabela 3 – Sinais críticos de dor e sofrimento para animais após exposição aguda.

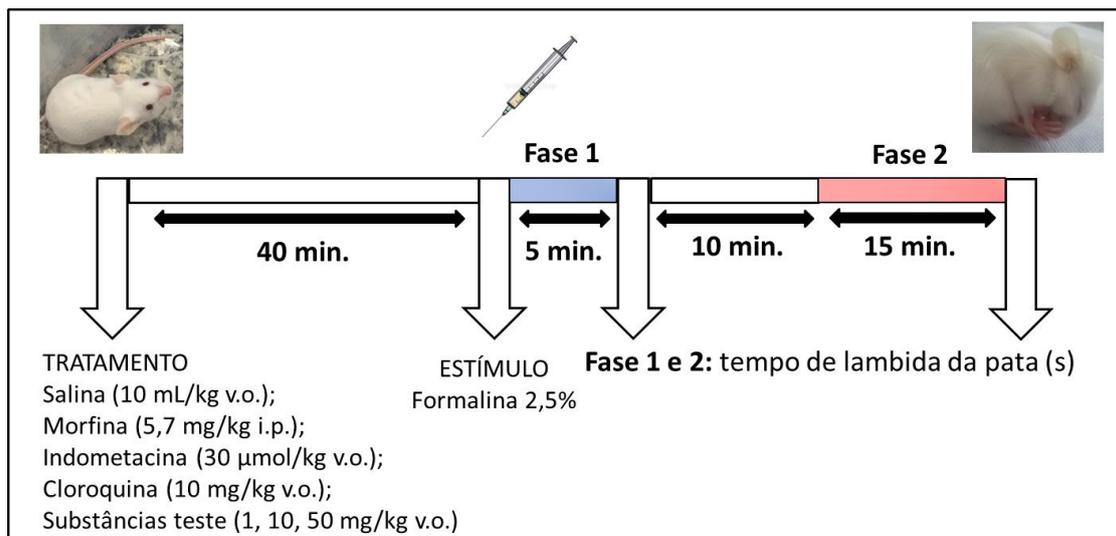
| Sinais de sofrimento e dor | |
|---------------------------------------|--|
| Vocalização anormal | Dificuldades na respiração |
| Agressividade anormal | Ulceração da córnea |
| Postura anormal | Fraturas ósseas |
| Reação anormal ao manuseio | Relutância em se mover |
| Movimentos anormais | Aparência externa anormal |
| Trauma auto-induzido | Perda rápida de peso, emagrecimento, ou desidratação grave |
| Feridas abertas ou ulcerações na pele | Sangramento significativo |

Fonte: Adaptado de HUMANE ENDPOINTS - OECD. 2016. Disponível em <<https://www.humane-endpoints.info/en/oecd>> Acesso em: 05 Set. 2018.

3.5.2 Ensaio de nocicepção induzida por formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987)

Os animais distribuídos em 16 grupos (n = 6) foram tratados com solução salina (controle negativo, 10 mL/kg, v.o.); Morfina (controle positivo da fase 1, 5,7 mg/kg, i.p.); Indometacina (controle positivo da fase 2, 30 µmol/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.) e as substâncias teste (DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 e DS4AMQ4) nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg v.o. O ensaio foi realizado a partir da administração de DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4 e dos padrões negativos e positivos, e após 40 minutos foi administrado 20 µL de formalina 2,5% por via intraplantar na face dorsal da pata traseira do animal. Após a administração da formalina, o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata foi cronometrado, sendo este um critério indicativo de nocicepção, este registro do tempo se estabeleceu em dois períodos: 1ª fase (0-5 minutos) e 2ª fase (15-30 minutos), que são respectivamente relacionadas à dor neurogênica ou aguda e à dor inflamatória, como demonstrado na **Figura 9**.

Figura 9 – Esquemática do ensaio de nociceção induzido por formalina



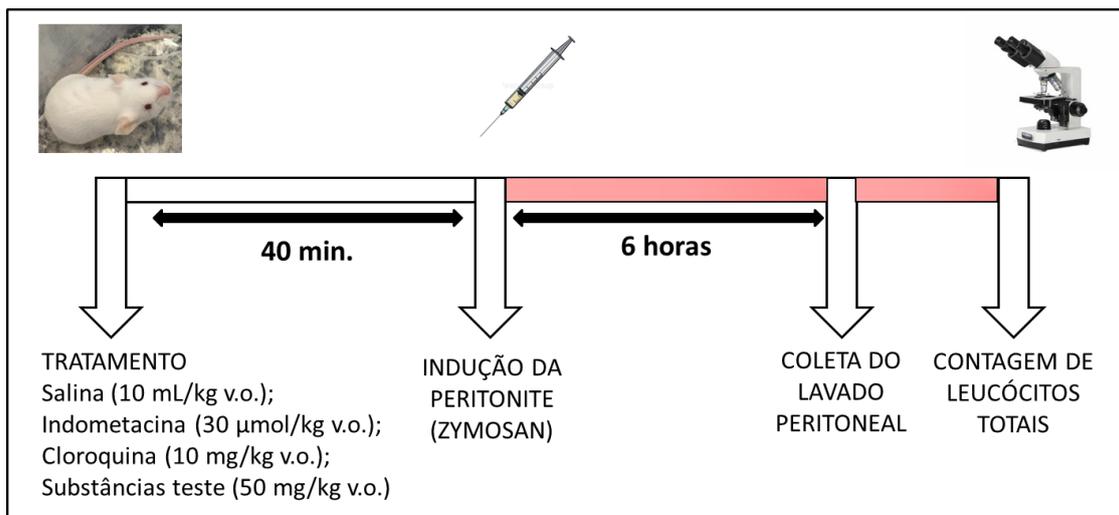
Fonte: Autor, 2019.

3.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

3.5.3.1 Ensaio de peritonite induzida por Zymosan (DOHERTY et al., 1985)

Os animais serão divididos em 7 grupos (n = 6) e pré-tratados com: Indometacina (30 µmol/Kg, v.o.); salina (10 mL/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); e os grupos tratados com DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3 na dose de 50 mg/kg, v.o. Após 40 minutos foi administrado 250 µL (10 mg/mL) de solução estéril de Zymosan na cavidade peritoneal dos animais. Decorrido 6 horas da administração de Zymosan, os animais foram eutanasiados e foi coletado o lavado peritoneal após injeção na cavidade de 3 mL de HANKS (HBSS, livre de Ca_2^+ e Mg_2^+) (**Figura 10**). A partir do lavado peritoneal foi realizada a contagem dos leucócitos totais presentes no exsudato. Para isso, a amostra foi diluída em azul de Tripán (1:20), e a contagem realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 10x.

Figura 10 – Esquemática do ensaio de peritonite induzida por Zymosan



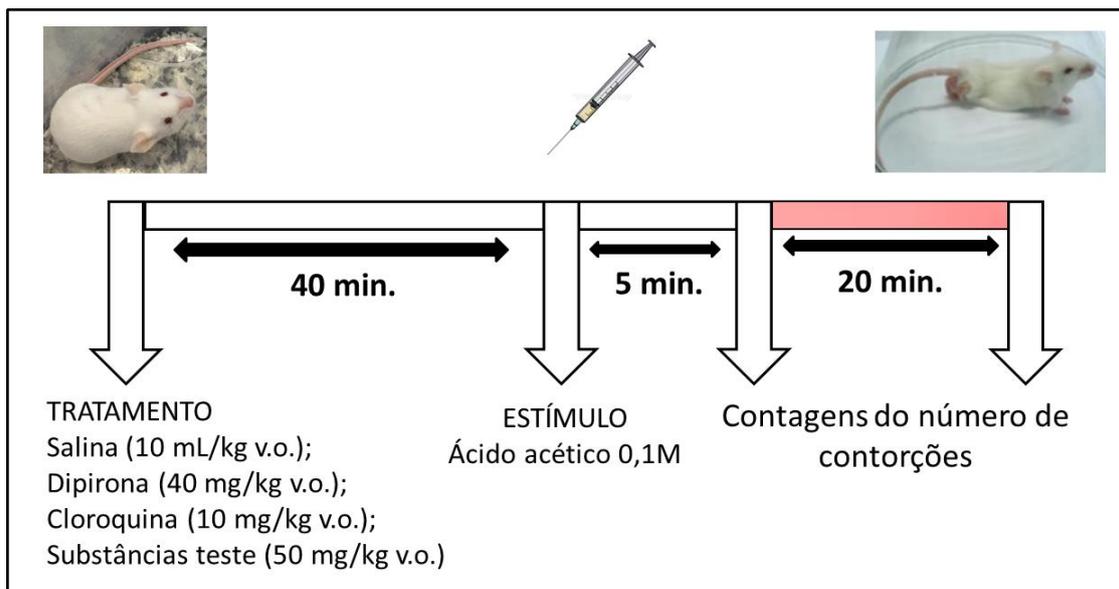
Fonte: Autor, 2019.

3.5.4 Avaliação da atividade antinociceptiva

3.5.4.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético (COLLIER et al, 1968)

Os animais foram distribuídos em 6 grupos ($n = 6$) e tratados 40 minutos antes da administração do ácido acético 0,1M, com solução salina (controle negativo, 10 mL/kg, v.o.); Dipirona (controle positivo, 40 mg/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.) e DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). Após os 40 minutos foi administrado ácido acético 0,1M (na dose de 0,1 mL/10g, i.p). As contorções foram contabilizadas 5 minutos após a administração do ácido acético, por um período de 20 minutos como demonstra a **Figura 11**.

Figura 11 – Esquemática do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

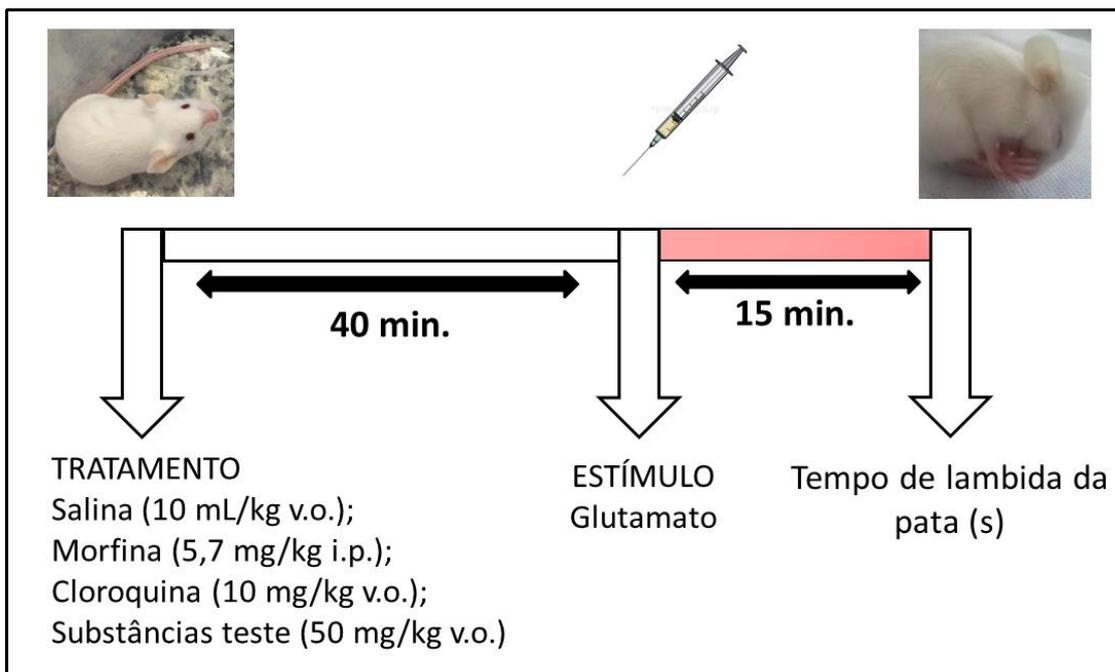


Fonte: Autor, 2019.

3.5.4.2 Ensaio de nociceção induzida por glutamato (BEIRITH et al., 2002)

Os animais serão distribuídos em 6 grupos ($n = 6$) onde serão pré-tratados com solução salina (controle negativo, 10 mL/kg, v.o.); Morfina (controle positivo, 5,7 mg/kg, i.p.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); e substâncias testes (DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3) na dose de 50 mg/kg, v.o. O ensaio foi realizado a partir da administração das substâncias teste e dos padrões negativo e positivo, e após 40 minutos foi administrado 20 μ L de glutamato (30 μ mol/pata) por via intraplantar na face dorsal da pata traseira do animal (**Figura 12**). O tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata foi cronometrado durante 15 minutos após a administração do glutamato. Este é o tempo considerado como o indicativo de dor.

Figura 12 – Esquemática do ensaio de nociceção induzida por glutamato

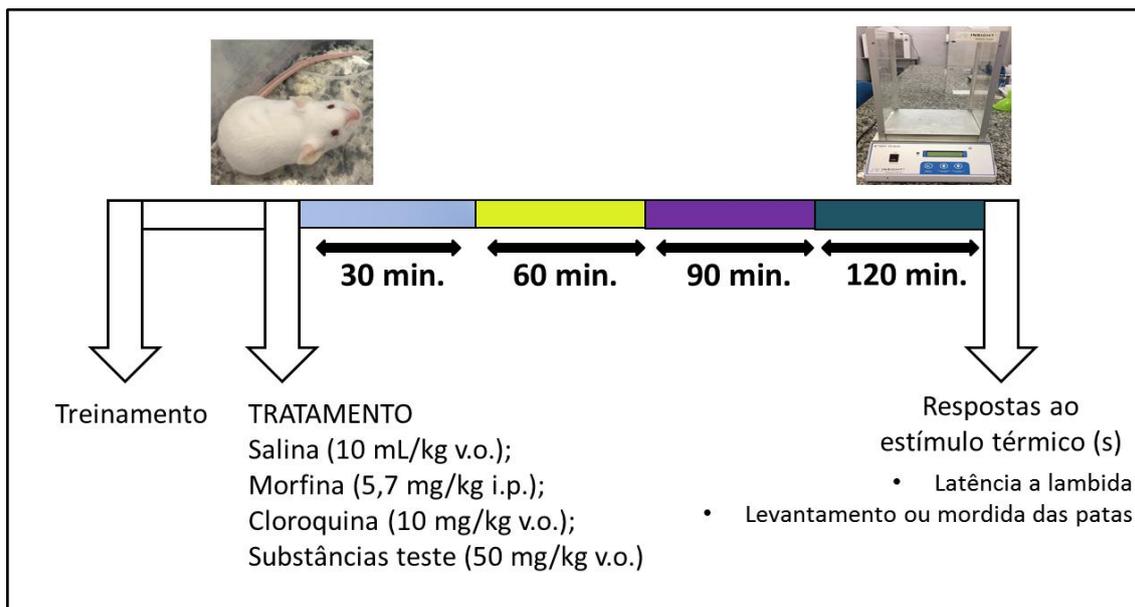


Fonte: Autor, 2019.

3.5.4.3 Ensaio da placa quente (KURAISHI et al., 1983)

Os animais foram distribuídos em 6 grupos ($n = 6$) e tratados com solução salina (controle negativo, 10mL/kg, v.o.); Morfina (controle positivo, 5,7 mg/kg, i.p.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.) e as substâncias teste (DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3) na dose de 50 mg/kg, v.o. Após um intervalo de 30 minutos os animais foram colocados em uma placa aquecida a $54 \pm 1,0$ °C e suas respostas ao estímulo térmico cronometradas (em segundos) como a latência à lambida, levantamento ou mordida em uma de suas patas dianteiras ou traseiras, onde o tempo de latência do animal foi registrado em intervalos de 30 minutos durante 2 horas. Para isto, foi realizada uma pré-seleção com os animais, no qual foi registrada uma medida antes da administração dos tratamentos, estabelecendo-se o tempo de corte (máximo de permanência do animal na placa) de 15 segundos (**Figura 13**).

Figura 13 – Esquemática do ensaio da placa quente



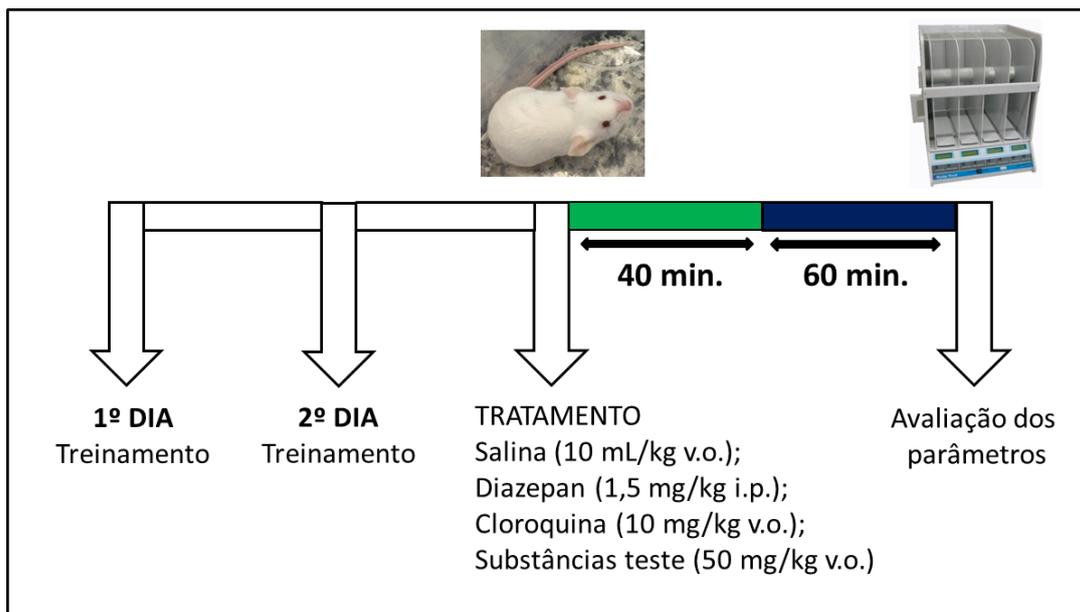
Fonte: Autor, 2019.

3.5.5 Avaliação da performance motora

3.5.5.1 Ensaio da Barra Giratória (DUNHAM; MIYA, 1957)

A fim de descartar qualquer comprometimento motor, este ensaio foi realizado a partir da pré-seleção dos animais baseados em duas sessões de treino 24 e 48 horas antes do ensaio, com base na sua capacidade de permanecer em uma barra anti-derrapante, com 3,0 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento, girando a 16 rpm, a uma altura de 25 cm, durante 4 minutos. No 3º dia, os seis grupos de animais pré-selecionados (n = 6) tratados com: salina (controle negativo, 10 mL/kg, v.o.); Diazepam (controle positivo, 1,5 mg/kg, i.p.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.) e substâncias teste (DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3) na dose de 50 mg/kg v.o. Todos os animais tratados com os DS4AMQs juntamente com a Cloroquina, quarenta minutos após a administração v.o., e aqueles tratados com Diazepam sessenta minutos após a administração i.p., foram colocados sobre a barra, onde então foram registrados o número de quedas e a latência à queda (em segundos) num tempo máximo de 4 minutos (**Figura 14**).

Figura 14 – Esquemática do ensaio da barra giratória



Fonte: Autor, 2019.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos serão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e as diferenças estatísticas entre as médias dos grupos foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. Os valores dos resultados foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism[®] versão 7.

A obtenção dos valores de Dose Letal Média (DL50) foram calculados através da construção das curvas dose-resposta tóxica em tabela em Microsoft[®] Office Excel 2013, a partir do modelo criado por Probits Analyses, com limite de confiança de 95%.

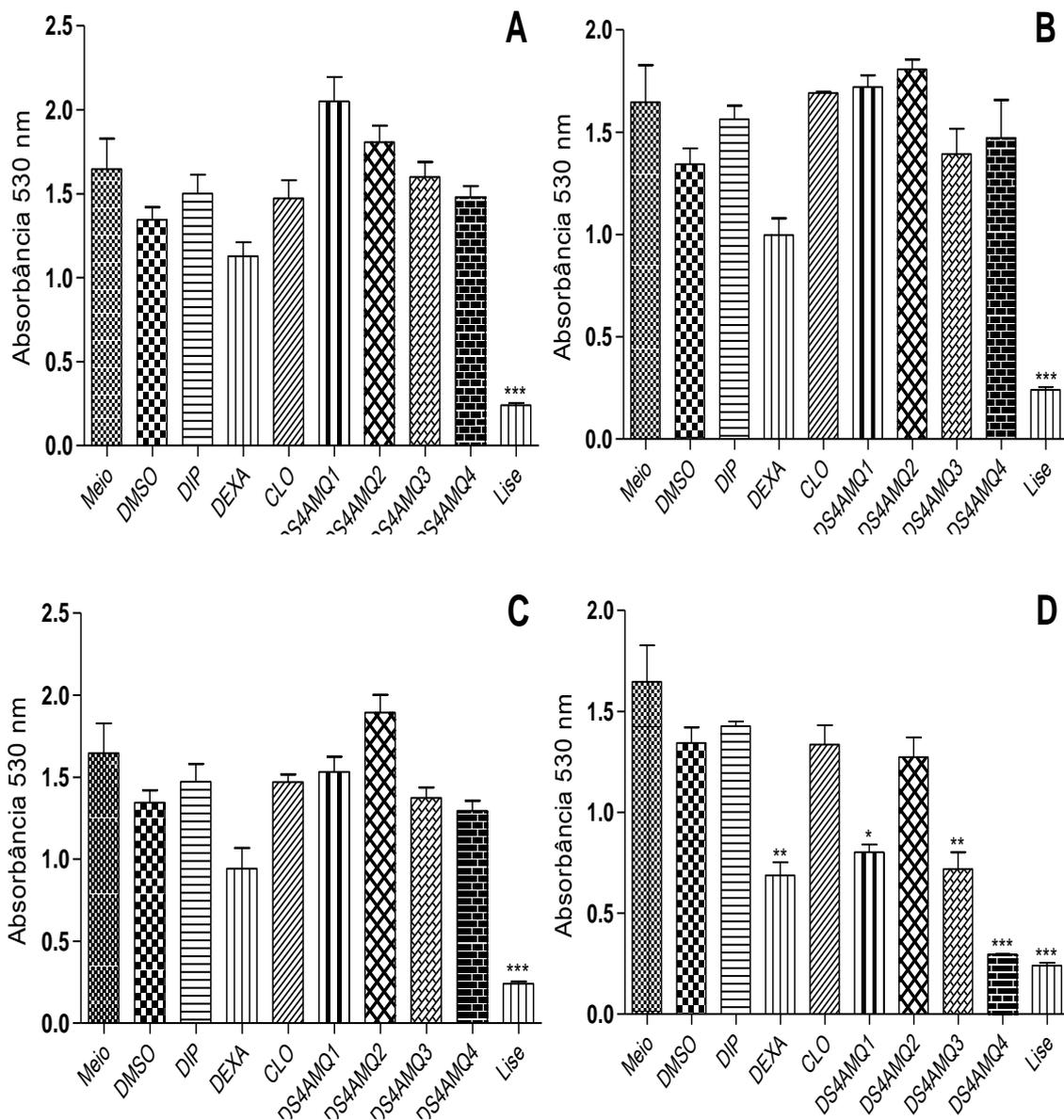
4. RESULTADOS

4.1 Ensaio *in vitro*

4.1.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

O **Gráfico 1** mostra o efeito dos derivados sintéticos 4-aminoquinolínicos (DS4AMQs) em diferentes concentrações no ensaio de viabilidade celular a partir do método colorimétrico de MTT. No **Gráfico 1A** é possível observar o efeito dos DS4AMQs na concentração de 0,1 μM , enquanto nos **Gráficos 1B, 1C e 1D** a concentração dos derivados foi de 1, 10 e 100 μM , respectivamente. Neles é possível observar que não houve redução significativa da viabilidade das células em comparação com o grupo controle (Meio) nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM , porém na concentração de 100 μM os derivados DS4AMQ1, DS4AMQ3 e DS4AMQ4 apresentaram redução estatisticamente significativa da viabilidade celular (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sendo assim, pode-se dizer que DS4AMQ2 em nenhuma de suas doses testadas apresentou citotoxicidade. A dexametasona, um glicocorticoide com ação anti-inflamatória, utilizado amplamente no mercado, foi escolhida como fármaco padrão neste teste e apresentou citotoxicidade significativa (** $p < 0,01$) na concentração de 100 μM , como pode ser observado no **Gráfico 1D**. Nas outras concentrações, dexametasona não mostrou nenhum efeito citotóxico significativo, ou seja, não houve interferências na viabilidade das células.

Gráfico 1 - Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4, Dipirona, Dexametasona e Cloroquina (todos nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 μ M) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: **A** – Efeito dos DS4AMQs, Cloroquina, Dexametasona e Dipirona no ensaio de MTT na concentração de 0,1 μ M; **B** – Efeito dos DS4AMQs, Cloroquina, Dexametasona e Dipirona no ensaio de MTT na concentração de 1 μ M; **C** – Efeito dos DS4AMQs, Cloroquina, Dexametasona e Dipirona no ensaio de MTT na concentração de 10 μ M; **D** – Efeito dos DS4AMQs, Cloroquina, Dexametasona e Dipirona no ensaio de MTT na concentração de 100 μ M. Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle (Meio) através de uma Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A Concentração Letal Mediana (CL50), que corresponde a concentração média capaz de causar morte celular, foi calculada juntamente com a toxicidade máxima em porcentagem (%), correspondente a quantidade de morte celular na maior concentração utilizada (100 μM), dos DS4AMQs e fármacos padrão testados como controle, Dipirona, Dexametasona e Cloroquina, como observa-se na **Tabela 4**. De acordo com as concentrações testadas, Dipirona, Cloroquina e DS4AMQ1 obtiveram CL50 e citotoxicidade superior a concentração máxima testada (100 μM). Um dos fármacos padrão testado, dexametasona, demonstrou CL50 igual a $86,5 \pm 13,4 \mu\text{M}$ (concentração que causa 50% de inibição do crescimento de macrófagos) e citotoxicidade máxima de $53,5 \pm 2,8\%$. Dentre os DS4AMQs, DS4AMQ2 demonstrou-se com CL50 superior a 100 μM , porém sua citotoxicidade máxima correspondeu a $40,3 \pm 4,9\%$, DS4AMQ3 teve sua CL50 de $94 \pm 1,4 \mu\text{M}$ e toxicidade máxima de $52,7 \pm 1,5\%$, e DS4AMQ4 CL50 igual a $67,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $77,9 \pm 0,1\%$ de toxicidade máxima.

Tabela 4 - Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4, Dipirona, Dexametasona e Cloroquina (todos nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 μM) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT.

| Substâncias | CL50 ($\mu\text{M} \pm \text{E.P.M.}$) ^a | Citotoxicidade Máxima (% $\pm \text{E.P.M.}$) ^b |
|--------------|---|---|
| Dipirona | >100 | NT |
| Dexametasona | $86,5 \pm 13,4$ | $53,5 \pm 2,8^{**}$ |
| Cloroquina | >100 | NT |
| DS4AMQ1 | >100 | $40,3 \pm 4,9^*$ |
| DS4AMQ2 | >100 | NT |
| DS4AMQ3 | $94 \pm 1,4$ | $52,7 \pm 1,5^{**}$ |
| DS4AMQ4 | $67,4 \pm 0,5$ | $77,9 \pm 0,1^{***}$ |

Fonte: Autor, 2019.

Notas: Os resultados referem-se a: a – a Concentração Letal de 50% (CL50) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. b – Média \pm erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

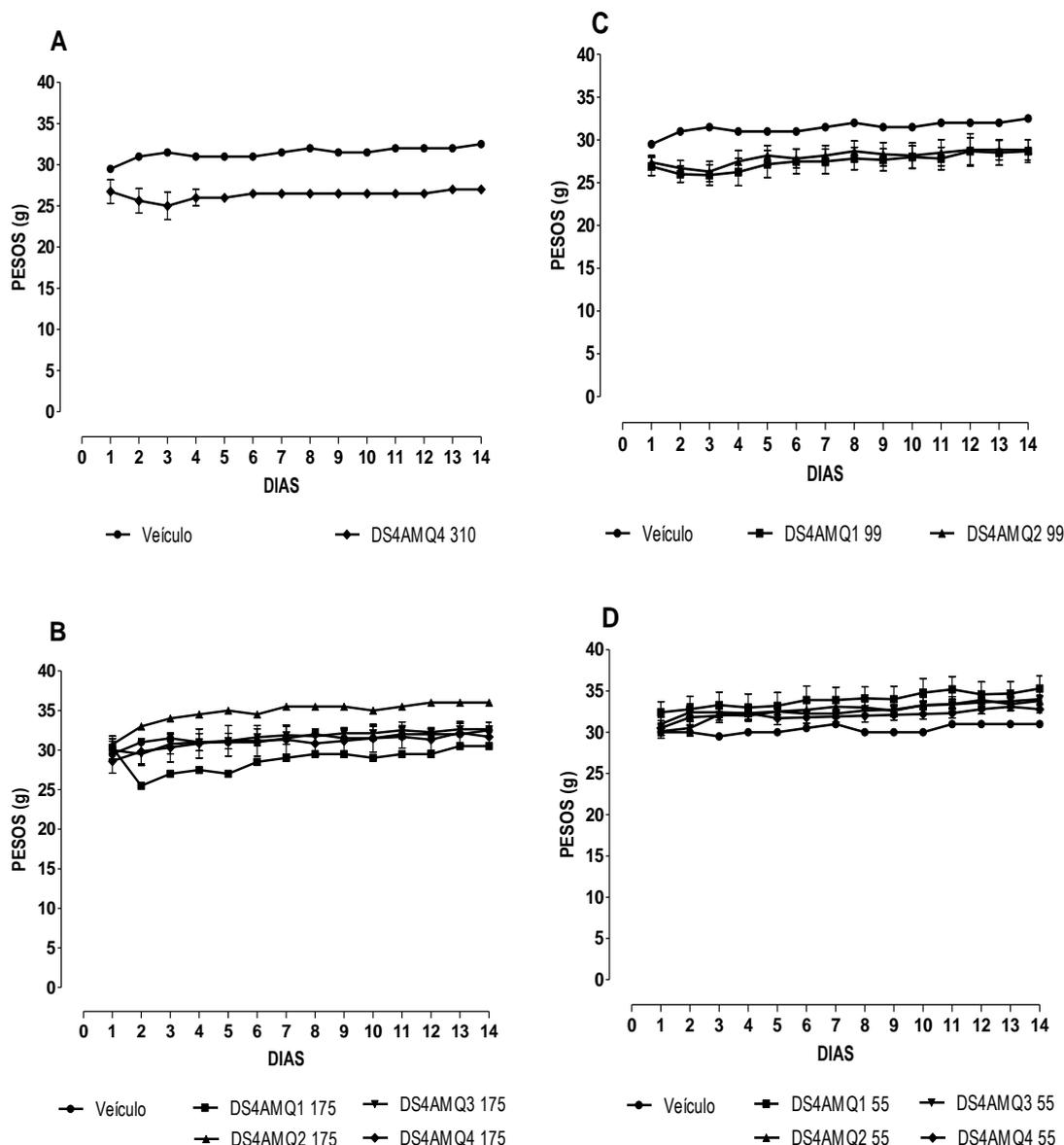
NT: Não determinado Citotoxicidade máxima para células até a concentração de 100 μM em comparação com o grupo DMSO.

4.2 Ensaio *in vivo*

4.2.1 Teste de toxicidade aguda por via oral – “*Up-and-Down-Procedure*”

O **Gráfico 2** mostra a variação do peso dos animais a partir do primeiro dia de administração dos DS4AMQs, até o 14º dia, pode-se observar que não houve nenhuma variação estatisticamente significativa com relação ao peso dos animais que não vinheram a óbito ou foram eutanasiados. O **Gráfico 2A**, está relacionado a dose de 310 mg/kg v.o. da substância DS4AMQ4, o **Gráfico 2B** demonstra os DS4AMQs na dose de 175 mg/kg v.o., o **Gráfico 2C**, mostra as substâncias DS4AMQ1 e DS4AMQ2 na dose de 99 mg/kg v.o., e o **Gráfico 2D** mostra todos DS4AMQs na dose de 55 mg/kg v.o. DS4AMQ4 na dose de 310 mg/kg não aparece no gráfico pois houve óbito ou eutanásia de todos os animais pertencentes a este grupo, nas primeiras horas após administração.

Gráfico 2 – Variação de peso dos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs nas doses de 310, 175, 99 e 55 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: **A** – Peso dos animais após a administração de DS4AMQ4 na dose de 310 mg/kg v.o.; **B** – Peso dos animais após a administração dos DS4AMQs na dose de 175 mg/kg v.o.; **C** – Peso dos animais após a administração de DS4AMQ1 e DS4AMQ2 na dose de 99 mg/kg v.o.; **D** – Peso dos animais após a administração dos DS4AMQs na dose de 55 mg/kg v.o. Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos tratados comparados ao veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.) através de uma Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet.

A **Tabela 5** mostra as reações tóxicas que os animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs na dose inicial de 175 mg/kg, e doses correspondentes em μ mol/kg,

de acordo com o tempo em que apareceram os sinais referente ao animal testado e se este foi eutanasiado ou veio a óbito e em qual dia do experimento. Com a administração da dose de DS4AMQ1, correspondente a 807,68 $\mu\text{mol/kg}$, apenas um animal sobreviveu aos 15 dias de teste, apresentando apenas sedação, quatro animais apresentaram tremores, convulsões, cauda em straub, ataxia e piloereção, e um deles disфонia, sendo necessária a eutanásia desses animais. Na administração da dose de DS4AMQ2, correspondente a 739,49 $\mu\text{mol/kg}$, três animais precisaram ser eutanasiados e um veio a óbito, devido aos sintomas de intoxicação. Os efeitos mais frequentes foram: tremores; convulsões; ataxia e piloereção. Apenas um animal sobreviveu todo o teste de toxicidade (15 dias), apresentando apenas sedação.

A substância DS4AMQ3, dose correspondente a 579,84 $\mu\text{mol/kg}$, teve apenas uma eutanásia, em que o animal apresentou sedação, letargia, disфонia, ptose e perda de peso 24 horas após a administração. Dos outros animais dois apresentaram sedação e dois, nenhum efeito tóxico, tendo quatro animais que sobreviveram todo o experimento. Com a administração de DS4AMQ4, dose correspondente a 789,39 $\mu\text{mol/kg}$, dois animais foram eutanasiados devido aos efeitos tóxicos de tremores, convulsões, ataxia, cianose, cauda em straub e piloereção. Um animal apresentou sedação e outros dois, nenhum efeito tóxico, sobrevivendo aos 15 dias de teste.

A dose de 99 mg/kg de DS4AMQ1 456,92 $\mu\text{mol/kg}$ e DS4AMQ2 418,34 $\mu\text{mol/kg}$, apresentou sinais de toxicidade em dois animais que foram posteriormente eutanasiados e três animais sobreviveram, para cada grupo de substâncias. Os animais eutanasiados que receberam DS4AMQ1 apresentaram perda de peso, ataxia e tremores, e DS4AMQ2 perda de peso e tremores (**Tabela 6**).

A substância DS4AMQ3 foi administrada na dose de 310 mg/kg, correspondente a 1.027,14 $\mu\text{mol/kg}$, e causou logo nos primeiros minutos tremores, convulsão, ataxia, cauda em straub, piloereção e disфонia, realizando-se a eutanásia dos três animais testados. DS4AMQ4 também foi administrada na dose de 310 mg/kg, correspondente a 1.398,35 $\mu\text{mol/kg}$, e demonstrou perda de peso em três animais, que foram eutanasiados. Dois animais sobreviveram sem nenhum sinal de toxicidade até o 15º dia (**Tabela 6**).

A dose de 55 mg/kg, correspondente a DS4AMQ1 253,84 $\mu\text{mol/kg}$; DS4AMQ2 232,41 $\mu\text{mol/kg}$; DS4AMQ3 182,23 $\mu\text{mol/kg}$ e DS4AMQ4 225,54 $\mu\text{mol/kg}$, não desenvolveu, nos animais, nenhum efeito tóxico, e estes sobreviveram normalmente até o 15º dia quando foi realizada a eutanásia, com exceção de um animal que recebeu a

substância DS4AMQ3, este apresentou sinais de bradicardia, piloereção, letargia e perda de peso 24 horas após a administração, quando foi realizada a eutanásia.

Tabela 5 - Reações tóxicas apresentadas pelos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs na dose de 175 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral.

| Dose/ Substância | Animal | Reações Tóxicas | Início das Reações | Óbito/ Eutanásia/Dia |
|---|---------------|---|-------------------------------|---------------------------------|
| 175 mg/kg DS4AMQ1 807,68 µmol/kg | I | Sedação. | 10 min. | Eutanásia/15° |
| | II | Tremores; Convulsões; Cauda em straub Ataxia; Piloereção. | 60 min. | Eutanásia/1° |
| | III | Tremores; Convulsões; Cauda em straub, Ataxia; Piloereção. | 15 min. | Eutanásia/1° |
| | IV | Tremores; Convulsões; Cauda em straub; Ataxia; Piloereção. | 5 min. | Eutanásia/1° |
| | V | Tremores; Convulsões; Cauda em straub; Ataxia; Pilorerção; Difonia. | 4 min. | Eutanásia/1° |
| 175 mg/kg DS4AMQ2 739,49 µmol/kg | I | Tremores; Convulsões; Ataxia; Cianose. | 5 min. | Óbito/1° |
| | II | Sedação. | 15 min. | Eutanásia/15° |
| | III | Tremores; Convulsões; Ataxia; Piloereção. | 30 min. | Eutanásia/1° |
| | IV | Tremores; Convulsões; Ataxia; Piloereção. | 30 min. | Eutanásia/1° |
| | V | Tremores; Convulsões; Ataxia; Cauda em straub. | 11 min. | Eutanásia/1° |
| 175 mg/kg DS4AMQ3 579,84 µmol/kg | I | Sedação; Letargia; Disfonia; Ptose; Perda de peso. | 24 h. | Eutanásia/2° |
| | II | Sedação. | 10 min. | Eutanásia/15° |
| | III | Sedação. | 50 min. | Eutanásia/15° |
| | IV | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | V | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| 175 mg/kg DS4AMQ4 789,39 µmol/kg | I | Tremores; Convulsões; Ataxia; Cianose; Piloereção. | 15 min. | Eutanásia/1° |
| | II | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | III | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | IV | Tremores; Convulsões; Ataxia; Cauda em straub; Piloereção. | 50 min. | Eutanásia/1° |
| | V | Sedação. | 23 min. | Eutanásia/15° |

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 6 - Reações tóxicas apresentadas pelos animais submetidos ao tratamento com os DS4AMQs nas doses de 99 e 310 mg/kg, do teste de toxicidade aguda por via oral.

| Dose/ Substância | Animal | Reações Tóxicas | Início das Reações | Óbito/ Eutanásia/Dia |
|---|---------------|---|-------------------------------|---------------------------------|
| 99 mg/kg DS4AMQ1 456,92 µmol/kg | I | Ataxia; Perda de peso. | 1 hora. | Eutanásia/3° |
| | II | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | III | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | IV | Tremores; Perda de peso. | 10 min. | Eutanásia/2° |
| | V | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| 99 mg/kg DS4AMQ2 418,34 µmol/kg | I | Perda de peso. | - | Eutanásia/ 2° |
| | II | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | III | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | IV | Tremores; Perda de peso. | 22 min. | Eutanásia/2° |
| | V | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| 310 mg/kg DS4AMQ3 1.027,14 µmol/kg | I | Tremores; Convulsão; Ataxia; Cauda em straub; Piloereção; Disfonia. | 19 min. | Eutanásia/1° |
| | II | Tremores; Convulsão; Ataxia; Cauda em straub; Piloereção; Disfonia. | 4 min. | Eutanásia/1° |
| | III | Tremores; Convulsão; Ataxia; Cauda em straub; Piloereção; Disfonia. | 3 min. | Eutanásia/1° |
| 310 mg/kg DS4AMQ4 1.398,35 µmol/kg | I | Perda de peso. | - | Eutanásia/3° |
| | II | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | III | Perda de peso. | - | Eutanásia/3° |
| | IV | Nenhum efeito tóxico. | - | Eutanásia/15° |
| | V | Perda de peso. | - | Eutanásia/3° |

Fonte: Autor, 2019.

Na **Tabela 7** são demonstrados os valores da Dose Letal Média (DL50) capaz de matar 50% de um grupo de animais testado. A substância DS4AMQ3 apresentou uma DL50 menor que 310 mg/kg e maior que 175 mg/kg. As substâncias DS4AMQ1 e DS4AMQ2 tiveram a mesma dose de DL50, ambas com 112,95 mg/kg, e DS4AMQ4 232,95 mg/kg como DL50.

Tabela 7 - Efeito dos compostos DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4 sobre o ensaio de toxicidade aguda por via oral.

| Substâncias | DL ₅₀ (mg/kg) | DL ₅₀ (μmol/kg) |
|-------------|--------------------------|----------------------------|
| DS4AMQ1 | 112,95 | 521,30 |
| DS4AMQ2 | 112,95 | 477,29 |
| DS4AMQ3 | >175 <310,00 | >579,84 <1.027,14 |
| DS4AMQ4 | 232,95 | 1.050,80 |

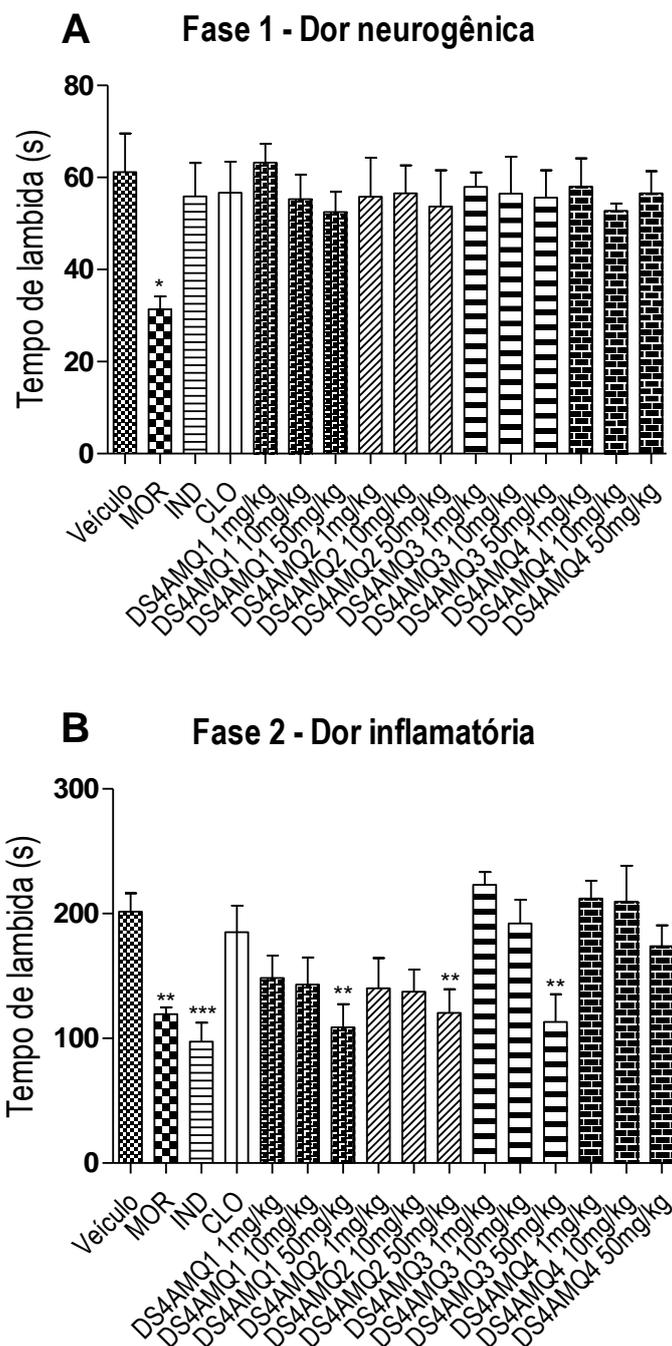
Fonte: Autor, 2019.

Nota: Os resultados de Dose Letal Média (DL50) calculados através da construção das curvas dose-resposta tóxica. Os valores foram calculados usando tabela em Microsoft® Office Excel 2013 através de modelo criado por Probits Analysis. Os limites de confiança correspondem a 95%.

4.2.2 Ensaio de nociceção induzida por formalina

A triagem farmacológica de nociceção e inflamação foi realizada com a indução de formalina (2,5%) na pata dos animais. O **Gráfico 3** mostra o efeito dos DS4AMQs nas dosagens de 1, 10 e 50 mg/kg, diante do ensaio de nociceção induzida por formalina em camundongos, nas fases neurogênica e inflamatória, em comparação com Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.) e fármacos padrão, a partir do tempo em que o animal passou lambendo a pata (em segundos). No **Gráfico 3A** observa-se que os DS4AMQs não foram capazes de reduzir estatisticamente significativa na fase neurogênica, o tempo de lambida da pata em nenhuma das doses administradas. CLO não foi capaz de reduzir estatisticamente o tempo de lambida da pata, apenas a Morfina (MOR, 5,7 mg/kg, i.p.), fármaco padrão utilizado, foi capaz de reduzir estatisticamente o parâmetro avaliado (*p < 0,05), nesta fase. Com relação a fase inflamatória do teste, o **Gráfico 3B** mostra que a única dose de DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3 capaz reduzir estatisticamente o tempo de lambida da pata foi de 50 mg/kg (**p < 0,01). CLO e seu análogo DS4AMQ4 não foram capazes de reduzir estatisticamente o tempo de lambida da pata do animal, e os fármacos padrão MOR e Indometacina (IND, 30 μmol/kg, v.o.) reduziram estatisticamente o tempo de lambida nessa fase inflamatória do ensaio (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Gráfico 3 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nociceção induzida por formalina em camundongos.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: **A** – Fase 1 ou Neurogênica; **B** – Fase 2 ou Inflamatória. Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Morfina (MOR, 5,7 mg/kg, i.p.); Indometacina (IND, 30 μ mol/kg, v.o.); Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4 (1, 10, 50 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m, respectivamente (n = 6). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett.

A **Tabela 8** mostra que o grupo veículo (controle negativo), tratado somente com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mg/kg, v.o.) apresentou tempo de lambida da pata igual a $61,17 \pm 8,43$ na fase neurogênica (fase 1) e $201,6 \pm 14,77$ na fase inflamatória (fase 2). A substância DS4AMQ1 apresenta na dose de 230,76 $\mu\text{mol/kg}$, tempo de lambida da pata igual a $52,51 \pm 4,38$ na fase 1 e $108,80 \pm 18,60$ na fase 2, equivalente a 14,16% e 46,03% de inibição do tempo de lambida da pata respectivamente. 211,28 $\mu\text{mol/kg}$ de DS4AMQ2 foi capaz de inibir 59,67% do parâmetro avaliado, correspondente a $120,30 \pm 19,20$ de tempo de lambida na fase 2. A substância DS4AMQ3 apresentou um tempo de lambida da pata pelo grupo de animais igual a $113,1 \pm 22,19$ e porcentagem de inibição igual a 43,90% na fase 2, com a administração da dose de 165,67 $\mu\text{mol/kg}$.

A Cloroquina demonstrou tempo de lambida igual a $56,67 \pm 6,79$ na fase 1 e $183,30 \pm 22,09$ na fase 2, correspondente a porcentagem de inibição de 7,36% e 9,08%, respectivamente. O fármaco padrão Morfina na fase 1 apresentou $31,37 \pm 2,81$ e na fase 2 $119,30 \pm 5,61$ de tempo de lambida da pata pelo grupo de animais testados, 48,72% e 40,82% em porcentagem de inibição, respectivamente, e Indometacina $95,71 \pm 15,44$ na fase 2, correspondente a um percentual de inibição igual a 52,53%.

Tabela 8 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nociceção induzida por formalina em camundongos.

| Substância | Dose | | Tempo de lambida (s) | | % de inibição | |
|--------------|-------|---------|----------------------|----------------|---------------|--------|
| | mg/kg | µmol/kg | Fase 1 | Fase 2 | Fase 1 | Fase 2 |
| Veículo | 10 | - | 61,17±8,43 | 201,60±14,77 | - | - |
| Morfina | 5,7 | - | 31,37±2,81* | 119,30±5,61** | 48,72 | 40,82 |
| Indometacina | - | 30 | 55,92±7,24 | 95,71±15,44*** | 8,58 | 52,53 |
| Cloroquina | 10 | 31,26 | 56,67±6,79 | 183,30±22,09 | 7,36 | 9,08 |
| | 1 | 4,61 | 63,23±4,09 | 148,40±18,02 | 0 | 26,39 |
| DS4AMQ1 | 10 | 46,15 | 55,32±5,29 | 143,1±21,67 | 9,56 | 29,02 |
| | 50 | 230,76 | 52,51±4,38 | 108,80±18,60** | 14,16 | 46,03 |
| | 1 | 4,23 | 55,83±8,46 | 160,90±16,01 | 8,73 | 20,19 |
| DS4AMQ2 | 10 | 42,26 | 56,56±6,08 | 137,50±17,53 | 7,54 | 31,80 |
| | 50 | 211,28 | 53,69±7,90 | 120,30±19,20** | 1,14 | 59,67 |
| | 1 | 3,31 | 57,94±3,16 | 223,10±10,20 | 5,28 | 0 |
| DS4AMQ3 | 10 | 33,13 | 56,48±8,00 | 192,10±19,00 | 7,67 | 4,71 |
| | 50 | 165,67 | 55,64±5,94 | 113,10±22,19** | 9,04 | 43,90 |
| | 1 | 4,51 | 58,01±6,16 | 212,20±14,11 | 5,17 | 0 |
| DS4AMQ4 | 10 | 45,11 | 52,77±1,63 | 209,50±28,90 | 13,73 | 0 |
| | 50 | 225,54 | 56,57±4,83 | 173,80±16,93 | 7,52 | 13,79 |

Fonte: Autor, 2019.

Nota: Fase 1 ou Neurogênica; Fase 2 ou Inflamatória. Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Morfina (5,7 mg/kg, i.p.); Indometacina (30 µmol/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3, DS4AMQ4 (1, 10, 50 mg/kg, v.o.). A tabela representa a média ± e.p.m, respectivamente (n = 6). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

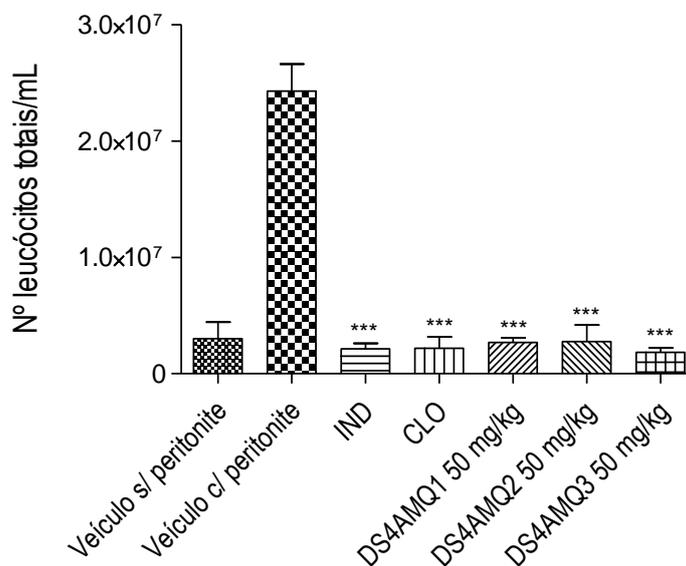
4.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.2.3.1 Ensaio de peritonite induzida por Zymosan

O efeito anti-inflamatório, representado pela quantidade de leucócitos recrutados para região do peritônio, nos camundongos pela indução da peritonite através da administração do Zymosan e os respectivos tratamentos estão descritos no **Gráfico 4**. O fármaco controle utilizado, Indometacina (IND, 30 µmol/kg, v.o.), conseguiu reduzir estatisticamente significativa a quantidade de leucócitos na região (***p < 0,001). A Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.) representou redução estatisticamente significativa

(***p < 0,001) do parâmetro avaliado, fato que também ocorreu com os seus análogos avaliados (***p < 0,001).

Gráfico 4 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de peritonite induzida por Zymosan em camundongos.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Indometacina (IND, 30 µmol/kg, v.o.); Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m, respectivamente (n = 6). ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

De acordo com a **Tabela 9**, Cloroquina conseguiu reduzir 90,98% a peritonite induzida por Zymosan nos camundongos, com um número de $2,19 \times 10^6 \pm 9,64 \times 10^5$ leucócitos totais por mL. Os análogos da Cloroquina, DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3 inibiram a peritonite respectivamente 88,92%, 88,60% e 92,47% e número de $2,69 \times 10^6 \pm 3,96 \times 10^5$, $2,77 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$, $1,83 \times 10^6 \pm 3,85 \times 10^5$ leucócitos totais por mL. A Indometacina apresentou um número de $2,14 \times 10^6 \pm 4,81 \times 10^5$ leucócitos totais por mL e uma porcentagem de inibição de 91,18%.

Tabela 9 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de peritonite induzida por Zymosan em camundongos.

| Substância | Dose | | Nº de leucócitos totais/mL | % de inibição |
|--------------|-------|---------|---|---------------|
| | mg/kg | µmol/kg | | |
| Veículo | 10 | - | $2,14 \times 10^7 \pm 2,32 \times 10^6$ | - |
| Indometacina | - | 30 | $2,14 \times 10^6 \pm 4,81 \times 10^5$ *** | 91,18 |
| Cloroquina | 10 | 31,26 | $2,19 \times 10^6 \pm 9,64 \times 10^5$ *** | 90,98 |
| DS4AMQ1 | 50 | 230,76 | $2,69 \times 10^6 \pm 3,96 \times 10^5$ *** | 88,92 |
| DS4AMQ2 | 50 | 211,28 | $2,77 \times 10^6 \pm 1,42 \times 10^6$ *** | 88,60 |
| DS4AMQ3 | 50 | 165,67 | $1,83 \times 10^6 \pm 3,85 \times 10^5$ *** | 92,47 |

Fonte: Autor, 2019.

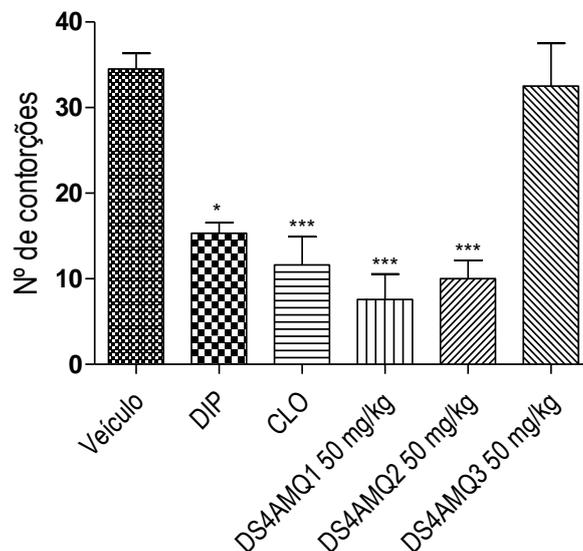
Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Dipirona (40 mg/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). A tabela representa a média \pm e.p.m, respectivamente (n = 6). ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

4.2.4 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.2.4.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

O **Gráfico 5** mostra os efeitos dos DS4AMQs (50 mg/kg, v.o.) em relação a Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.) e ao fármaco controle Dipirona (DIP, 40 mg/kg, v.o.) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. O controle DIP foi capaz de reduzir estatisticamente (*p < 0,05) o número de contorções abdominais causadas pela administração do ácido acético (0,1 M). CLO e seus análogos DS4AMQ1 e DS4AMQ2 também reduziram o parâmetro avaliado (***p < 0,001). A substância DS4AMQ3 não foi capaz de reduzir estatisticamente o número de contorções.

Gráfico 5 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Dipirona (DIP, 40 mg/kg, v.o.); Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m, respectivamente (n = 6). *p < 0,05; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

O grupo que recebeu tratamento apenas com o veículo salina (NaCl 0,9%, 10mg/kg) apresentou um número de contorções igual a $34,50 \pm 1,85$. A dipirona, fármaco padrão utilizado, apresentou $15,33 \pm 1,20$ como número de contorções e 55,57% de porcentagem de inibição deste. Os análogos da cloroquina apresentaram DS4AMQ1 com 77,97% de inibição do número de contorções que foi igual a $7,60 \pm 2,94$, DS4AMQ2 com 71,02% de inibição e número de contorções igual a $10,00 \pm 2,16$, e DS4AMQ3 $32,50 \pm 5,02$ e porcentagem de inibição de 5,80%. A cloroquina apresentou número de contorções de $11,60 \pm 3,33$, com porcentagem de inibição desse número de 66,38% (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

| Substância | Dose | | Nº de contorções | % de inibição |
|------------|-------|---------|------------------|---------------|
| | mg/kg | µmol/kg | | |
| Veículo | 10 | - | 34,50±1,85 | - |
| Dipirona | 40 | - | 15,33±1,20* | 55,57 |
| Cloroquina | 10 | 31,26 | 11,60±3,33*** | 66,38 |
| DS4AMQ1 | 50 | 230,76 | 7,60±2,94*** | 77,97 |
| DS4AMQ2 | 50 | 211,28 | 10,00±2,16*** | 71,02 |
| DS4AMQ3 | 50 | 165,67 | 32,50±5,02 | 5,80 |

Fonte: Autor, 2019.

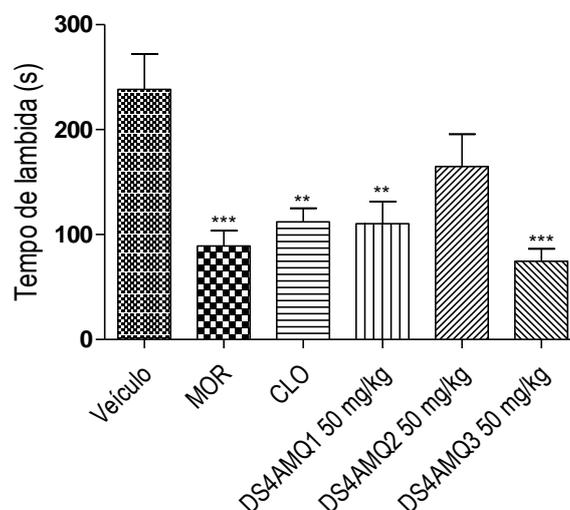
Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Dipirona (40 mg/kg, v.o.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). A tabela representa a média ± e.p.m, respectivamente (n = 6). *p < 0,05; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

4.2.4.2 Ensaio de nocicepção induzido por glutamato

O ensaio de nocicepção induzido por glutamato (30 µmol/pata) está exposto no **Gráfico 6**. Morfina (MOR, 5,7 mg/kg, i.p.) utilizada como fármaco padrão apresentou redução estatística do tempo de lambida da pata dos animais deste grupo (***p < 0,001). Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.) e dois de seus análogos (DS4AMQ1 e DS4AMQ3, 50 mg/kg, v.o.) foram capazes de reduzir estatisticamente o parâmetro avaliado neste ensaio (**p < 0,01; ***p < 0,001). Apenas o análogo DS4AMQ2 não reduziu o tempo de lambida da pata pelos animais, estatisticamente.

A **Tabela 11** mostra que a cloroquina teve uma porcentagem de inibição do número de lambidas da pata (112,20±12,95) pelos animais de 52,92%. A morfina, fármaco padrão, demonstrou 62,58% de inibição do número de lambidas da pata que foi igual a 89,18±14,54. O grupo referente ao controle negativo (veículo – salina, NaCl 0,9%, 10mg/kg) apresentou um número de tempo de lambida da pata igual a 238,30±33,70. Os análogos da cloroquina DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 apresentaram 110,40±20,89, 164,80±30,87, 74,63±11,76 de tempo de lambida da pata, e 53,67%, 30,84% e 68,68% de porcentagem de inibição, respectivamente.

Gráfico 6 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nociceção induzida por glutamato em camundongos.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Morfina (MOR, 5,7 mg/kg, i.p.); Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m, respectivamente (n = 6). **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Tabela 11 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio de nociceção induzida por glutamato em camundongos.

| Substância | Dose | | Tempo de lambida (s) | % de inibição |
|------------|-------|---------|----------------------|---------------|
| | mg/kg | µmol/kg | | |
| Veículo | 10 | - | 238,30±33,70 | - |
| Morfina | 5,7 | - | 89,18±14,54*** | 62,58 |
| Cloroquina | 10 | 31,26 | 112,20±12,95** | 52,92 |
| DS4AMQ1 | 50 | 230,76 | 110,40±20,89** | 53,67 |
| DS4AMQ2 | 50 | 211,28 | 164,80±30,87 | 30,84 |
| DS4AMQ3 | 50 | 165,67 | 74,63±11,76*** | 68,68 |

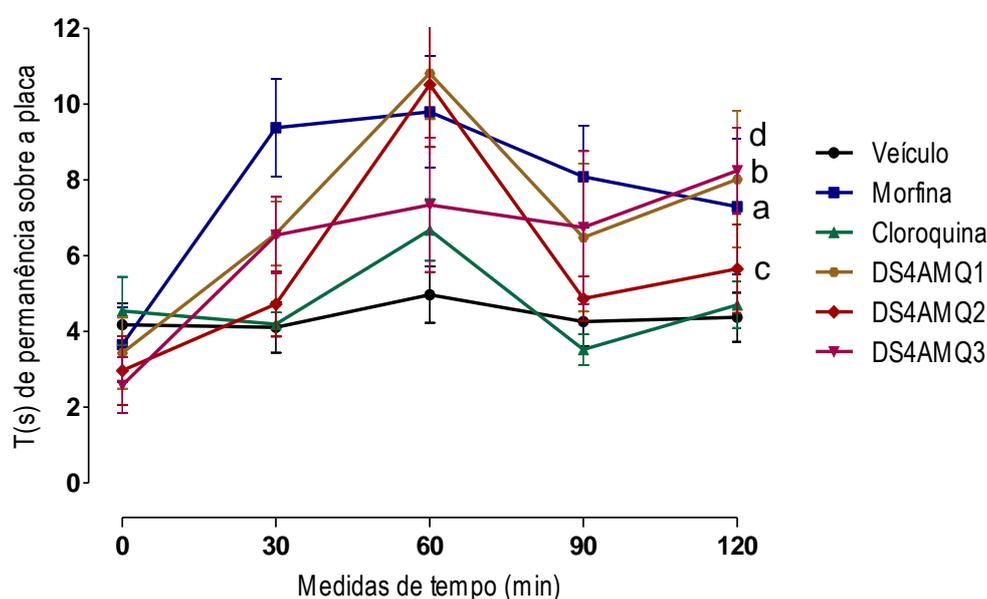
Fonte: Autor, 2019.

Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Morfina (5,7 mg/kg, i.p.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). A tabela representa a média ± e.p.m, respectivamente (n = 6). **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

4.2.4.3 Ensaio da placa quente

O **Gráfico 7** mostra o efeito da Cloroquina (10 mg/kg, v.o.) e seus análogos no ensaio da placa quente, juntamente com Morfina (5,7 mg/kg, i.p.), como fármaco padrão e o grupo veículo com salina (NaCl 0,9%, 10 mg/kg, v.o.) como controle negativo. O grupo veículo demonstrou $4,18 \pm 0,57$, $4,11 \pm 0,67$, $4,97 \pm 0,74$, $4,26 \pm 0,65$ e $4,38 \pm 0,65$ segundos na placa, respectivamente referentes aos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos pós tratamento. O fármaco Morfina apresentou aumento no tempo de permanência na placa estatisticamente significativo, no tempo de 30 e 60 minutos (* $p < 0,05$). Cloroquina demonstrou-se sem diminuição estatística significativa do tempo de permanência na placa quente, mas seus análogos apresentaram redução estatisticamente significativa em: DS4AMQ1 no tempo de 60 minutos (** $p < 0,01$), DS4AMQ2 no tempo de 60 minutos (***) $p < 0,001$) e DS4AMQ3 no tempo de 120 minutos (* $p < 0,05$).

Gráfico 7 – Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs no ensaio da placa quente em camundongos.



Fonte: Autor, 2019.

Nota: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Morfina (5,7 mg/kg, i.p.); Cloroquina (10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2, DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). O gráfico representa a média \pm e.p.m, respectivamente (n = 6). a - * $p < 0,05$ em t = 30 min e 60 min; b - ** $p < 0,01$ em t = 60 min; c - *** $p < 0,001$ em t = 60 min; d - * $p < 0,05$ em t = 120 min, comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

4.2.5 Avaliação da performance motora

4.2.5.1 Ensaio da Barra Giratória

O teste da barra giratória foi realizado para mensurar quaisquer prejuízos na coordenação motora dos camundongos após tratamento agudo com Diazepam (DZP, 1,5 mg/kg, i.p.), com Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.) ou com os DS4AMQs (50 mg/kg, vo.o). Os resultados, apresentados na **Tabela 12**, demonstram que o tratamento com Cloroquina e seus análogos DS4AMQs não alteraram o número de quedas da barra giratória, enquanto que o tratamento i.p. com diazepam aumentou estatisticamente significativo ($***p < 0,001$) o número de quedas. Além disso, o tratamento com DZP reduziu significativamente a latência à queda ($***p < 0,001$), em segundos, como também foi observado com o fármaco Cloroquina ($***p < 0,001$), ao contrário do que foi visto com os grupos tratados com os DS4AMQs.

Tabela 12 - Efeito da Cloroquina e seus análogos DS4AMQs na coordenação motora de camundongos no teste da barra giratória.

| Tratamentos | Nº de quedas | Latência a queda (s) |
|------------------|-----------------|----------------------|
| Veículo | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |
| DZP 1,5 mg/kg | 11,40 ± 1,89*** | 23,27 ± 5,22*** |
| CLO 10 mg/kg | 0,40 ± 0,24 | 69,0 ± 49,06*** |
| DS4AMQ1 50 mg/kg | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |
| DS4AMQ2 50 mg/kg | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |
| DS4AMQ3 50 mg/kg | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |

Fonte: Autor, 2019.

Notas: Veículo (Salina, 10 mg/kg, v.o.); Diazepam (DZP, 1,5 mg/kg, i.p.); Cloroquina (CLO, 10 mg/kg, v.o.); DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3 (50 mg/kg, v.o.). As colunas representam a média ± e.p.m. (n = 6). $***p < 0,001$ comparado ao grupo veículo usando One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

5. DISCUSSÃO

A dor é uma sensação nociceptiva, que desempenha a função de alertar um indivíduo de que seu organismo está passando por um processo de injúria, ativando sensibilizadores naquela região. A inflamação se trata de uma função crítica do sistema imunológico, iniciando respostas que irão proteger o organismo contra a invasão de patógenos e agentes agressores (ULLAH et al., 2018). Na atualidade, a saúde da população em geral está comprometida em grande parte com dores como cefaleia, dores lombares, nevralgias, entre outras, o que está relacionado muitas vezes ao estilo de vida e alguns riscos ocupacionais. Essa população tende a cada vez mais fazer uso de drogas analgésicas e anti-inflamatórias, para se ver livre de tal incomodo (GUPTA et al., 2015).

O uso de muitos fármacos está amplamente voltado a terapias que envolvem dor e inflamação. Várias estratégias são empregadas neste âmbito, porém as terapias estão associadas a uma série de efeitos adversos, alguns intratáveis, o que implica no desenvolvimento de novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias (ULLAH et al., 2018). Devido a esses fatores é que cada vez mais a pesquisa científica mundial tem focado na inflamação, por ela estar presente praticamente em todas as doenças, tanto humanas como animais. Em todo o mundo tem-se buscado terapias alternativas para o tratamento de inflamações, justamente pelos efeitos adversos que esses analgésicos e anti-inflamatórios, podem desenvolver, o que pode deflagrar úlceras gastrointestinais, hemorragias, distúrbios renais e outros problemas que levam a uma diminuição na qualidade de vida do indivíduo que necessita desse tipo de tratamento (GUPTA et al., 2015).

O desenvolvimento de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios parte do ponto de vista que as reações de dor e inflamação em humanos, são baseadas nos mesmos princípios das reações que ocorrem pelos mesmos fatores em roedores. Os animais que são submetidos ao estímulo nociceptivo a partir da dor e inflamação, não tem capacidade de comunicação verbal a partir do momento em que venham a sentir dor, porém eles têm a capacidade de apresentar no seu comportamento, respostas motoras e fisiológicas parecidas com as que o ser humano é capaz de desenvolver (PERAZA ET AL., 2007).

Novas substâncias desenvolvidas testadas em animais, necessitam passar por ensaios *in vitro* que comprovem sua segurança toxicológica, antes da administração no animal. Os derivados de 4-aminoquinolina foram recentemente sintetizados e até então não havia referências a respeito de sua toxicidade. Desta forma, o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT foi o primeiro a ser realizado, visando analisar a toxicidade das substâncias a nível celular.

O ensaio de MTT ocorre através da sua redução do sal de tetrazólio, de cor amarela e solúvel em água, pelo sistema desidrogenase quando as células estão metabolicamente ativas (vivas) para formazan, cristais de cor roxa insolúveis em água. As substâncias que não demonstram toxicidade, não interferem na viabilidade da célula, ou seja, não prejudicam suas funções, podendo tranquilamente reduzir o sal de tetrazólio a formazan. A concentração de cristais de formazan são quantificados a partir de espectrofotômetro, resultando na quantidade de células viáveis e metabolicamente ativas, que são capazes de converter o sal de tetrazólio a formazan. Esse ensaio é caracterizado como método colorimétrico simples e rápido (KARAKAS; ARI; ULUKAYA, 2017), amplamente aplicados em linhas celulares de mamíferos, bactérias e fungos (GRELA; KOZLOWSKA; GRABOWIECKA, 2018).

Os DS4AMQs foram submetidos ao ensaio de MTT em quatro concentrações diferentes (0,1, 1, 10 e 100 μM) e três deles DS4AMQ1, DS4AMQ3 e DS4AMQ4, onde em sua estrutura contém o grupamento amina, interferiram na viabilidade celular apenas na maior concentração utilizada, já DS4AMQ2 que contém grupamento ácido em sua estrutura, foi a única que não apresentou-se tóxica em nenhuma das concentrações realizadas, porém DS4AMQ1 e DS4AMQ3 apresentaram CL50 elevada, e porcentagem de inibição na maior concentração baixa, diferente de DS4AMQ4, que dentre os DS4AMQs foi a que demonstrou maior citotoxicidade. Com base nesses resultados, as modificações estruturais feitas para dar origem aos DS4AMQs, podem ter influenciado na distribuição e absorção celular desses compostos, por exemplo, DS4AMQ2 demonstrou menor toxicidade, porém pode ser influenciada por diminuição de absorção e assim possível redução da capacidade de distribuição da substância em nível celular, o que ocorreu de maneira contrária quando se analisa DS4AMQ4, o nível de citotoxicidade foi maior, pelo fato de ser bem distribuída e absorvida pelas células. Em comparação com o fármaco protótipo cloroquina no ensaio, também se mostrou sem sinais de toxicidade celular, o que corrobora seu uso clínico e, atenta ao fato de algumas das mudanças estruturais feitas para o desenvolvimento dos DS4AMQs tenham afetado esse parâmetro.

A partir dos resultados do MTT, foi viável a utilização das substâncias testadas nesse trabalho, nos modelos de experimentação animal. Por serem substâncias novas, foi necessário a realização do experimento de toxicidade *in vivo*, determinando DL50 e quais doses seriam utilizadas nos ensaios de dor e inflamação, sem que estas pudessem afetar e desenvolver efeitos tóxicos aos animais.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) informa que os estudos de toxicidade aguda, têm como objetivo avaliar uma possível toxicidade produzida por substâncias em teste, quando estas são administradas em uma ou mais doses, seguidas por observação de sinais toxicológicos, que os animais expostos a tais substâncias venham apresentar, em até 14 dias após administração (ANVISA, 2013).

Os animais foram expostos aos DS4AMQs no teste de toxicidade por via oral, tendo como base as normas designadas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2008), para substâncias desconhecidas e em que não houver uma estimativa da letalidade, a dosagem inicial deve ser de 175 mg/kg, pois na maioria dos casos, esta dose é subletal e, portanto, serve para reduzir o nível de dor e sofrimento.

A administração da dose de 175 mg/kg de cada DS4AMQs foi relacionada com a sua dosagem na unidade de $\mu\text{mol/kg}$, em que DS4AMQ1 807,68 $\mu\text{mol/kg}$, DS4AMQ2 739,49 $\mu\text{mol/kg}$, DS4AMQ3 579,84 $\mu\text{mol/kg}$ e DS4AMQ4 789,39 $\mu\text{mol/kg}$. Nesta dose os compostos mais tóxicos foram DS4AMQ1 e DS4AMQ2, pois apresentaram mais efeitos tóxicos e óbito nos animais, sendo necessária diminuição da dose para 99 mg/kg. DS4AMQ3 foi a substância menos tóxica com apenas um óbito, seguido de DS4AMQ4 com dois óbitos, visto necessário o aumento da dose para 310 mg/kg para cálculo da DL50.

Os derivados DS4AMQ1 (456,92 $\mu\text{mol/kg}$) e DS4AMQ2 (418,34 $\mu\text{mol/kg}$) tiveram comportamento igual ocorrendo dois óbitos. A dose de DS4AMQ3 (1.027,14 $\mu\text{mol/kg}$) levou todos os animais a óbito e DS4AMQ4 (1.398,35 $\mu\text{mol/kg}$) três animais. Foi necessária a diminuição da dose para 55 mg/kg correspondente a DS4AMQ1 253,84 $\mu\text{mol/kg}$; DS4AMQ2 232,41 $\mu\text{mol/kg}$; DS4AMQ3 182,23 $\mu\text{mol/kg}$ e DS4AMQ4 225,54 $\mu\text{mol/kg}$. A dose de 55 mg/kg não demonstrou efeitos toxicológicos aos animais, sugerindo que os ensaios de dor e inflamação fossem realizados com doses menores ou iguais a este valor.

Dentre os efeitos toxicológicos mais comuns demonstrados pelos animais expostos aos DS4AMQs no teste, foram os relacionados ao SNC e SNA, como tremores, convulsões, cauda em *straub*, sedação, ataxia, piloereção e cianose, o que pode-se resultar que estas substâncias são lipossolúveis e capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. A cloroquina, protótipo dessas substâncias, tem uma certa afinidade pelo SNC, como cérebro e medula espinhal (MORETO; PILOTO, 2014), o fármaco então, pode acumular nesses tecidos (BERGHOLZ et al., 2013), desenvolvendo efeitos

adversos neurológicos como cefaleia, insônia, nervosismo, irritabilidade e convulsões (DESAI et al., 2012), o que corrobora com esses efeitos toxicológicos apresentados pelos animais diante desse ensaio.

A partir dos testes de toxicidade é possível determinar a DL50, ou seja, a dose de uma determinada substância em que 50% dos animais expostos a ela, desenvolvam sinais graves de toxicidade, incluindo óbito (OECD, 2008). Com relação a DL50 e o estudo da toxicidade *in vivo* dos novos compostos, DS4AMQ4 foi a substância considerada menos tóxicas aos animais, o que no ensaio de MTT mostrou-se mais tóxica, o que indica que no caso do ensaio *in vivo* a adição do grupamento etilenodiamina foi o menos favorável a efeitos tóxicos, considerando todas as dosagens utilizadas. DS4AMQ1 e DS4AMQ2 foram os mais tóxicos quando comparados todos os DS4AMQs, comprovando que a substituição por fenol e propargilamina, para formação da amina, e apenas fenol, para formação do ácido, o que no ensaio de MTT possuiu menor toxicidade, agora trouxeram efeitos tóxicos as substâncias formadas. DS4AMQ3 sintetizada a partir da DS4AMQ1, teve esse efeito tóxico reduzido, o que corrobora com o fato de que mudanças estruturais podem ser essenciais para melhoramento de moléculas e posterior desenvolvimento de novos fármacos.

Com base nos ensaios de toxicidade *in vivo* e *in vitro* foi possível descobrir o nível de segurança toxicológico dos DS4AMQs e estabelecer doses em que não afetariam os animais, mantendo a segurança no seguimento do trabalho. A partir disto, foram escolhidas as doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg, v.o., para triagem da melhor dose equiparada a resposta analgésica e anti-inflamatória, e da resposta dos DS4AMQs, utilizando o ensaio de nocicepção induzida por formalina.

O ensaio de nocicepção induzida por formalina produz duas fases diferentes e separadas, que manifestam uma resposta distinta para os tipos de modulação da dor. O primeiro estímulo corresponde a fase neurogênica que perdura até 5 minutos após a injeção de formalina, consistindo em dor que demonstra o resultado do efeito irritante sobre os nociceptores que por sua vez, ativam as fibras aferentes que resulta em liberação de substância P e neuropeptídios relacionados, nos terminais centrais e periféricos. A segunda fase, conhecida como fase inflamatória, se inicia 15 minutos após a injeção de formalina e permanece até os 30 minutos. Essa fase é impulsionada por sensibilização periférica e liberação de mediadores inflamatórios nessa região, através da medula espinhal (BASTING et al., 2014).

No ensaio, é possível observar a reação de comportamento na primeira fase, que pode ser bloqueado pela ação de substâncias com ação analgésica semelhante a antagonistas de cininas e analgésicos opioides centrais, e também a ação de AIEs, AINEs, antagonistas de cininas e opioides (periféricos e centrais) na segunda fase (GUIMARÃES et al., 2010).

Na fase neurogênica nenhum dos quatro DS4AMQs reduziram estatisticamente o tempo de lambida da pata pelo animal, em nenhuma das doses selecionadas. Na fase inflamatória do teste foi possível observar uma redução significativamente estatística, próxima ou maior que 50%, do tempo de lambida da pata pelo animal, quando se administrou DS4AMQ1, DS4AMQ2 e DS4AMQ3 na dose de 50 mg/kg v.o. DS4AMQ2 apresentou uma redução elevada de 59,67%, este demonstrando ser o melhor resultado dentre os derivados testados, inclusive pela quantidade de moléculas na dose desse derivado, propriamente dita, em evidência que foi utilizado 211,28 $\mu\text{mol/kg}$, comparada a 230,76 $\mu\text{mol/kg}$ de DS4AMQ1 com inibição de 46,03% e 165,67 $\mu\text{mol/kg}$ de DS4AMQ3 43,90%. Se fosse utilizada uma dosagem elevada de DS4AMQ3, ele poderia se sobressair dentre as outras, porém esse fato implique em possíveis efeitos tóxicos, quando analisadas as dosagens no teste de toxicidade aguda por via oral. DS4AMQ4 não demonstrou redução estatística significativamente em nenhuma das doses utilizadas, ou seja, não foi capaz de modular a resposta analgésica e inflamatória. Possivelmente a adição do grupamento etilenodiamina ao grupo farmacofórico, realizando a mudança conformacional e resultando na nova substância derivada, pode ter diminuído sua ação ou bloqueado tais efeitos.

Os ensaios toxicológicos juntamente com o ensaio escolhido para triagem farmacológica, propiciaram que a janela terapêutica dos DS4AMQs é estreita, visto que foram substâncias que demonstraram toxicidade, e a dosagem efetiva foi perto da dosagem que causa sinais tóxicos nos animais. As substituições realizadas podem estar sendo feitas em uma região que proponha toxicidade as moléculas, porém modificações estruturais são inteiramente importantes, visto que a partir do conhecimento de sua toxicidade e da estrutura em si, outros estudos sejam realizados e novas substituições para melhoria, tanto da toxicidade quanto da relação farmacológica com a resposta terapêutica.

Santos et al. (2015) realizaram o mesmo ensaio de nocicepção induzido por formalina em quatro derivados 4-aminoquinolínicos, estes também foram capazes de reduzir estatisticamente e significativamente o tempo de lambida da pata pelos animais

após a injeção de formalina, na fase inflamatória, corroborando com os resultados demonstrados pelos DS4AMQs.

A redução estatisticamente significativa do parâmetro utilizado (lambida da pata pelo animal) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina, pelos DS4AMQs na dose de 50 mg/kg, dirigiu o estudo ao fato de que essas novas substâncias têm potencial anti-inflamatório, o que possivelmente tenha reduzido a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos e mastócitos, e/ou diminuído o recrutamento dessas células para região. Com base nessa análise, para confirmar esse possível efeito anti-inflamatório, descobrindo como estão agindo essas substâncias, foi realizado o ensaio de peritonite induzida por Zymosan.

O ensaio de peritonite induzida por Zymosan, é um modelo de inflamação aguda caracterizado por alterações vasculares e produção de mediadores inflamatórios. Através da injeção de Zymosan no peritônio, são desenvolvidos um aumento na permeabilidade vascular da região, que leva menos de uma hora, juntamente com a infiltração de neutrófilos, que ocorre após 1, 6, 9 e até 10 horas. Esse mecanismo depende de alguns componentes como cisteinil-leucotrienos que são liberados por macrófagos peritoneais, histamina liberada por macrófagos e PGs, principalmente PGE2 e prostaciclina, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e, quimiocinas envolvidas no processo de influxo de leucócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) para região, dentre elas as principais são neutrófilos induzidos por citocinas quimioatraentes e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (KOLACZKOWSKA et al., 2008).

Os DS4AMQs promoveram uma redução estatisticamente significativa na quantidade de leucócitos totais no exsudato extraído dos animais, após seis horas da aplicação de Zymosan na cavidade peritoneal dos animais. Esses resultados demonstram que as mudanças conformacionais realizadas para o desenvolvimento destas substâncias, não afetou na atuação farmacológica, quando comparadas a seu protótipo cloroquina, desenvolvendo um resultado satisfatório, quanto a redução da inflamação aguda induzida e, corroboram com os resultados da fase inflamatória do ensaio de formalina, caracterizando que a sua capacidade de diminuir a migração leucocitária na inflamação, impedindo a liberação de mediadores inflamatórios na região de foco, contribuindo para diminuição dos efeitos desenvolvidos por tal processo.

Segundo Solomon e Lee (2009), a Cloroquina tem uma alta propriedade lisossomotrópica, acumulando-se nos lisossomos o que resulta em inibição das enzimas fosfolipase A2, acil-hidrolase lisofosfolípido e lipase monoacilglicerol, responsáveis

pela liberação do ácido araquidônico pelos fosfolípidios da membrana celular, reduzindo dessa forma substrato para formação de PGs, que estão em quantidades aumentadas em focos inflamatórios e, uma das responsáveis pelo desenvolvimentos dos sinais e sintomas inflamatórios.

Moreto e Piloto (2014), relataram também que a Cloroquina é capaz de reduzir macrófagos de expressar algumas citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, interleucina pró-inflamatória potente estimuladora de proteínas inflamatórias na fase aguda (KOKOTOVIC et al., 2017), devido a redução da estabilidade a nível de RNA mensageiro e de células TH pela redução da apresentação de antígeno.

A avaliação da atividade analgésica dos DS4AMQs não demonstrou resultados satisfatórios na primeira fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina, devido sua ação provavelmente, não ter sido eficaz nos nociceptores periféricos que recebem o primeiro estímulo a dor, porém os testes seguintes de nocicepção foram realizados: contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por glutamato, visando que estas substâncias atuem por outros mecanismos na redução da nocicepção nos animais, como também para confirmar diante de vários testes esse possível potencial.

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético foi realizado, devido a seu comum uso para determinação de propriedades analgésicas em novas substâncias. O ácido acético age como um estimulante na liberação de mediadores hiperalgésicos, dentre eles PGs, PGE2 e algumas outras substâncias envolvidas na resposta álgica como bradicinina, serotonina e na resposta inflamatória como histamina e, estes mediadores são responsáveis pela via de sensibilização nociceptiva periférica, resultando em efeitos nociceptivos, o que desencadeia as contorções abdominais como resposta ao estímulo (AZEVEDO et al., 2016).

O ensaio de nocicepção induzida por glutamato, objetiva a injeção de glutamato na região dorsal da pata traseira do animal. O glutamato por ser um aminoácido excitatório, está envolvido na transmissão nociceptiva como neurotransmissor excitatório, contido na medula espinhal e no subnúcleo caudal do nervo trigêmeo, participando da modulação da dor, pelo fato de enviar a transmissão nociceptiva através das fibras aferentes primárias para o SNC, indicando que seu mecanismo está associado ao desenvolvimento e manutenção da nocicepção. O glutamato também age sobre receptores ionotrópicos, como o metil-D-aspartato (NMDA), presentes nas estruturas periféricas, espinhais e supra-espinhais, que estão associados a liberação de NO na região da medula espinhal (BONJARDIM et al., 2011).

A substância DS4AMQ1 mostrou redução estatisticamente significativa nos dois testes de avaliação da nocicepção, o que corroborou com os resultados do seu protótipo Cloroquina em ambos os testes, demonstrando que a adição do grupamento propargilamina e fenol, para o seu desenvolvimento não afetou o efeito analgésico, associado a uma possível redução dos mediadores liberados pela indução de ácido acético i.p. nos animais e por interferir no sistema glutamatérgico pela inativação de receptores NMDA, impedindo a liberação de NO e outros mediadores relacionados a nocicepção.

DS4AMQ2 foi capaz de interferir significativamente na produção de PGs, PGE2, bradicinina, serotonina e histamina, envolvidos no processo de nocicepção pela indução de ácido acético, porém não houve interferência estatisticamente significativa no sistema glutamatérgico, o que induz o fato de que a adição do grupamento fenol, e formação do ácido, afetou na inativação dos receptores NMDA. Os resultados de DS4AMQ3 demonstraram resultados contrários, pois foi possível reduzir estatisticamente significativa a nocicepção causada pela injeção de glutamato, demonstrando inibição dos receptores NMDA, no entanto seu efeito não foi subjetivo para redução dos mediadores liberados pela injeção do ácido acético i.p. nos animais, o que mostra que a adição de paraformaldeído em DS4AMQ1 reduziu sua toxicidade e contribuiu com a inativação de receptores NMDA, com quantidade de moléculas menor que as outras e resultado de inibição maior, porém inibiu seu efeito analgésico mediante ao ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.

Pinz et al. (2017) ao testarem uma nova molécula derivada de quinolina, pelo ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, demonstraram resultados que corroboram com os apresentados nesse trabalho. As doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg de 7-Cloro-4-fenilsulfonil quinolina, foram capazes de reduzir significativamente e estatisticamente o parâmetro avaliado. Outro derivado de quinolina, 4-fenilselenil-7-cloroquinolina, avaliado pelos mesmos pesquisadores (2016) também teve redução significativa e estatística nesse ensaio, nas doses de 1, 5 e 25 mg/kg, o que reforça ainda mais o fato de que essas substâncias derivadas de quinolina, possuem essa ação nociceptiva.

O ensaio da placa quente também foi realizado, para configurar a reação nociceptiva dos DS4AMQs. O teste é bastante utilizado para triar substâncias com efeitos analgésicos centrais, medindo o tempo de latência da resposta do animal ao estímulo térmico desenvolvido pelo aumento de temperatura da placa. Substâncias com

propriedades de ação nociceptiva mediada no SNC mostram resultados positivos neste modelo (GUO et al., 2017).

Os resultados apontados no ensaio da placa quente mostram que os DS4AMQs possuem ação nociceptiva mediada a nível central, devido ao aumento do tempo de latência (s) com o passar do tempo de administração, justificando seu potencial analgésico central, contrastando com Cloroquina que não teve resultados estatisticamente significativos no ensaio. As modificações estruturais conferiram esse efeito aos DS4AMQs, onde DS4AMQ1 e DS4AMQ2 tiveram aumento estatisticamente significativo no tempo de 60 min (**p < 0,01; ***p < 0,05), e DS4AMQ3 teve esse tempo retardado para 120 min, o que é retribuído ao fato de que ela foi desenvolvida a partir de DS4AMQ1.

Os DS4AMQs possuem, ação moduladora da nocicepção periférica por diferentes mecanismos, resultados semelhantes a Cloroquina, mesmo após as reações no seu anel quinolínico (grupamento farmacofórico) para origem das substâncias, demonstrando que não houve alteração com relação a esse potencial. E ainda, foi possível verificar sua ação analgésica com efeito central, o que diferiu do seu protótipo, visto que as reações de substituição nucleofílica aromática, pode-se dizer que propiciaram a estes DS4AMQs essa propriedade farmacológica.

Os prováveis efeitos antinociceptivos dos DS4AMQs foram avaliados ainda pelo teste da barra giratória, que consiste em eliminar substâncias falsas positivas em relação ao seu potencial analgésico, devido a um comprometimento motor que os animais possam vir a apresentar, decorrente de ações anestésicas e sedativas, o que inibiria a sensação de dor (OZKAY; CAN, 2013). No ensaio de toxicidade aguda por via oral, os animais apresentaram sedação, ataxia e convulsões, o que poderia ser indícios de propriedades anestésias e sedativas, porém com o ensaio da barra giratória, foi descartada esta hipótese pois os animais expostos as substâncias na dose padronizada de 50 mg/kg, v.o. não apresentaram comprometimento na sua coordenação motora.

Com os resultados, foi possível descrever propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias em todas as substâncias DS4AMQs, corroborando com o uso do protótipo Cloroquina em doenças que causam dor e inflamação, porém quando analisadas suas toxicidades e doses que demonstraram efeitos estatisticamente significativos, pode-se observar que sua janela terapêutica é pequena, o que impossibilitaria tratamentos a longo prazo e/ou contínuos, como os realizados no tratamento de doenças crônicas. Ainda assim, estes resultados contribuem para o desenvolvimento e descobrimento de novos

fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, implicando que substâncias derivadas de cloroquina com outros arranjos estruturais, possam demonstrar melhorias nesse aspecto, como também a possibilidade do surgimento de novas drogas com melhores efeitos farmacológicos e menos efeitos adversos.

6. CONCLUSÃO

A avaliação dos resultados dos ensaios de toxicidade dos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina, serviu como base para concluir que estes demonstraram efeitos toxicológicos a nível celular e *in vivo*, porém analisando seus potenciais anti-inflamatórios e analgésicos, apresentam propriedades anti-inflamatórias desencadeadas por reações agudas, e antinociceptivas periférica e central.

A análise em relação a toxicidade e efeito dose-resposta dos DS4AMQs, mostrou que eles possuem uma janela terapêutica estreita, e dessa forma, os resultados obtidos dão suporte a pesquisa de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, mas com o intuito de desenvolver novas modificações estruturais, para melhoria desses parâmetros relacionados a dose-resposta e toxicidade de derivados 4-aminoquinolínicos.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal Allergy Clinical Immunol**, v. 138, p. 984-1010, 2016.
- ALDRICH, M.B. et al. Lymphatic delivery of etanercept via nanotopography improves response to collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 116, p. 1-13, 2017.
- ALMEIDA, M.F.S. **Síntese de Novos Derivados Aminoquinolínicos com possível atividade antimalárica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2014.
- ALMEIDA, T.C.C. et al. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on proinflammatory cytokines: Systematic review and meta-analysis. **Hindawi Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1-13, 2018.
- ALVES, J.E.O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 8, p. 56-68, 2017.
- ANAND, P. et al. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 385, p. 657–670, 2012.
- ANVISA – **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.
- ARANGO, V. et al. Synthesis and leishmanicidal activity of quinoline–triclosan and quinoline–eugenol hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 3445–3454, 2012.
- AZEVEDO, L.F. et al. Evidence of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Plinia edulis* leaf infusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v.192, p. 178–182, 2016.
- BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: Effect on the 5HT_{2C} receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 735, p. 141–149, 2014.

BASTING, R.T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 257–267, 2014.

BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. **BD Biosciences**, San Jose, CA, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw o edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BELLÓ, C. et al. O cetoprofeno como oportunidade terapêutica no estresse oxidativo: uma revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, p. 123-129, 2015.

BERGHOLZ, R. et al. Screeninganamnese und sehkraftbezogene lebensqualität von patienten mit chloroquin-makulopathie. **Der Ophthalmologe**, v. 110, p. 654–662, 2012.

BONJARDIM, L.R. et al. *Sida cordifolia* leaf extract reduces the orofacial nociceptive response in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1236–1241, 2011.

BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Translational neuropathic pain research: A clinical perspective. **Neuroscience**, v. 338, p. 27–35, 2016.

BOURNE, S; MACHADO, A.G.; NAGEL, S.J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurg Clin**, v. 25, p. 629–638, 2014.

BRIGGS, E. Understanding the experience and physiology of pain. **Art & Science**, v. 25, p. 35-39, 2010.

CALLEGARI, D.C. et al. Efeito hiperálgico da fentolamina, por via subaracnoidea, em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, p. 111-116, 2015.

CARVALHO, C.H.F.; CARDOSO, C.F.; ERRANTE, P.R. Aspectos gerais e tratamento farmacológico da artrite reumatoide. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, p. 122-132, 2016.

- CARVALHO, A.C.; DOMINGUETTI, C.P. Papel das citocinas inflamatórias na nefropatia diabética. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 14, p. 177-182, 2016.
- CHISTIYAKOV, D. et al. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 104, p. 114–124, 2018.
- COCCARO, E.F. et al. Cerebrospinal fluid substance P-like immunoreactivity correlates with aggression in personality disordered subjects. **Biol Psychiatry**, v. 72, p. 238–243, 2012.
- COLLIER, H.O.J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.
- COSTA, E.A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 — A 4-nerolidylcatechol derivative. **Life Sciences**, v. 92, p. 237–244, 2013.
- CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243–254, 2011.
- DESAI, K.R. et al. Role of curcumin on chloroquine phosphate-induced reproductive toxicity. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 184-191, 2012.
- DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. **Biochemistry**, v. 81, p. 80-90, 2016.
- DOHERTY, N.X. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-789, 1985.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- ELLISON, D.L. Physiology of pain. **Crit Care Nurs Clin**, v. 29, p. 397–406, 2017.
- EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2016, Anais Aspectos fisiológicos e culturais da dor, Centro Universitário Autônomo do Brasil — UniBrasil, ISSN: 2525-5126.

FONG, A.; SCHUG, A.A. Pathophysiology of pain: A practical primer. **Journal PRS**, v. 134, p. 8S-14S.

GAUJOUX-VIALA, C.; GOSSEC, L. When and for how long should glucocorticoids be used in rheumatoid arthritis? International guidelines and recommendations. **New York Academy of Sciences**, v. 1318, p. 32–40, 2014.

GHORAB, M.M.; AL-SAID, M.S.; ARAFA, R.K. Design, synthesis and potential anti-proliferative activity of some novel 4-aminoquinoline derivatives. **Acta Pharm.** v. 64, p. 285–297, 2014.

GRELAA, E.; KOZLOWSKAB, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, p. 303–311, 2018.

GUGINSKI, G. Dor: o que sabemos sobre ela? **Invited Review**, v. 2, p. 113-121, 2008.

GUIMARÃES, H.A. et al. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 328-333, 2010.

GUO, M. et al. Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives bearing a quinoline moiety as potent antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 4358–4361, 2013.

GUO, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Armadillidium vulgare* Latreille. **Chinese Journal of Integrated Medical**, v. 23, p. 138-145, 2017.

GUPTA, A.K. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and carrageenan induced paw edema in mice. **Plos One**, v. 10, p. 1-16, 2015.

HA, H. et al. IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. **PNAS**, p. E3422–E3431, 2014.

HORJALES-ARAUJO, E. et al. Emotional modulation of muscle pain is associated with polymorphisms in the serotonin transporter gene. **Pain**, v. 154, p. 1469–1476, 2013.

HUMANE ENDPOINTS - OECD. 2016. Disponível em < <https://www.humane-endpoints.info/en/oecd>> Acesso em: 05 Set. 2018.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

JAGADISH, P.C. et al. Extraction, characterization and evaluation of *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) rhizome extracts against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 434–439, 2016.

JIN, J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of medications commonly used to treat pain and inflammation. **Jama Patient Page**, v. 314, p. 1084, 2015.

JUNIOR, M.P. et al. Efeito agudo do exercício resistido sobre a interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa em idosos: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 9, p.597-604, 2015.

JÚNIOR, J.O.O.; JUNIOR, C.S.A.; COHEN, C.P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 35-42, 2016.

KARAKAS, D.; ARI, F., ULUKAYA, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 919-925, 2017.

KASHMIRA, P. et al. Design, synthesis and *in vitro* release studies of co-drugs for rheumatoid arthritis. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 14, p. 47-52, 2015.

KOKOTOVIC, D. et al. Systemic inflammatory response after hernia repair: a systematic review. **Langenbecks Arch Surg**, v. 402, p. 1023–1037, 2017.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Role of lymphocytes in the course of murine zymosan-induced peritonitis. **Inflammation Research**, v. 57, p. 272–278, 2008.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 498-512, 2002.

KURAISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Res.**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LEE, C.H. Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, p. 3-7, 2012.

MACHADO, Marcella Gabrielle Mendes. **Síntese e avaliação anti-inflamatória de derivados esteroides da série LAPDESF GL-FT**. 2017. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

MARMITT, D.J. et al. Plantas medicinais da RENISUS com potencial antiinflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. **Revista Fitos**, v. 9, p. 129-144, 2015.

MARTELLIA, A.; ZAVARIZE, S.F. Vias nociceptivas da dor e seus impactos nas atividades da vida diária. **Uniciências**, v. 17, p. 47-51, 2013.

MIRANDA, C.C.V.; JUNIOR, L.F.S.; PELLOSO, L.R.C.A. New physiological classification of pains: current concept of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 2-4, 2016.

MORETTO, B.; PILOTO, J.A.R. Tratamento da artrite reumatoide com cloroquina: uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 7, p. 46-51, 2014.

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

MOTA, L.M.H. et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, p. 158–183, 2013.

MOSHKOVITS, I. et al. CD300f associates with IL-4 receptor α and amplifies IL-4–induced immune cell responses. **PNAS**, v. 112, p. 8708–8713, 2015.

NASEF, N.A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L.R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Arch Toxicol**, v. 91, p. 1131–1141, 2017.

NIKOU, T. et al. Alteration in the concentrations of Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-10 (IL-10) and Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) in alcohol-dependent individuals without liver disease, during detoxification therapy. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 163, p. 77–83, 2016.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for Testing of Chemical**, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008.

OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 779–3787, 2010.

OZKAY, U.D.; CAN, O.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 23–30, 2013.

PALAZZO, E. et al. Supraspinal metabotropic glutamate receptors: a target for pain relief and beyond. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, p. 444–454, 2014.

PARK, J.G. et al. Tabetri™ (*Tabebuia avellanedae* ethanol extract) ameliorates osteoarthritis symptoms induced by monoiodoacetate through its anti-inflammatory and chondroprotective activities. **Hindawi Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

PERAZA, G.G. et al. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittale**, v. 19, p. 35-44, 2007.

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

PINZ, M. et al. 7-Chloro-4-phenylsulfonyl quinoline, a new antinociceptive and antiinflammatory molecule: Structural improvement of a quinolone derivate with pharmacological activity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 72-77, 2017.

PRÁ, S.D.T. et al. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 283–297, 2017.

- RAINSFORD, K.D. et al. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacol**, v. 23, p. 231–269, 2015.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biology**, v. 31, p. 986-1000, 2011.
- RIDER, P. et al. Interleukin-1 α . **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 430–438, 2013.
- RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D.V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1445–1452, 2017.
- SALDANHA, A.A. et al. Peripheral and central antinociceptive effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves on nociception-induced models in mice. **Inflammopharmacol**, v. 25, p. 81-90, 2017.
- SANTOS, R.M. et al. Synthesis and evaluation of the anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of 4-aminoquinoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 4390–4396, 2015.
- SARMENTO, F. M. Acupuntura no tratamento da dor de cães e gatos. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, 2014.
- SCHULZ, E. et al. Neurophysiological coding of traits and states in the perception of pain. **Cerebral Cortex**, v. 21, p. 2408-2414, 2011.
- SHAKER, O.G. et al. Polimorfismos dos genes metilenotetrahidrofolato redutase, fator de crescimento transformador β 1 e linfotóxina- α e susceptibilidade à artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, p. 414-420, 2016.
- SILVA, C.M.S. et al. Effects of aerobic and resistance training of long duration on pro- and anti-inflammatory cytokines in rats. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 10, p. 170-175, 2017.
- SILVA, J.C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 18-23, 2013.

SOLOMON, V.R.; LEE, H. V. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 220–233, 2009.

SOUZA, A.R. et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em hospital de referência. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 14, p. 129-132, 2016.

SOUZA, I. et al. Perfil de resiliência em pacientes com dor crônica. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, p. 1-12, 2017.

SOUZA, J.B. et al. Dor articular: inflamatória ou neuropática? **Revista Ciências em Saúde**, v. 7, 2017.

SPIES, C.M. et al. Glucocorticoids. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, p. 891–900, 2011.

TEIXEIRA, M.J.; ALMEIDA, D.B.; YENG, L.T. Concept of acute neuropathic pain. The role of nervi nervorum in the distinction between acute nociceptive and neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 5-10, 2016.

THOMAZ, L.L. **Geração de células dendríticas tolerogênicas após tratamento com cloroquina**: participação da via não canônica do fator de transcrição nuclear-kb (NF-kb). 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2018.

TOCHE, R.B. et al. Synthesis of novel benzo[h][1,6]naphthyridine derivatives from 4-aminoquinoline and cyclic b-ketoester. **Tetrahedron**, v. 66, p. 5204-5211, 2010.

TRAESEL, G.K. **Avaliação do perfil toxicológico e genotóxico do óleo extraído da polpa da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.** 2014. Dissertação (Mestrado em Mestre em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2014.

TRETO, R.R.R.; PINTO, W.J. Fisiologia da algésia. **Journal of Amazon Health Science**, v. 1, p. 1-23, 2015.

ULLAH, M.Z. et al. Attenuation of inflammatory pain by puerarin in animal model of inflammation through inhibition of pro-inflammatory mediators. **International Immunopharmacology**, v. 61, p. 306–316, 2018.

XU, F.; LIN, M.; LU, T.J. Modeling skin thermal pain sensation: Role of non-Fourier thermal behavior in transduction process of nociceptor. **Computers in Biology and Medicine**, v. 40, p. 478–486, 2010.

YADAV, P.; SINGH, P.; TEWARI, A. K. Design, synthesis, docking and anti-inflammatory evaluation of novel series of benzofuran based prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 2251–2255, 2014.

ZHANG, Q. et al. Increased ratio of high sensitivity C-reactive protein to interleukin-10 as a potential peripheral biomarker of schizophrenia and aggression. **International Journal of Psychophysiology**, v. 114, p. 9–15, 2017.

ZORINA-LICHTENWALTER, K.; KHOURY, C.B.M.S.; DIATCHENKO, L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. **Neuroscience**, v. 338, p. 36–62, 2016.

ANEXO I – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

* 2ª Via

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos derivados sintéticos de 4-aminoquinolina*”, registrada com o nº **04/2018**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 20.07.2018.

| | |
|----------------------------|--|
| Vigência da autorização | 01.05.2018 a 31.03.2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongos Swiss |
| Nº de animais | 425 |
| Peso/idade | 25-35 g |
| Sexo | 213 machos e 212 fêmeas |
| Origem/Local de manutenção | Biotério Central da UFAL / Laboratório de Farmacologia e Imunidade (Lafi) do ICBS/UFAL |
| Colaboradores | Suellen Maria Albuquerque da Silva |

Maceió, 25 de julho de 2018.

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479

*Revogada 2ª via do parecer emitido em 19/04/2018 e aprovado na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais em 13.04.2018.

ANEXO II - Progressões de dose para a diretriz do teste de toxicidade aguda por via oral – “Up-and-Down-Procedure” (teste 425) da OECD

OECD/OCDE

Table 1 Dose Progressions for OECD Test Guideline 425
Choose a Slope and Read Down the Column
All doses in mg/kg bw

| Slope = | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* | 0.175* |
| | | | | | 0.275 | 0.26 | 0.24 | 0.23 |
| | | | | 0.31 | | | 0.34 | 0.31 |
| | | | 0.375 | | | 0.375 | | 0.41 |
| | | | | | 0.44 | | 0.47 | |
| | | 0.55 | | 0.55 | | 0.55 | | 0.55 |
| | | | | | 0.69 | | 0.65 | |
| | | | | | | | | 0.73 |
| | | | 0.81 | | | 0.82 | | |
| | | | | 0.99 | | | 0.91 | 0.97 |
| | | | | | 1.09 | 1.2 | | |
| | | | | | | | 1.26 | 1.29 |
| | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 | 1.75 |
| | | | | | | | 2.4 | 2.3 |
| | | | | | 2.75 | 2.6 | | |
| | | | | 3.1 | | | 3.4 | 3.1 |
| | | | 3.75 | | | 3.75 | | |
| | | | | | 4.4 | | | 4.1 |
| | | | | | | | 4.7 | |
| | | 5.5 | | 5.5 | | 5.5 | | 5.5 |
| | | | | | 6.9 | | 6.5 | |
| | | | | | | | | 7.3 |
| | | | 8.1 | | | 8.2 | | |
| | | | | 9.9 | | | 9.1 | 9.7 |
| | | | | | 10.9 | 12 | | |
| | | | | | | | 12.6 | 12.9 |
| | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 17.5 |
| | | | | | | | 24 | 23 |
| | | | | | 27.5 | 26 | | |
| | | | | 31 | | | 34 | 31 |

