

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JOÃO PAULO NOÉ DA SILVA**

**Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida (LQM10), um derivado de guanilhidrazona**

Maceió – AL,  
2019

JOÃO PAULO NOÉ DA SILVA

**Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida (LQM10), um derivado de guanilhidrazona**

Qualificação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió – AL,  
2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB-4 - 661

- S586a Silva, João Paulo Noé da.  
Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-[(3,5-di-tert-butil-4 hidroxifenil) metileno] hidrazinacarboximidamida (LQM10), um derivado de guanilhidrazona / João Paulo Noé da Silva. – 2019.  
60 f. : il.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde. Macció, 2019.
- Bibliografias: f. 58-60.
1. Guanilhidrazona. 2. Inflamação. 3. Antinocicepção. 4. Anti-inflamatórios.  
I. Título.

CDU: 615.2



### Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de João Paulo Noé da Silva

No dia 26 de Julho de 2019, às 10:00, os membros da Banca examinadora reuniram-se na sala 19 do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (UFAL) para a centésima septuagésima segunda (172ª) Defesa de Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde defendida pelo discente João Paulo Noé da Silva, orientado pelo Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto. A Banca examinadora foi composta pelos professores doutores Emiliano de Oliveira Barreto, Maria Danielma dos Santos, Reize Klaysa Moreira Ramos. Após a apresentação por 40min (horas/minutos) da dissertação intitulada "Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida (LQM10), um derivado de guanilhidrazona", o mestrando foi arguido pela banca na seguinte ordem: Klaysia Moreira Ramos, Maria Danielma dos Santos e Emiliano O. Barreto, reunidos em sessão secreta às 12:00 horas, os examinadores consideraram o mestrando APROVADO. Para constar foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

*Klaysia Moreira Ramos*  
*Maria Danielma dos Santos*  
*Emiliano O. Barreto*

## RESUMO

A resposta inflamatória pode ser descrita como uma reação do organismo cuja finalidade é de conter/eliminar agentes agressores e promover reparo tecidual. Porém, quando a inflamação ultrapassa os limites fisiológicos se estabelece a patogênese para vários tipos de doenças. A síntese e caracterização de novos fármacos capazes de inibir a inflamação ainda são imprescindíveis, pois as terapias atualmente disponíveis apresentam limitações e efeitos adversos significativos. As guanilhidrazonas mostram-se como um grupo de moléculas de interesse para diferentes campos de estudo incluindo as áreas biomédicas e de química medicinal. As modificações estruturais já realizadas nas guanilhidrazonas permitiram a obtenção de um grande número de novas moléculas detentores de uma vasta gama de efeitos farmacológicos, incluindo atividades antioxidantes e antivirais. Com base na relevância dos derivados guanilhidrazonas, bem como na ausência de avaliações farmacológicas acerca de seus possíveis efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, neste estudo objetivamos avaliar em diferentes modelos experimentais os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do derivado guanilhidrazona denominado 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida, denominado de LQM10. Inicialmente, constatou-se que a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético foi inibida de forma significativa pelo tratamento com LQM10 a partir da concentração de 0,0305  $\mu\text{mol/kg}$ . Neste mesmo modelo experimental, o uso dos antagonistas ioimbina, atropina e glibenclamida não foram capazes de reverter a antinocicepção induzida pelo LQM10. No teste de formalina, o tratamento com LQM10 nas duas maiores doses (15,25 e 30,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) inibiu, respectivamente, em 50 e 53% apenas a segunda fase deste teste. O tratamento com LQM10 também não afetou a resposta nociceptiva induzida no modelo da placa quente. Já na nocicepção induzida por capsaicina, o tratamento com 3,05, 15,25 e 30,5  $\mu\text{mol/kg}$  de LQM10 reduziu a resposta nociceptiva em 38%, 46% e 43%, respectivamente. Adicionalmente, animais tratados com LQM10 não exibiram alteração no desempenho motor quando avaliados no teste do rota-rod. Ao ser avaliado o efeito deste derivado guanilhidrazona na formação do edema inflamatório, constatou-se que o tratamento com LQM10 inibiu de maneira significativa a formação do edema de pata induzida por carragenina. No sistema *in vitro*, utilizando cultivo de células A549, constatamos que o tratamento com LQM10 por 24 h em concentrações inferiores a 10  $\mu\text{M}$  não afetaram a viabilidade das células. Quando as células A549 foram estimuladas com TNF- $\alpha$  observou-se um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e IL-6, fenômenos que foram todos inibidos pelo tratamento com LQM10. Juntos, estes resultados demonstram que o LQM10 possui efeito antinociceptivo que parece depender de receptores vaniloides e efeito anti-inflamatório capaz de inibir a geração de mediadores pró-inflamatórios como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocina IL-6.

**Palavras-chave:** Guanilhidrazona. Inflamação. Antinocicepção. anti-inflamatório.

## ABSTRACT

The inflammatory response is described as an organism reaction that aims purpose is to contain/eliminate aggressive agents and promote tissue repair. However, when inflammation goes beyond the physiological limits, pathogenesis is established for several types of diseases. The synthesis and characterization of new drugs, capable of inhibiting inflammation, are still essential as currently available therapies that have significant limitations and adverse effects. Guanylhydrazones are shown as a group of important molecules for different fields of study including the biomedical and medicinal chemistry areas. Once the structural modifications already made in guanylhydrazones have allowed the obtaining of a large number of new molecules possessing a wide range of pharmacological effects, including antioxidant and antiviral activities. Based on the relevance of guanylhydrazone derivatives, as well as the absence of pharmacological evaluations of their possible analgesic and anti-inflammatory effects. In this study, the goal was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the guanylhydrazone derivative called 2 - [(3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) methylene] hydrazinecarboximidamide, also known as LQM10. Initially, nociceptive response induced by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid was significantly inhibited by the treatment with LQM10 from the concentration of 0.0305  $\mu\text{mol} / \text{kg}$ . Next, in this same experimental model, the use of the antagonists: yohimbine, atropine, and glibenclamide were not able to reverse the antinociception induced by LQM10. In the formalin test, treatment with LQM10 at the highest doses of 15.25 and 30.5  $\mu\text{mol} / \text{kg}$  inhibited the response, respectively, by 50 and 53% only in the second phase of this test. Treatment with LQM10 also did not affect the nociceptive response induced by the hot plate model. In nociception induced by capsaicin, treatment with 3.05, 15.25 and 30.5  $\mu\text{mol} / \text{kg}$  of LQM10 decreased the nociceptive response by 38%, 46%, and 43%, respectively. Additionally, animals treated with LQM10 showed no motor performance alterations when evaluated in the rota-rod test. When assessing the effect of this guanylhydrazone derivative on the formation of inflammatory edema, it was found that the treatment with LQM10 significantly inhibited the formation of carrageenan-induced paw edema. Additionally, in the in vitro system, using A549 cell culture, we found that cells exposed to LQM10 for 24 h at concentrations below 10  $\mu\text{M}$  did not have their viability affected. When A549 cells were stimulated with TNF- $\alpha$ , there was an increase in the production of the reactive species of oxygen, nitric oxide, and IL-6, phenomena that were inhibited by the treatment with LQM10. Together, these results demonstrate that LQM10 has an antinociceptive effect that seems to depend on vanilloid receptors. In addition, has an anti-inflammatory effect capable of inhibiting the generation of pro-inflammatory mediators as reactive species of oxygen, nitric oxide, and IL-6 cytokine.

**Keywords:** Guanylhydrazone. Inflammation. Antinociception. Anti-inflammatory.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relação dos diferentes tipos de fibras aferentes primárias (FAP) as diferentes respostas da dor à lesão. ....	15
<b>Figura 2.</b> Visão geral do circuito nociceptivo. ....	16
<b>Figura 3.</b> Processos vasculares e celulares da resposta inflamatória. ....	18
<b>Figura 4.</b> Ativação imune e sensibilização de nociceptores após lesão. ....	19
<b>Figura 5.</b> Esquema e microscopia eletrônica de transmissão com os tipos de células epiteliais alveolares. ....	21
<b>Figura 6.</b> Microscopia eletrônica da célula A549 em sistema de cultivo de células. ....	22
<b>Figura 7.</b> O canal receptor do tipo 1 vanilóide de potencial transitório (TRPV1). ....	23
<b>Figura 8.</b> Metabolização do ácido araquidônico e síntese dos mediadores lipídicos. ....	28
<b>Figura 9.</b> Representação estrutural esquemática da guanidina e seus derivados. ....	29
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da região de variação para a obtenção dos derivados guanilhidrazonas. ....	30
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática dos radicais dos derivados de guanilhidrazona da série LQM01 a LQM20 e estrutura molecular de LQM10. ....	32
<b>Figura 12.</b> Efeito do LQM10 sobre contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. ....	41
<b>Figura 13.</b> Efeito de diferentes antagonistas de receptor sobre a antinocicepção induzida pelo LQM10. ....	42
<b>Figura 14.</b> Efeito do LQM10 na resposta nociceptiva induzida pela capsaicina em camundongos. ....	43

<b>Figura 15.</b> Efeito do LQM10 sobre a nocicepção por estímulo térmico em camundongos.....	44
<b>Figura 16.</b> Efeito do LQM10 sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	44
<b>Figura 17.</b> Efeito do LQM10 sobre a motricidade de camundongos no teste de Rota-rod.....	45
<b>Figura 18.</b> Efeito do LQM10 sobre a formação de edema de pata induzido por carragenina. ....	47
<b>Figura 19.</b> Efeito do LQM10 sobre a viabilidade de células A549. ....	48
<b>Figura 20.</b> Efeito do tratamento com LQM10 sobre a produção de ERO em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ . ....	49
<b>Figura 21.</b> Efeito do LQM10 sobre a produção de NO em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ . ....	50
<b>Figura 22.</b> Efeito do LQM10 sobre a produção de IL-6 em células A459 estimuladas com TNF- $\alpha$ . ....	51



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
2.1 Dor	13
2.2 Inflamação	17
2.3 Receptor TRPV1 ( <i>Transient receptor potential vanilloid type-1 channel</i> )	22
2.4 Tratamento da dor aguda e inflamação	24
2.5 Guanidina, aminoguanidina e seus derivados guanilhidrazonas	28
<b>3 OBJETIVOS</b>	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
4.1 Derivado de guanilhidrazona LQM10	34
4.2 Animais	34
4.3 Tratamentos	35
4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva	35
4.4.1 Teste de contorção abdominal induzido por ácido acético	35
4.4.2 Teste de Capsaicina	36
4.4.3 Teste de formalina	36
4.4.4 Teste da placa quente	36
4.4.5 Teste da coordenação motora (teste do rota-rod)	37
4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória	37
4.5.1 Edema de pata	37
4.5.2 Cultura de células	38
4.5.3 Avaliação da viabilidade celular	38
4.5.4 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio	38
4.5.5 Quantificação da produção de óxido nítrico	39
4.5.6 Quantificação da citocina	39
4.6 Análise estatística	40
<b>5 RESULTADOS</b>	41
5.1 Atividade antinociceptiva	41

5.1.1 Efeito do LQM10 sobre a nocicepção induzida por ácido acético .....	41
5.1.2 Efeito de antagonistas de receptores .....	42
5.1.3 Resposta nociceptiva induzida por capsaicina .....	43
5.1.4 Efeito do LQM10 na nocicepção induzida por estímulo térmico .....	43
5.1.5 Efeito do LQM10 na nocicepção induzida formalina .....	44
5.1.6 Efeito do LQM10 sobre o desempenho motor .....	45
5.2 Atividade anti-inflamatória .....	47
5.2.1 Efeito do LQM10 no edema de pata induzido por carragenina .....	47
5.2.2 Avaliação da viabilidade das células A549 após exposição com LQM10 .....	48
5.2.3 Efeito do LQM10 sobre a produção de ERO em células A549 .....	48
5.2.4 Efeito do LQM10 sobre a produção de NO em células A549 .....	49
5.2.5 Efeito do LQM10 sobre a produção de IL-6 em células A549 estimuladas .....	50
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As reações inflamatórias podem ser caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e aumento na permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os quatro sinais típicos da presença de inflamação: rubor, tumor, calor e dor. O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX (BUTT et al., 2015; SCHULTZ, 2008).

Estas alterações moleculares e bioquímicas presentes na resposta inflamatória têm por finalidade conter/eliminar o agressor e promover reparo tecidual. Porém, sob certas circunstâncias, algumas características da reação inflamatória, como a dor e o influxo de leucócitos para o sítio da lesão podem ultrapassar os limites da homeostasia, tornando-se assim, a patogênese para diferentes tipos de doenças (BAI et al., 2015). Neste contexto, várias são as classes de medicamentos utilizados para tratamento das condições inflamatórias associadas às doenças, incluindo anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), glicocorticoides e imunossupressores.

Os esforços no desenvolvimento e identificação de fármacos capazes de tratar distúrbios inflamatórios e imunes acentuam-se à medida que os medicamentos imunomoduladores tradicionais continuam a exibir sucesso terapêutico limitado e efeitos colaterais indesejáveis (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005; KIM et al, 2013).

Nesse contexto, as guanilhidrazonas mostram-se como um grupo de moléculas de grande interesse devido ao seu amplo potencial farmacológico/terapêutico e devido à sua reatividade química (AZEVEDO DE BRITO et al., 2017). Por conta disso, as guanilhidrazonas exibem grande afinidade por biomacromoléculas e apresentam inúmeras propriedades biológicas importantes para o desenvolvimento de fármacos. tais como: anti-inflamatória (LÖWENBERG et al., 2005; SANDES et al., 2018), antinociceptiva (SANDES et al., 2018) e antiviral (SCHRODER et al., 2016).

Na Universidade Federal de Alagoas, o grupo liderado pelos professores Dr. João Xavier de Araújo-Júnior (Instituto de Ciências Farmacêuticas) e Dr. Thiago Mendonça de Aquino (Instituto de Química e Biotecnologia) em parceria com o grupo da Universidade de Strasbourg (França) liderado pelos professores Dr. Jean-Jacques Bourguignon e Dra. Martine Schmitt, vem desenvolvendo uma série de derivados de

guanilhidrazonas a partir de modificações na estrutura da molécula visando a obtenção de uma estrutura química inédita capaz de modular a inflamação, e permitir o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios. Dentre as moléculas sintetizadas, o derivado de guanilhidrazona 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida, denominado LQM10, mostrou em estudos anteriores relevantes efeitos antitumorais (FRANÇA et al., 2016), porém, até o momento, ainda não haviam sido avaliados os efeitos deste derivado LQM10 sobre a resposta antinociceptiva e anti-inflamatória.

Portanto, neste estudo foi avaliado o potencial farmacológico do derivado de guanilhidrazona LQM10 sobre modelos *in vivo* de nocicepção, bem como o seu efeito em modificar parâmetros da resposta inflamatória em modelos de experimentação *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dor

A dor é descrita pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais. É a consequência perceptual final do processamento neural de determinada informação sensorial que compreende os processos de transdução, transmissão e modulação deste estímulo que – em condições fisiológicas – possui elevado limiar e pode ser classificada segundo critérios topográficos (localizada e generalizada; superficial, somática profunda e visceral), fisiopatológicos (orgânica e psicogênica), de intensidade (leve, moderada e intensa) e temporais (aguda e crônica) (WANNMACHER et al., 2017).

Sob a perspectiva neurobiológica a dor pode ser classificada em três formas distintas a primeira é uma dor fisiológica, no sentido de alerta, essencial para identificar e minimizar o contato com agentes nocivos como calor, frio e objetos afiados. Como essa dor está relacionada à sensibilidade aos agentes nocivos ela é chamada de dor nociceptiva. O segundo tipo de dor, que também possui função protetora, é conhecida como dor inflamatória, que apesar de potencialmente mais inconveniente e duradoura, é resultante do aumento da sensibilidade sensorial após um dano tecidual mais grave, gerando uma situação de proteção/restricção de contato. Esta hipersensibilidade auxilia na redução de danos teciduais, buscando impedir a perpetuação do dano, o que teoricamente, favorece o reparo (WOOLF, 2010).

O último tipo de dor, não apresenta efeito protetor ou fisiológico, mas é geralmente resultado da má adaptação do sistema nervoso. Essa dor patológica pode ocorrer após um dano ao sistema nervoso (dor neuropática), ou ainda em condições em que não há ocorrência de dano ou inflamação (dor disfuncional) como fibromialgia, síndrome do intestino irritável, cistite intersticial entre outras síndromes onde ocorre presença substancial da dor, sem a presença de estímulos nocivos relevantes (WOOLF, 2010).

A percepção da dor é um processo que envolve um aparato extremamente complexo. Em condições fisiológicas somente estímulos de elevado limiar são

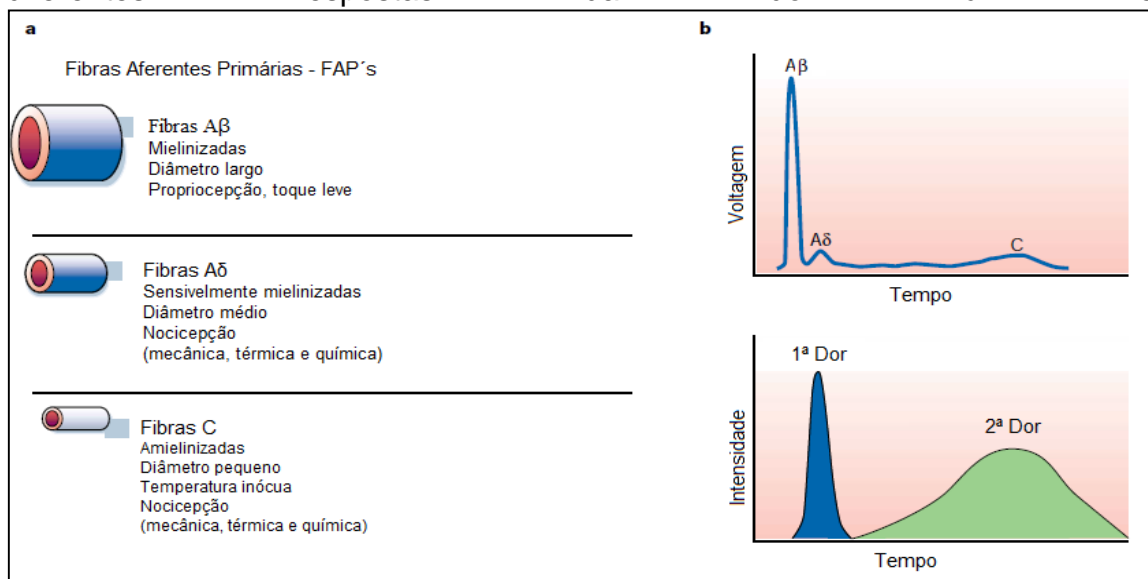
capazes de aumentar as descargas elétricas nas fibras aferentes primárias (FAP's). Estas fibras especializadas na condução dos sinais dolorosos podem ser distintas segundo sua anatomia e função em dois tipos principais A $\delta$  e C (SOPACUA et al., 2019).

Estas características facilitam o entendimento da condução dos impulsos. As fibras A $\delta$ , (Figura 1) são mielinizadas e possuem calibre e velocidade de condução intermediários (2 - 6  $\mu$ m de diâmetro e 12-30 m/s). Estas fibras estão mais fortemente associadas à dor mais aguda (1ª Dor) (CHENG; JI, 2008).

As fibras C são consideradas finas (0,4 - 2  $\mu$ m de diâmetro), são amielinizadas e apresentam baixa velocidade de condução (0,65 - 2 m/s) estando mais associadas a processos dolorosos mais prolongados (2ª Dor) (Figura 1), muitas destas fibras são chamadas de nociceptores polimodais, pois respondem a estímulos químicos, térmicos e mecânicos (CHENG; JI, 2008).

Existe um terceiro grupo de FAP, as fibras A $\beta$ , que são fibras espessas (> 10  $\mu$ m), são mielinizadas, e apresentam rápida velocidade de condução (30 - 100m/s). Estas fibras, em condições fisiológicas não são responsáveis pela transmissão de estímulos nociceptivos, elas detectam estímulos inócuos como toque, vibração, e inclusive, estão relacionadas à atenuação da dor, provavelmente atuando em interneurônios inibitórios (através de movimentos de fricção/pressão no local da lesão) (JULIUS; BASBAUM, 2001; BESSON, 1999) (Figura 1).

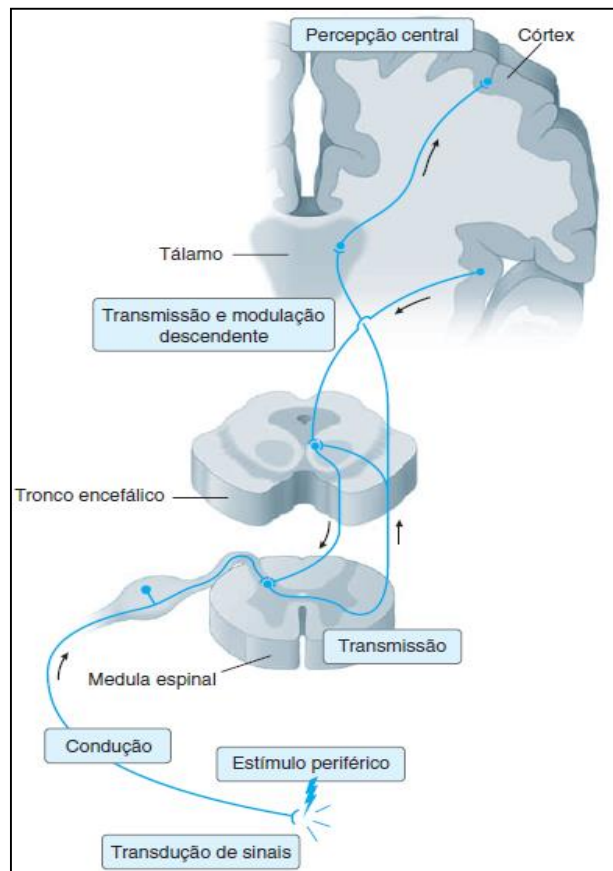
**Figura 1.** Relação dos diferentes tipos de fibras aferentes primárias (FAP) as diferentes respostas da dor à lesão.



**a.** Principais características das FAP's **b.** A velocidade da condução é diretamente proporcional ao diâmetro da fibra. **Fonte:** Adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

As FAP's Aδ e C fazem a transdução do estímulo nociceptivo externo em atividade elétrica nesta etapa a liberação de mediadores inflamatórios (histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos entre outros mediadores químicos) tem um papel central tanto para o início da resposta inflamatória, quanto para a sensibilização de nociceptores. O potencial de ação resultante é conduzido até o corno dorsal da medula espinhal onde convergem, após o processamento sináptico por neurônios de segunda ordem, através das vias espinotalâmica e espinoparabraquiais para os centros superiores (Bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo). Estas atividades no trato espinotalâmico atravessam o tálamo até o córtex somatossensorial e áreas associativas (Figura 2). O núcleo parabraquial do tronco cerebral tem conexões com neurônios de terceira ordem no núcleo medial ventral do hipocampo e o núcleo central da amígdala, as regiões do cérebro envolvidas na resposta emocional da dor encerrando a via ascendente do processo doloroso (CHENG; JI, 2008; EDVINSSON, 2011).

**Figura 2.** Visão geral do circuito nociceptivo.



Fonte: GOLAN, 2009

Na medula, os sinais nociceptivos provenientes das FAP's estão sujeitos a interferência de uma série de transmissores que atuam em (interneurônios excitatórios – INE) e interneurônios inibitórios (INI) que irão modular a transmissão do impulso para as vias superiores. Além disso, os impulsos dos centros supra-espinhais estão integrados na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, o que é fundamental na modulação dos sinais nociceptivos através das vias descendentes inibitórias (VDI) os neurônios projetados destas áreas, contém os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor, como noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), ácido gama amino butírico (GABA), dopamina (DA), encefalinas, endomorfina entre outros (BANNISTER; DICKENSON, 2016; MOORE et al., 2002).



Essas substâncias moduladoras irão atuar facilitando ou inibindo (efeito pró ou antinociceptivo) a resposta nociceptiva dependendo da intensidade do estímulo, a região do SNC envolvida, os receptores envolvidos no processo de transdução entre outros fatores. Esta diversidade de transmissores e de respostas geradas pela interação destes com os neurônios que compõem as vias do controle descendente da dor torna-se um desafio. E o melhor entendimento do processo doloroso pode ser considerado um elemento de alto impacto para os efeitos colaterais encontrados nas classes terapêuticas disponíveis (BANNISTER; DICKENSON, 2016).

## 2.2 Inflamação

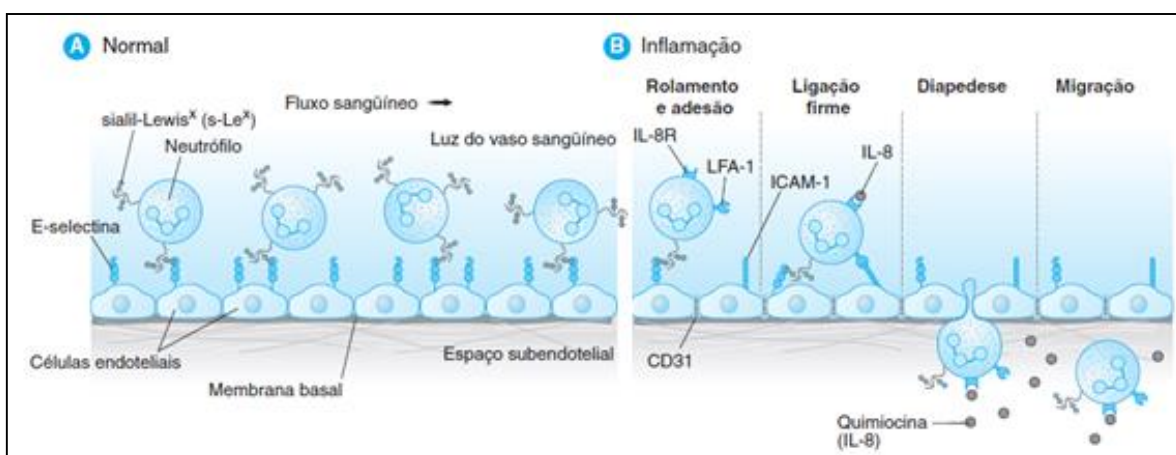
A inflamação consiste numa resposta do organismo desencadeada por estímulos de diferentes naturezas (físicos, químicos ou biológicos) sendo classicamente caracterizada pelos cinco sinais cardinais da inflamação, que consistem em rubor (vermelhidão), calor, edema, dor e perda de função. A resposta inflamatória pode ser distinguida em razão da duração do processo, como em agudo ou crônico. A inflamação aguda (em geral poucos dias) é marcada por vasodilatação, quimiotaxia de leucócitos, inicialmente neutrófilos, seguido do influxo de outros leucócitos e células do sistema imune para o foco inflamatório, que tende à resolução após a remoção do estímulo desencadeante (WANNMACHER et al., 2017).

Neste cenário, diversas são as doenças como infecções crônicas, artrite reumatoide, asma, entre várias outras condições clínicas que são agravadas devido a manutenção de uma resposta inflamatória de longo prazo, muitas vezes exacerbada e inapropriada causando dano tecidual, fenômeno ao qual se atribui ser de caráter crônico (podendo levar meses ou até anos) (STAUDACHER; STEVENS, 2019)

As alterações vasculares estão entre as primeiras manifestações da inflamação aguda causadas pela liberação de diversos mediadores inflamatórios, principalmente histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, substância P e óxido nítrico. Estas alterações ocorrem logo após a injúria tecidual levando ao aumento da permeabilidade vascular, que por sua vez, favorece a perda de líquido intravascular para o interstício (edema) gerando um acúmulo de hemácias no vaso e consequentemente limitando o fluxo sanguíneo (ABBOTT, 2000).

Além disso, alterações endoteliais são desencadeadas pela liberação de fator de ativação plaquetária (PAF), histamina, trombina, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1) que levam a expressão de selectinas (ex. P-selectina, E-selectina), integrinas (ex. VCAM-1, ICAM-1) entre outras moléculas que favorecem o processo de rolamento, adesão e transmigração de leucócitos para o sítio inflamatório onde são de fundamental importância para o controle e resolução do processo inflamatório (LEUNG, 2012) (Figura 3).

**Figura 3.** Processos vasculares e celulares da resposta inflamatória.

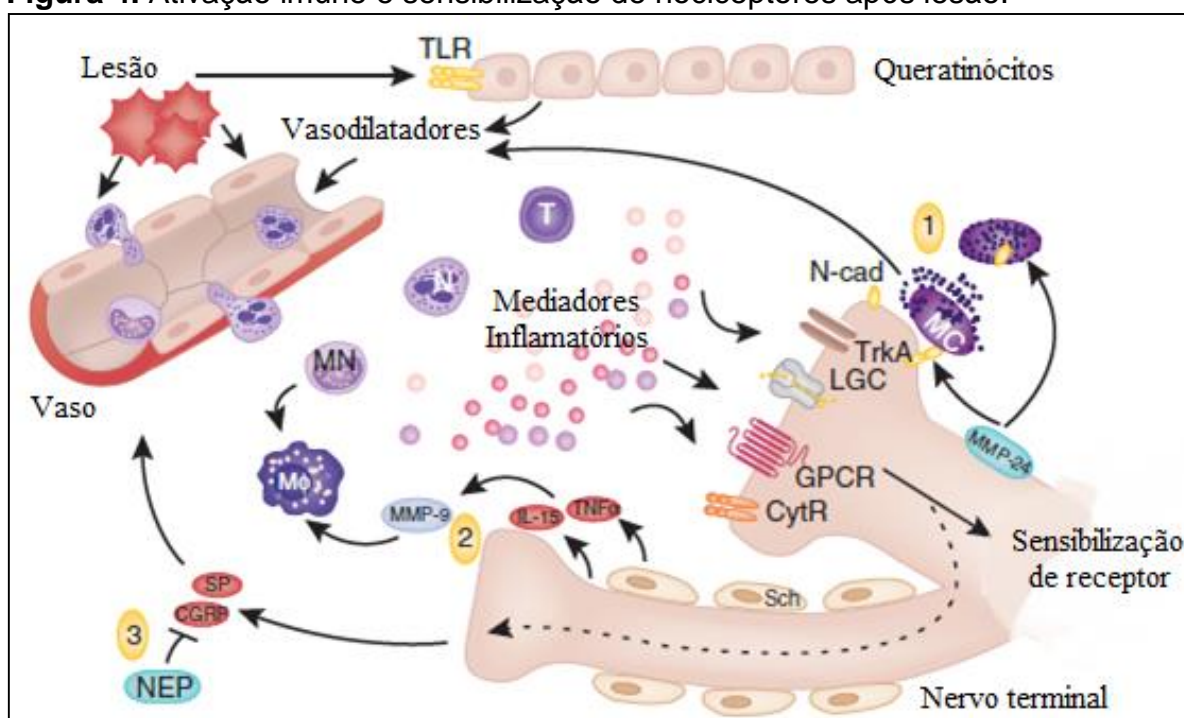


**A.** Na ausência de inflamação, os leucócitos circulam no sangue interagem de forma fraca com selectinas expressas sobre a superfície das células vasculares. O rolamento dos neutrófilos é mediado pela interação entre a E-selectina das células endoteliais e a sialil-Lewis<sup>x</sup> (s-Le<sup>x</sup>) dos neutrófilos. **B.** Durante a resposta inflamatória, as células endoteliais aumentam a expressão de moléculas de adesão intercelulares (ICAM). A expressão das ICAM aumenta o potencial de interações de ligação forte entre leucócitos e células endoteliais ativadas. Por exemplo, a ICAM-1 sobre as células endoteliais liga-se firmemente à LFA-1 nos neutrófilos. A interação célula-célula aumentada resulta em marginação dos leucócitos nas superfícies das células endoteliais e desencadeia o processo de diapedese e transmigração dos leucócitos do espaço vascular para os tecidos extravasculares. Os leucócitos migram através do tecido lesado em resposta a quimiocinas, como a IL-8, que são mediadores da inflamação liberados pelas células lesadas e por outras células imunes que já alcançaram o local da lesão. Fonte: GOLAN et al., 2009

Além disso, vários mediadores químicos liberados no sítio da inflamação e células do sistema imune interagem com receptores em neurônios para alterar a sensibilidade à dor e mediar a transição da dor aguda para crônica (Figura 4). Em resposta à lesão, células residentes no local da lesão (como queratinócitos) e do sistema imune recrutadas para o tecido são ativadas e contribuem para a sensibilização de nociceptores periféricos. Essa sensibilização ocorre através da síntese e liberação de mediadores inflamatórios e interações com neurotransmissores e seus receptores. Estas vias incluem receptores de citocinas (CytR), receptores

acoplados à proteína G (GPCR), receptores de tirosina quinase (TrkA) e canais dependentes de ligantes (LGC) formando, portanto, uma rede integrada que coordena a resposta imune e modula a excitabilidade das vias bioquímicas da dor (REN; DUBNER, 2010).

**Figura 4.** Ativação imune e sensibilização de nociceptores após lesão.



Estímulos ativam TLR's em queratinócitos e mastócitos (MC) próximos a nervos terminais. Vasodilatadores também são liberados, promovendo adesão e transmigração de células imune (linfócitos T (T), neutrófilos (N) e monócitos (MN)) e sua diferenciação a macrófagos (Mφ). Estas células, uma vez ativadas, liberam uma vasta gama de mediadores inflamatórios que agem sobre receptores expressos nos nervos nociceptores terminais adjacentes levando a sensibilização periférica dos nociceptores. Fonte: Adaptado (REN; DUBNER, 2010).

Um grupo relevante de doenças na qual a resposta inflamatória mostra-se determinante são as inflamações pulmonares. Em doenças como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) a inflamação é um evento essencial na patogênese (BUTT et al., 2015). Nestas doenças, as respostas inflamatórias são mediadas pelas interações entre leucócitos circulantes e o endotélio vascular. Como apresentado anteriormente, estudos indicam que a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias. Para se ter uma ideia, pacientes asmáticos possuem um aumento na adesão de leucócitos sobre o endotélio relacionado ao aumento da expressão de moléculas de adesão nestas células

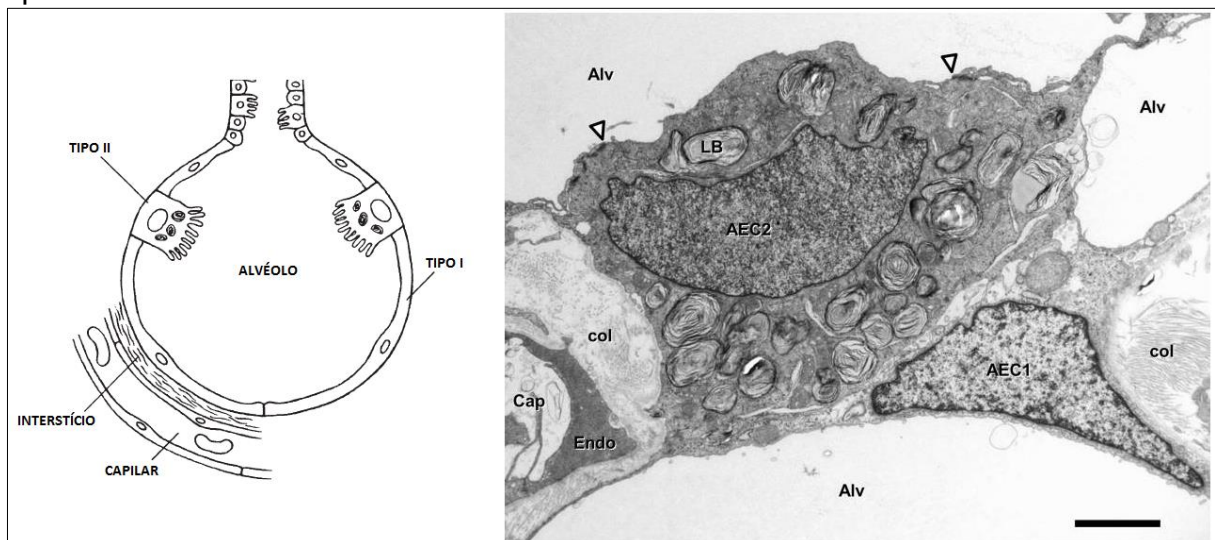
(LAZAAR; PANETTIERI et al., 2005). A gravidade e possivelmente o desenvolvimento das doenças pulmonares é fortemente influenciada pela migração de leucócitos para os pulmões em resposta aos macrófagos alveolares ativados. No pulmão, sabe-se que os neutrófilos ativados produzem numerosas substâncias citotóxicas, incluindo enzimas granulares, espécies reativas de oxigênio, lipídios bioativos, várias citocinas pró-inflamatórias e NETs (*neutrophil extracellular traps*), que interceptam patógenos no espaço extracelular através de NETose (BUTT et al., 2015).

Níveis aumentados de moléculas de adesão facilitam o recrutamento leucocitário para as regiões de tecido inflamatório. Essas moléculas de adesão são classificadas em duas grandes famílias: a superfamília Ig (por exemplo, molécula de adesão intercelular, ICAM-1, e molécula de adesão celular vascular, VCAM-1) e as selectinas (por exemplo, P-selectina e E-selectina) (LIN et al., 2007). ICAM-1 é uma glicoproteína de superfície celular induzida em vários tipos de células, que medeiam a adesividade dos leucócitos o que facilita a sua transmigração através do endotélio vascular (LIN et al., 2005). A regulação positiva de ICAM-1 na superfície de células endoteliais ou de múltiplas células residentes em vias aéreas é proeminente quando elas são expostas a moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e lipopolissacarídeo (LPS) (BASIT et al., 2006; LIN et al., 2008; KIM et al., 2001). Nas células endoteliais, o TNF- $\alpha$  causa o aumento na expressão de VCAM-1 e ICAM-1, além da ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição bem conhecido capaz de regular a expressão de moléculas de adesão celular e o desenvolvimento de respostas inflamatórias por meio da indução de mediadores inflamatórios (GHOSH et al., 1998; BALDWIN et al., 2001). A inibição da ativação do NF- $\kappa$ B induz a supressão dos níveis de expressão do mRNA e da proteína ICAM-1 e VCAM-1 induzidos pelo TNF- $\alpha$  (PIERCE et al., 1996). Portanto, o NF- $\kappa$ B é um regulador central na expressão de moléculas de adesão, e também um alvo mais eficaz para a terapia anti-inflamatória. Assim, mecanismos elucidativos da indução das moléculas de adesão pelo TNF- $\alpha$  em células residentes das vias aéreas pulmonares foram reconhecidos como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas moléculas úteis para o manejo das doenças inflamatórias pulmonares.

Ainda no tecido pulmonar, um sistema modelo para estudar a resposta inflamatória, os alvéolos são limitados basicamente por dois tipos celulares: células

alveolares do tipo I e células alveolares do tipo II. As células do tipo I compreendem cerca de 8% das células pulmonares periféricas e ocupam aproximadamente 95% da superfície alveolar, enquanto que as células do tipo II compreendem cerca de 15% e ocupam uma superfície de 5%. A própria distribuição e morfologia dessas células já sugerem uma especialização. Enquanto que as células do tipo I são planas e membranosas e estão relacionadas com o revestimento e às trocas gasosas, as células do tipo II são cuboide com corpos lamelares característicos e microvilosidades apicais e estão relacionadas com a defesa e reparação do ambiente alveolar (OCHS et al., 2016) (Figura 5).

**Figura 5.** Esquema e microscopia eletrônica de transmissão com os tipos de células epiteliais alveolares.



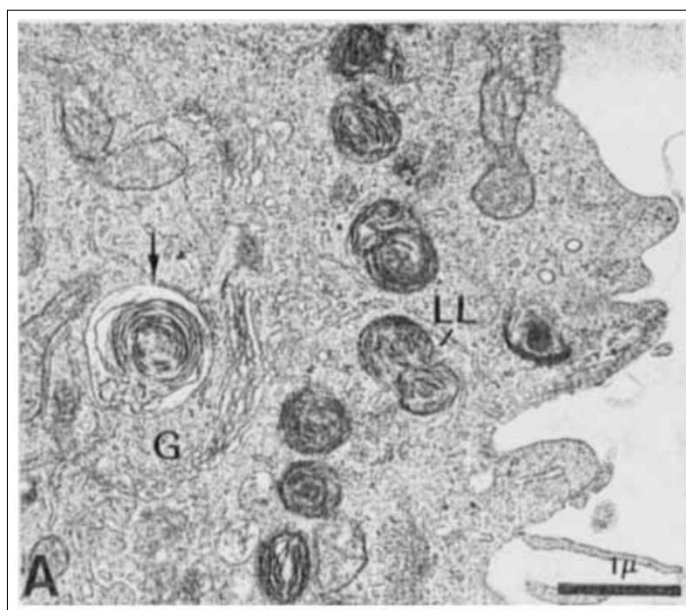
**AEC1**= Células epiteliais alveolares tipo I; **AEC2**= Células epiteliais alveolares tipo II; **LB**= Surfactante armazenada em corpos lamelares dentro de AEC2; **col**= Fibras colágenas presentes no interstício; **Alv**= Lúmen alveolar; **Cap**= Lúmen capilar; **Endo**= célula endotelial capilar; **Fonte:** Adaptado de ZEMANS; MATTHAY, 2004 e KNUDSEN; OCHS et al., 2018.

Dentre as funções típicas das células do tipo II podem ser citados o transporte de sódio para o interstício, a produção de surfactantes, a reparação do tecido danificado por meio da proliferação e diferenciação em células do tipo I, além da secreção de uma variedade de substâncias anti-inflamatórias como as  $\beta$ -defensinas, citocinas e quimiocinas (HAGIWARA; YOSHIDA; HIDAKA, 2017).

Visando dispor de um modelo experimental *in vitro* para melhor compreender as funções de células alveolares, Lieber e colaboradores (1976) caracterizaram a linhagem de células A549 a partir do carcinoma de células alveolares humanas. Esta

linhagem foi estabelecida a partir de um explante de massa tumoral em janeiro de 1972. Essas células contêm corpos multilamelares típicos e sintetizam grandes quantidades de lecitina saturada (47% do total de lecitinas) (Figura 6), essa proporção alta de lecitinas saturadas foi semelhante ao encontrado em extratos do tecido pulmonar total e em preparações purificadas de células do tipo II isoladas de coelhos (KLAUS et al., 1961; MASON, 1973; KIKKAWA et al., 1975 *apud* LIEBER et al., 1976).

**Figura 6.** Microscopia eletrônica da célula A549 em sistema de cultivo de células.



Célula A549 contendo organelas multilamelares (LL), um corpo lamelar (seta) é visível perto das vesículas de Golgi (G).**Fonte:** LIEBER et al., 1976

### 2.3 Receptor TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid type-1 channel*)

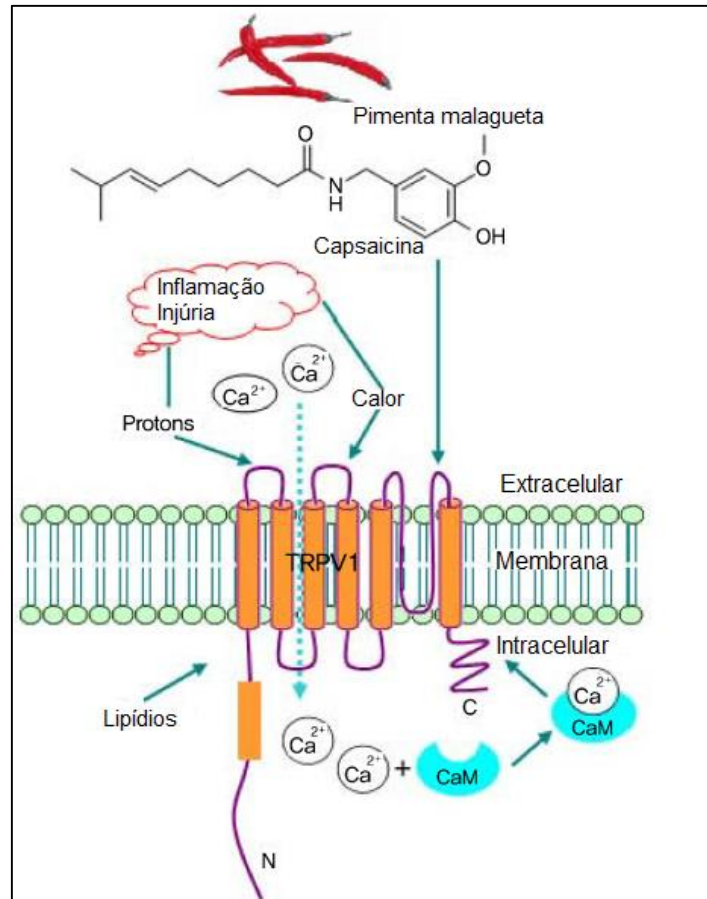
A sequência de aminoácidos prevista do VR1 (vanilloid receptor 1) revela que é um membro de uma família crescente de canais iônicos identificados pela primeira vez na via visual da mosca. Em 1969, Benzer e colaboradores descreveram uma mutação em *Drosophila melanogaster* que tornaram as moscas das frutas cegas. Os eletrorretinogramas mostraram que, enquanto os olhos de moscas normais produziam

uma resposta de despolarização sustentada a um clarão de luz, esses mutantes exibiam apenas respostas transitórias à luz, ganhando o nome TRP para o receptor de potencial transitório (*Transient receptor potential*) (HOTTA; BENZER, 1969) Montell e Rubin (1989), mais tarde, clonaram o locus TRP e descobriram que ele codifica uma proteína com seis domínios transmembranares mais uma região adicional hidrofóbica curta conectando os segmentos 5 e 6 (Figura 7).

A capsaicina é o ingrediente pungente da pimenta malagueta. O alvo da capsaicina é o receptor TRPV1. A ligação da capsaicina ao TRPV1 desencadeia um aumento no cálcio intracelular, que causa a liberação de vários neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP - *calcitonin gene-related peptide*). Quando isso ocorre nos nervos sensoriais, promove a sensação de dor, inflamação e do calor local (CUI et al., 2016).

O TRPV1 também é ativado por calor nocivo ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ácido (pH  $<5,9$ ), voltagem e vários lipídios (Figura 7). Experiências demonstraram que o TRPV1 é amplamente expresso em diferentes tecidos e órgãos além dos nervos sensoriais, como pâncreas, vasos sanguíneos, tecido adiposo e fígado, e é bem reconhecido por desempenhar papéis na sensação de dor e termosensibilidade, apoptose, regulação da função da bexiga, paladar e inflamação neurogênica (WANG; LIU; ZHU, 2011). Também foi identificado em vias aéreas e pulmão, e evidências recentes mostraram que o TRPV1 desempenha um papel importante em células A549 aumentando significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular e mitocondrial após o contato com a fumaça do cigarro, indicando a importância da via TRPV1 em regular a inflamação das vias aéreas associada com o estresse oxidativo (WANG et al., 2019).

**Figura 7.** O canal receptor do tipo 1 vanilóide de potencial transitório (TRPV1).



TRPV1 possui seis domínios transmembranares e um curto alongamento hidrofóbico que forma poros entre o quinto e o sexto domínios transmembrana. A ligação da capsaicina ao TRPV1 desencadeia um aumento no cálcio intracelular. Quando isso ocorre nos nervos sensoriais, promove a sensação de dor, inflamação e calor local. O TRPV1 também é ativado por calor nocivo ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ácido ( $\text{pH} < 5,9$ ), voltagem e vários lipídios. Fonte: Adaptado de WANG; LIU; ZHU, 2011.

## 2.4 Tratamento da dor aguda e inflamação

Atualmente existem várias estratégias farmacológicas para o manejo e controle da dor, estes fármacos incluem principalmente analgésicos não opióides, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), agonistas dos receptores opioides, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes (bloqueadores de canais de  $\text{Na}^{+2}$ ), antagonistas do receptor NMDA, agonistas adrenérgicos e agonistas dos receptores  $5\text{HT}_1$ , este último com aplicações específicas para o tratamento agudo da enxaqueca (RANG et al., 2016) Porém, apesar da diversidade de agentes com propriedades



analgésicas o manejo da dor permanece inadequado para muitos pacientes (WELLS; PASERO; MCCAFFERY, 2008).

Para o manejo da dor leve a moderada e febre são preferencialmente usados analgésicos não-opioides, principalmente paracetamol, dipirona e ácido acetilsalicílico que diferem dos demais AINES por apresentarem menor ou nenhum efeito anti-inflamatório. Todos têm propriedades analgésica e antitérmica. (WANNMACHER et al., 2017).

Os AINES atuam inibindo a atividade das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), enzimas necessárias para a produção de prostaglandinas pela via do ácido aracônico (VERHAGEN et al., 2010). A isoforma 1 é constitutiva e encontrada na maioria dos tecidos normais e está relacionada a manutenção fisiológica dos tecidos, enquanto a COX-2 é induzida em condições de inflamação por citocinas e diversos outros mediadores inflamatórios (VANE et al., 1998). Os AINES e os inibidores seletivos de COX-2 são antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios atuando tanto a nível periférico quanto central, enquanto o paracetamol e a dipirona apresentam somente ação central, por este motivo estes últimos são desprovidos em grande parte da atividade anti-inflamatória (GOODMAN et al., 2005; MS, 2012).

Os AINES são classificados como não seletivos e seletivos para COX-2 (etodolaco, meloxicam, nimesulida e coxibes são os principais representantes) sendo estes últimos questionados quanto ao fato de terem eficácia similar aos agentes não específicos, porém portando custos consideravelmente mais altos e menor segurança cardiovascular, logo parece prudente não adotá-los como primeira linha, exceto em casos de elevado risco de desenvolver ulcerações ou doenças renais (RANG et al., 2016; MS, 2012).

Esta classe atua em pelo menos três mecanismos diferentes, diminuem a hiperalgesia inflamatória gerada pelo acúmulo de prostaglandinas nas terminações nervosas periféricas, diminuem o recrutamento de leucócitos, além disso atravessam a barreira hematoencefálica modulando a liberação de transmissores no corno dorsal da medula espinhal. Os principais representantes desta classe são os salicilatos (AAS), derivados do ácido indolacético (indometacina), derivados do ácido pirrol acético (diclofenaco), derivados do ácido propiônico (ibuprofeno), as benzotiazinas e os para-aminofenóis (paracetamol) (GOLAN et al., 2009).

Como os AINE's e o paracetamol apresentam mecanismos distintos dos opioides, as combinações AINE-Opióide ou paracetamol-opióide podem atuar sinérgicamente para o controle da dor. Esta última combinação é mais comum para o tratamento da dor moderada existindo diversas preparações de paracetamol associado com codeína, hidrocodona, oxicodona, pentazocina ou propoxifeno. Apesar dos benefícios, os efeitos deletérios relacionados ao uso crônico destes medicamentos são bastante relevantes, principalmente em adultos e idosos, em quem os riscos de complicações e necessidade de internação são maiores. Entre estes efeitos podem-se citar riscos gastrintestinais (SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009), eventos cardiovasculares, insuficiência cardíaca entre outros (TRELLE et al., 2011).

Os agonistas de receptores opioides  $\mu$  constituem a principal classe de fármacos utilizados para o controle da dor aguda moderada e intensa, apesar de nos últimos anos terem se tornado um componente no tratamento da dor crônica – o que deve ser visto com cautela devido ao frequente desenvolvimento de tolerância que conseqüentemente reduz seu efeito terapêutico. Seus principais representantes são a morfina, codeína (metilmorfina) e seus derivados sintéticos como oxicodona, hidrocodona, fentanil, remifentanil entre outros que, apesar das propriedades farmacocinéticas e potências distintas (o fentanil pode ser até 100 vezes mais potente que a morfina), parecem compartilhar igualmente a maior parte dos efeitos indesejados como tolerância e dependência física (RANG et al., 2016).

Os locais de sua ação analgésica são principalmente o cérebro, tronco encefálico, medula espinhal e FAP's. Envolvem a participação da zona quimiorreceptora da medula espinhal com receptores do centro de controle respiratório, devido a isso um dos mais importantes efeitos adversos relacionados ao uso destes agentes é a depressão respiratória. O seu mecanismo de ação envolve a ativação dos receptores  $\mu$  inibindo a transmissão central dos estímulos nociceptivos. A ativação destes receptores nos terminais pré-sinápticos diminui o influxo de  $Ca^{+2}$  decorrente do potencial de ação, além de diminuir a liberação de vesículas com transmissores essenciais à transmissão dos sinais nociceptivos (EISENBERG; MCNICOL; CARR, 2005). Nos terminais pós-sinápticos o efeito envolve o aumento da condutância aos canais de  $K^{+}$  que promove a hiperpolarização destes neurônios reduzindo a quantidade de canais de  $Na^{+2}$  regulados por voltagem capazes de

alcançar o limiar de excitação, conseqüentemente reduz a resposta pós-sináptica a neurotransmissão excitatória (EISENBERG; MCNICOL; CARR, 2005).

O uso de Analgésicos adjuvantes ou não convencionais são aqueles que apresentam indicações primárias outras que não o alívio da dor, mas proveem ou aumentam analgesia em certas circunstâncias como os agonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos (clonidina), antidepressivos (amitriptilina, venlafaxina), anticonvulsivantes (gabapentina) inibidores de canal de  $\text{Na}^{+2}$  (lidocaína), antagonistas dos receptores NMDA (quetamina) e antagonistas de receptores 5HT (triptana e sumatriptana). Podem ser utilizados isoladamente ou em associação a analgésicos opioides e não opioides., mas basicamente todos eles agem reduzindo a excitabilidade neuronal e são mais comumente empregados para o tratamento da dor crônica. (GOLAN et al., 2009; WANNMACHER et al., 2017).

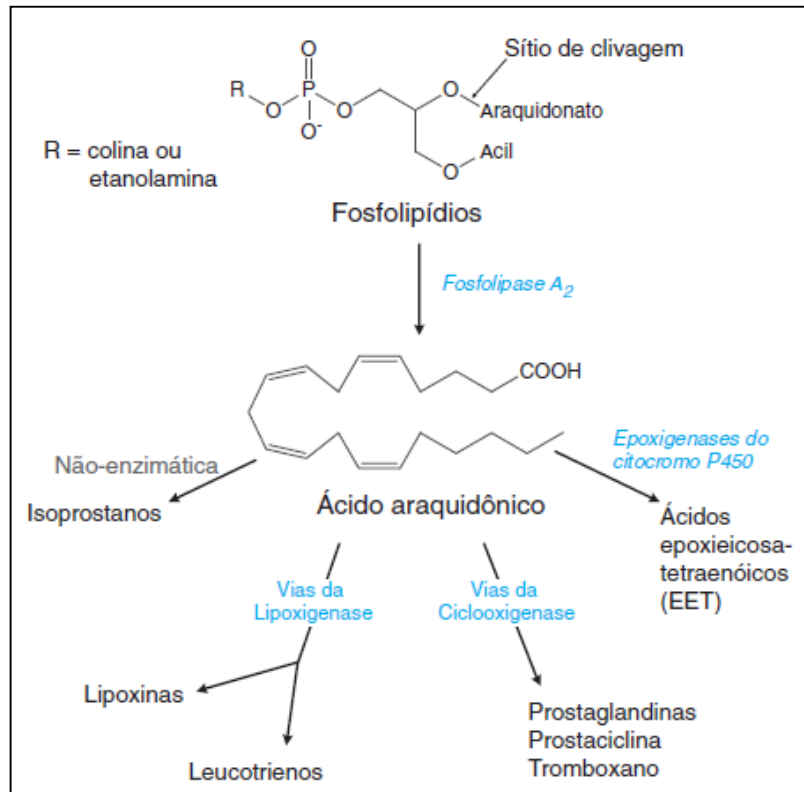
Os corticosteroides e seus derivados sintéticos, também conhecidos simplesmente como glicocorticoides ou corticoides, são agentes hormonais com funções sobre quase todos os sistemas orgânicos (metabolismo, inflamação, sistema imune, entre outros) por serem inibidores potentes da inflamação e serem utilizados numa ampla parcela de doenças inflamatórias (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC) e auto-imunes (rejeição de implantes, lúpus), estando entre as classes de fármacos mais prescritos no mundo. (GOODMAN et al., 2005).

Os representantes desta classe são os derivados do cortisol (hidrocortisona) como dexametasona, prednisona, prednisolona, estão disponíveis em diversas preparações (tópica, oral, injetáveis) para diferentes finalidades, e algumas formas inalatórias como beclometasona são utilizados principalmente para o controle da asma persistente (SUISSA, et al., 2001; MS, 2012).

Os mecanismos de ação anti-inflamatória dos glicocorticoides são muitos e vem sendo amplamente caracterizados, seu efeito anti-inflamatório envolve principalmente a inibição de fosfolipase  $A_2$ , esta enzima atua sobre fosfolipídios de membrana liberando ácido aracdônico como produto que, por sua vez, serve como substrato para a formação de diversos mediadores inflamatórios (via das cicloxigenases, lipoxigenases e epoxigenases) (Figura 8). Com isso o resultado da atividade dos glicocorticoides é uma ação anti-inflamatória potente e inespecífica, envolvendo a

redução de mediadores inflamatórios importantes como prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina (GOLAN et al, 2009).

**Figura 8.** Metabolização do ácido araquidônico e síntese dos mediadores lipídicos.



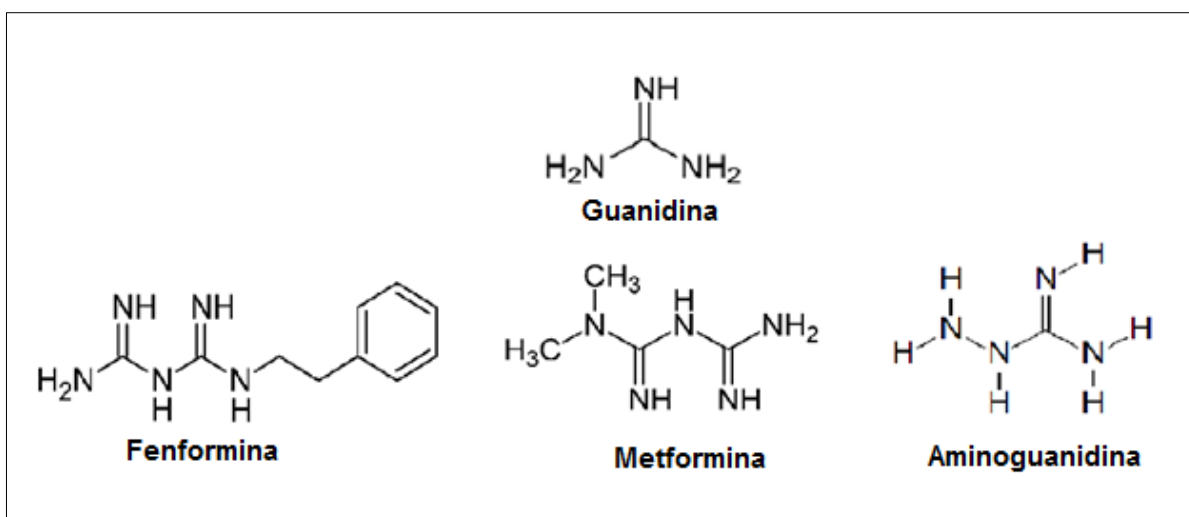
Fonte: GOLAN, 2009.

Assim como seu efeito sobre a resposta inflamatória, os efeitos adversos relacionados ao uso crônico de corticoides também são muito diversificados e inclui redistribuição centrípeta do tecido adiposo, hipertensão, miopatia proximal dos membros, osteoporose, maior risco de infecções devido a imunossupressão e diabetes e faz-se necessário a busca por novas abordagens terapêuticas (FULLER; YOUNG, 2005).

## 2.5 Guanidina, aminoguanidina e seus derivados guanilhidrazonas

Guanidinas são um grupo de compostos nitrogenados presentes em diversos produtos naturais, isolados de microrganismos, algas e esponjas (WONG et al., 2010). Com caráter altamente básico, direciona para que possam ser facilmente protonados em pH fisiológico e assim, existir na forma iônica, como um reconhecedor eficiente de substratos aniônicos, tais como carboxilatos, fosfatos e nitros (Figura 9) (CAI et al., 2013). Devido ao seu largo espectro de atividades biológicas são um interessante alvo biológico para muitos grupos de pesquisa, por favorecer a produção de novos derivados guanidínicos com potencial biológico.

**Figura 9.** Representação estrutural esquemática da guanidina e seus derivados.



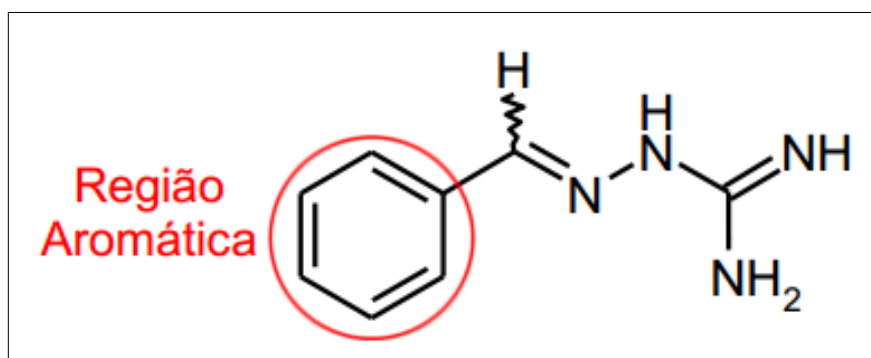
A aminoguanidina é o protótipo de agentes sequestradores que inibem a formação de AGE's (*advanced glycation end products*), produto final de glicação avançada, um grupo heterogêneo e complexo de compostos que se acumulam lentamente nos tecidos renais e vasculares ao longo da vida. O aumento dos AGE's nestes pacientes contribuem para o desenvolvimento das complicações relacionadas ao diabetes como nefropatia (BOLTON; ABDEL-RAHMAN, 2002). Os mecanismos gerais pelos quais AGE's contribuem para as complicações diabéticas envolvem a formação de "cross-links" com diferentes moléculas da matriz extracelular como colágeno, laminina, lipídeos, elastina e vitronectina, alterando a constituição da matriz aumentando a sua rigidez. Além disso, AGE's se ligam a receptores específicos RAGE em células endoteliais gerando aumento das espécies reativas de oxigênio

(ERO) e ativação do fator nuclear Kb (NF-Kb) envolvidos na resposta inflamatória relacionada à AGE's (GOLDIN et al., 2006).

Com essas descobertas uma série de terapias anti-AGE começaram a ser estudadas para prevenir a formação destas espécies (GOLDIN et al., 2006). E a aminoguanidina (2-aminoguanidina) apresentou-se como um composto capaz de prevenir a formação de AGE (YAN et al., 1994). Vários estudos sugerem que a aminoguanidina afeta favoravelmente o endotélio vascular aumentando a elasticidade e atenuando os efeitos do diabetes (CORMAN et al., 1998).

Dentre a vasta gama de derivados guanidínicos, as guanilhidrazonas representam uma classe de moléculas com diversificado elenco de ações farmacológicas. As guanilhidrazonas derivam do mesmo quimiotipo das aminoguanidinas, e compreendem diferentes classes químicas, contendo grupo amidina (guanil), ligados ao grupo hidrazona (MITCHELL et al., 1998). As alterações para a obtenção dos protótipos são planejadas a partir da variação da região aromática (Figura 10).

**Figura 10.** Representação esquemática da região de variação para a obtenção dos derivados guanilhidrazonas.



Fonte: Adaptado de EPIFÂNIO, 2011.

Estes derivados representam uma classe de compostos com diversas propriedades farmacológicas interessantes (SANTANA et al., 2019). Alguns estudos tem mostrado atividade antiproliferativa em linhagens de células cancerígenas humanas, antibacteriana, antifúngica, anti-tripanosoma e também apresentou efeito protetor na formação de produtos de glicação avançada (PINHATTI et al., 2016).

A importância destes derivados para o desenvolvimento de fármacos pode ser exemplificada pelo derivado de guanilhidrazona denominado de CNI-1493. Esta molécula foi inicialmente descrita por inibir a ativação de citocinas pró-inflamatórias induzidas por macrófagos (BIANCHI, et al., 1996). Com investimentos para melhor caracterizar as ações terapêuticas de CNI-1493, foi demonstrado suas propriedades anti-inflamatórias aplicadas em uma variedade de doenças, o que possibilitou seu avanço para estudos de fase clínica. Nesta fase dos estudos, foi demonstrado a eficiência do CNI-1493 na supressão de câncer renal e melanoma (ATKINS et al. 2001). Além dessa ação antitumoral, outra aplicação importante do CNI-1493 é seu uso no tratamento de pacientes portadores da doença de Crohn uma doença inflamatória crônica do intestino (LÖWENBERG et al. 2005).

Com esta mesma abordagem de síntese com compostos bioativos para tratamento de condições inflamatórias, o grupo de pesquisa da UFAL liderados pelos professores Dr. João Xavier e Dr. Thiago Aquino sintetizaram dezenas de derivados de guanilhidrazona, entre eles os compostos da série “LQM” (Figura 11) tal como o cloridrato de indol-3-guanilhidrazona (LQM01).

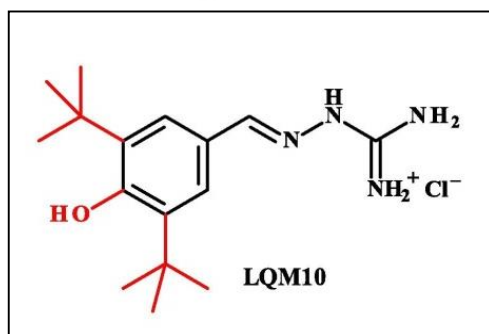
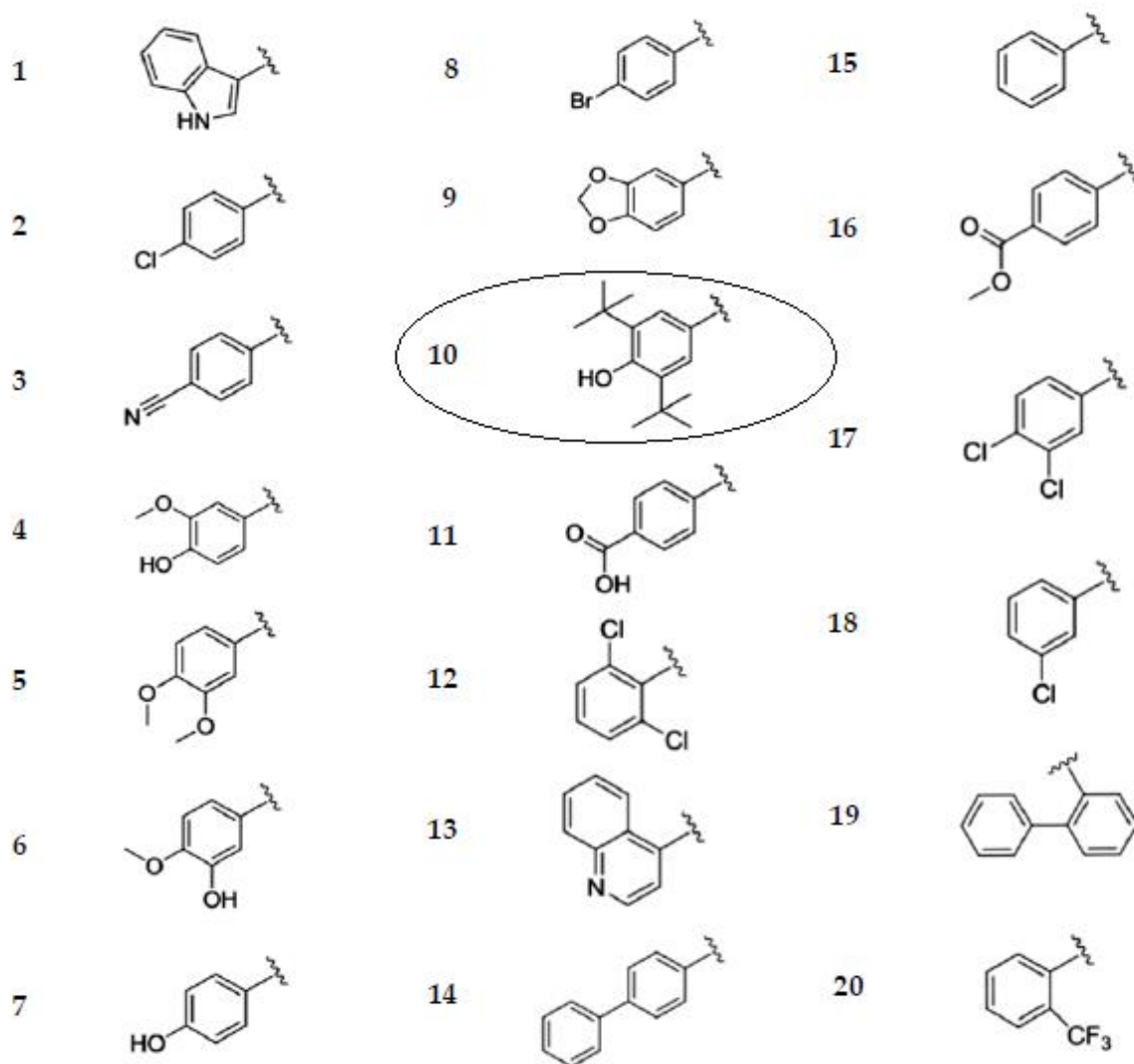
Em modelos experimentais *in vivo*, este derivado LQM01 demonstrou relevantes atividades anti-inflamatória e analgésica (FRANÇA, et al., 2016). Essas informações contribuíram para sustentar que as guanilhidrazonas mostram-se como moléculas relevantes para o desenvolvimento de novos compostos que apresentam atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Os derivados lipofílicos LQM10, LQM14, LQM17 e LQM19, por sua vez, apresentaram alta citotoxicidade contra diferentes linhagens de células cancerígenas humanas, porém entre estes compostos LQM10 apresentou o melhor perfil de citotoxicidade seletiva, uma vez que em macrófagos J774 apresentou baixa citotoxicidade.

Seguindo este racional, decidimos neste estudo avaliar os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do derivado 2-[(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida (LQM10) (Figura 11) em modelos *in vivo* e *in vitro*. Dando suporte a execução deste estudo, foram considerados os seguintes aspectos: 1) a expertise dos colaboradores da área da química medicinal para síntese do derivado de guanilhidrazona; 2) disponibilidade de amostra para

ensaios farmacológicos *in vitro* e principalmente *in vivo*; 3) inexistência de estudos sobre os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do derivado LQM10.

**Figura 11.** Representação esquemática dos radicais dos derivados de guanilhidrazona da série LQM01 a LQM20 e estrutura molecular de LQM10.



Fonte: Adaptado de (FRANÇA et al., 2016; SANTANA et al., 2019)



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do derivado de guanilhidrazona 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida (LQM10) utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos antinociceptivos do derivado de guanilhidrazona LQM10 utilizando os modelos de contorção abdominal, placa quente e formalina em camundongos.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do LQM10 utilizando o modelo de nocicepção induzido por capsaicina.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do LQM10 utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina.
- Avaliar *in vitro* o potencial citotóxico do LQM10.
- Avaliar a interferência do LQM10 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO) em células A549.
- Avaliar o efeito do LQM10 sobre a produção de citocina pró-inflamatória IL-6.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Derivado de guanilhidrazona LQM10

O derivado de guanilhidrazona substituído com o grupamento 3,5-di-terc-butil-fenol, chamado de LQM10 (2-[(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida), foi obtido através de reação de condensação, a partir da reação direta do aldeído aromático com cloridrato de aminoguanidina em etanol a 95%, sob refluxo como descrito por Epifânio e colaboradores (2011). A reação foi monitorada por CCD (cromatografia em camada delgada) e o solvente removido sob pressão reduzida e trituração do resíduo com acetato de etila. Este procedimento forneceu o derivado LQM10 como pó amorfo branco, com 90% de rendimento, e sua estrutura foi devidamente elucidada através de espectros de RMN (Ressonância magnética nuclear) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , e infravermelho. A síntese do derivado de guanilhidrazona LQM10 foi realizada sob coordenação dos professores Dr. João Xavier de Araújo Júnior e Dr. Thiago Mendonça de Aquino ambos da Universidade Federal de Alagoas.

### 4.2 Animais

Camundongos Swiss (20-35 g,  $n = 6$ ) de ambos os sexos foram mantidos em ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais permaneceram no laboratório durante o período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes, que foram realizados entre 8 e 17 h, a temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais de cuidados com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (licença CEUA-UFAL nº 009481/2011-21).

### 4.3 Tratamentos

O derivado guanilhidrazona LQM10 foi dissolvido em tampão fosfato salina (PBS) com 0,002 % de Tween-80. Os animais do grupo controle foram tratados com solução salina (0,9% m/v), dipirona (160  $\mu\text{mol/kg}$ ), ácido acetilsalicílico (AAS, 555  $\mu\text{mol/kg}$ ), morfina (27,7  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou indometacina (27,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). O LQM10 foi administrado em diferentes doses (0,003 – 30  $\mu\text{mol/kg}$ ) por via intraperitoneal.

Para identificar possíveis vias de ação do LQM10 os animais foram pré-tratados com ioimbina (2,8  $\mu\text{mol/kg}$ ), atropina (17,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou glibenclamida (20,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) 15 minutos antes do tratamento com LQM10 (30  $\mu\text{mol/kg}$ ) e então submetidos ao modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético. Para avaliar o efeito do LQM10 na formação do edema inflamatório os animais tratados por via intraperitoneal (i.p.) com 30  $\mu\text{mol/kg}$  de LQM10, salina (0,9% m/v) ou indometacina (27,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) e o edema de pata avaliado pelo método deslocamento de água medido em pletismômetro.

### 4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva

#### 4.4.1 Teste de contorção abdominal induzido por ácido acético

O modelo de contorção abdominal descrito por (COLLIER et al., 1968) foi utilizado inicialmente para avaliar a atividade antinociceptiva do LQM10. Trata-se de um ensaio muito eficiente e econômico em *screening* de drogas com potencial antinociceptivo. O estímulo nociceptivo foi induzido através da injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8%) diluído em água destilada. Os tratamentos foram administrados 60 min antes da injeção do estímulo nociceptivo. Após aplicação do estímulo na cavidade peritoneal foi avaliado de maneira cumulativa por 10 minutos o número de contorções abdominais como indicador da resposta nociceptiva em reflexo à irritação gerada pela injeção intraperitoneal de ácidos fracos bem como outros agentes inflamatórios (SIEGMUND et al., 1957)

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, muscarínicos e canais de potássio sensíveis ao ATP ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ), os animais foram pré-

tratados com ioimbina (2,8  $\mu\text{mol/kg}$ ), atropina (17,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) e glibenclamida (20,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) 15 minutos antes do tratamento com LQM10 (30  $\mu\text{mol/kg}$ ) e então foram submetidos ao modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético como descrito no item 4.4.1.

#### 4.4.2 Teste de Capsaicina

No teste de capsaicina (GONCALES et al., 2005), os animais foram pré-tratados com LQM10 (3, 15 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou veículo, 60 minutos antes da injeção (i.pl) de capsaicina (2  $\mu\text{g}$ , 20 $\mu\text{L}$ ) – um agonista seletivo para receptores de potencial transitório vanilóides tipo 1 (TRPV1) na pata direita traseira, e o tempo que cada animal permaneceu lambendo a pata estimulada foi cronometrado por 5 minutos.

#### 4.4.3 Teste de formalina

O teste de formalina permite a avaliação de dois parâmetros relacionados à nocicepção, a dor neurogênica, aquela decorrente da ativação imediata dos nociceptores periféricos após aplicação do estímulo nociceptivo, e a dor inflamatória, aquela que decorre da ação de mediadores inflamatórios. De acordo com essa metodologia, os animais foram previamente tratados com veículo, LQM10 (3, 15 e 30,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou indometacina (27,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) e após 60 minutos receberam o estímulo nociceptivo na pata traseira esquerda com formalina 1%. O modelo consistiu no registro do tempo de lambidas realizadas durante os 5 minutos imediatamente após a injeção do estímulo nociceptivo (1ª fase - neurogênica) e após intervalo de 10 minutos, o registro por mais 15 minutos do tempo de lambida da pata estimulada, período que se refere a 2ª fase - inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

#### 4.4.4 Teste da placa quente

Para avaliação da nocicepção por estímulo térmico os animais foram colocados em contato com uma chapa aquecida a 54°C e registrou-se o tempo que o animal levou para perceber o estímulo térmico como nocivo, evidenciado através de retirada brusca de uma ou ambas as patas traseiras, da placa aquecida (KURASHI et al., 1983). Os animais foram tratados com LQM10 (30 µmol/kg) e, após 60 minutos, colocados em contato com a chapa aquecida por no máximo 20 segundos. Para os controles foram utilizados salina (0,9%) e morfina (27,75 µmol/kg).

#### 4.4.5 Teste da coordenação motora (teste do rota-rod)

O rota rod é um equipamento utilizado para avaliar a capacidade motora de animais, trata-se de uma barra giratória com rotação a uma velocidade constante de 4 rotações por minuto - RPM, os animais foram previamente condicionados a permanecer sobre a barra por 240 segundos por 2 dias consecutivos, apenas os animais capazes de permanecer sobre a barra foram selecionados 24 h antes do teste. Camundongos foram tratados com veículo ou LQM10 (30 µmol/kg) e 1 hora depois foi avaliado o desempenho de cada animal no equipamento durante um período máximo de 240 segundos.

### 4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória

#### 4.5.1 Edema de pata

Para avaliar a atividade anti-inflamatória do LQM10 foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Animais foram previamente tratados com veículo, LQM10 (30 µmol/kg) ou indometacina (27,5 µmol/kg) tiveram o edema induzido pela injeção (i.pl) de 50 µL de carragenina (1%) na pata traseira esquerda. Na pata direita traseira foi injetada solução salina em igual volume (50 µL). Em seguida, as patas foram introduzidas até a região tibio-társica em uma cuba contendo solução de NaCl (0,1%) com triton (0,07%) e mantidas por 20 segundos. O experimento foi realizado utilizando um pletismômetro, que registra a medida da pata do animal fornecendo o volume em µl (deslocado pela pata edemaciada). As variações

de volume das patas foram registradas após em diferentes tempos. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M. referentes à diferença de volume entre as patas posteriores como na fórmula a seguir:

$$\Delta\text{Volume } (\mu\text{L}) = (\text{volume da pata esquerda}) - (\text{volume da pata direita})$$

#### 4.5.2 Cultura de células

As células da linhagem A549 foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina e mantidas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°.

#### 4.5.3 Avaliação da viabilidade celular

Para verificar o efeito do LQM10 sobre a viabilidade das células A549 foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983). Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na atividade mitocondrial devido a redução do MTT a cristais de formazan. As células foram semeadas ( $5 \times 10^4$  células/poço) e tratadas com LQM10 em diferentes concentrações (3, 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$ ) ou meio de cultura (grupo controle). Após os tratamentos as células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 24 horas. Após este tempo, o MTT foi adicionado e mantido por 4 h em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C. Após esse período, os poços foram lavados com PBS. Em seguida, adicionou-se 150  $\mu\text{l}$  de DMSO (dimetilsulfóxido) por 15 minutos para então realizar a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm no leitor de placa (Thermo Plate, Modelo RS 232).

#### 4.5.4 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio

O efeito do LQM10 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi avaliado através do ensaio de NBT (nitroazul de tetrazólio). Assim como o ensaio de MTT, este teste é uma avaliação colorimétrica baseada na redução do NBT a cristais de formazan, porém, neste caso a redução depende de espécies reativas de oxigênio para ocorrer (PARK, 1970). As células pré-tratadas com LQM10 (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) estimuladas ou não com TNF- $\alpha$  (30 ng/mL), tiveram os poços lavados com PBS, e em todas as condições testadas, foi adicionado o NBT (0,8 mg/mL) e mantido por 1 h. Após este tempo, os poços foram lavados e adicionou-se 120  $\mu\text{L}$  de KOH (2M) + 140  $\mu\text{L}$  de DMSO. Em seguida, cada poço e homogeneizado com vigor para dissolver os cristais de formazan e então realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 630 nm utilizando o leitor de placa (Thermo Plate, Modelo RS 232).

#### 4.5.5 Quantificação da produção de óxido nítrico

Para dosagem de óxido nítrico (NO) foi utilizada a reação colorimétrica de Griess (GREEN et al., 1962), que consiste na detecção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) resultante da oxigenação do NO nos sobrenadantes da cultura previamente coletado. Para tal, as células foram semeadas em placas de 6 poços ( $10^6$  células/poço) e foram pré-tratadas com LQM10 (1  $\mu\text{M}$ ) ou meio de cultura (RPMI-1640) e estimuladas com TNF- $\alpha$  (30 ng/mL). Após o tempo de 6 horas, o sobrenadante livre de células foi recolhido para dosagem de nitrito. Deste sobrenadante, 100  $\mu\text{L}$  foram incubados com 50  $\mu\text{L}$  da solução 1 (1% de dicloridratosulfanilimida em  $\text{H}_2\text{O}$ ) por 10 minutos. Na sequência adicionou-se outra solução composta por 0,1% de N-1-naftilenodiamina e 2,5% de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). A quantidade de nitrito foi verificada através da leitura em leitora de placa no comprimento de onda de 540 nm (Thermo Plate, Modelo RS 232). A concentração de nitrito foi determinada a partir da comparação de uma curva padrão de nitrito de sódio.

#### 4.5.6 Quantificação da citocina

A dosagem da citocina IL-6 foi realizada através do ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) seguindo as instruções do

fabricante (PeproTech®, Rocky Hill, New Jersey, EUA). As placas foram sensibilizadas com 25 µL do anticorpo específico anti-IL-6 (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS e incubadas por 18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 150 µl/poço de PBS/Tween-20 (0,05%), e incubadas com 100 µL de solução bloqueadora contendo PBS/BSA (0,01%) por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 para receber as amostras (25 µL) ou padrões de IL-6 (para curva padrão) que foram mantidas por mais 2 h a temperatura ambiente. Após este tempo, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 e 25 µL dos anticorpos biotinizados específicos (de acordo com o fabricante) adicionadas a cada poço e mantidos por incubação a temperatura ambiente por 2 h. Após três lavagens com PBS/Tween-20 foi adicionado em cada poço 25 µL de solução reveladora (de acordo com o fabricante). A reação foi bloqueada com 25 µL de ácido sulfúrico (1 M) e a leitura realizada no leitor de microplaca Modelo RS 232 (Thermo Plate) sob o comprimento de 450 nm. Os resultados foram interpolados com a curva padrão e são expressos como pg/mL.

#### 4.6 Análise estatística

Todos os resultados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e avaliados estatisticamente através da análise de variância e do teste t de Student's seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls com um nível de significância selecionado para valores de  $p < 0.05$ .



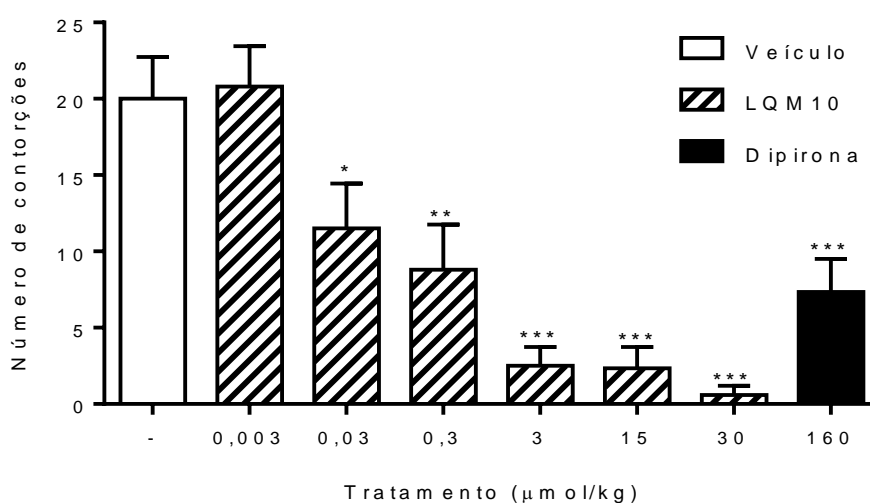
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antinociceptiva

#### 5.1.1 Efeito do LQM10 sobre a nocicepção induzida por ácido acético

A injeção de ácido acético (0,8%) na cavidade peritoneal dos camundongos evocou uma nocicepção caracterizada pela contração dos músculos abdominais e simultânea distensão de pelo menos uma pata traseira que foi caracterizada com contorções abdominais. Conforme apresentado na Figura 12, a injeção de ácido acético em animais tratados apenas com veículo resultou num sinal nociceptivo representado por uma média de 20 contorções abdominais. O tratamento com LQM10 (0,03, 0,3, 3, 15 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ ) reduziu, de forma significativa e de maneira dependente de dose, esse evento em cerca de 42%, 56%, 87%, 88% e 97%, respectivamente. Apenas a menor dose de LQM10 (0,003  $\mu\text{mol/kg}$ ) não foi capaz de reduzir as contorções abdominais. O tratamento com dipirona (160  $\mu\text{mol/kg}$ ), um fármaco referência, reduziu em cerca de 63% o número de contorções (Figura 12).

**Figura 12.** Efeito do LQM10 sobre contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

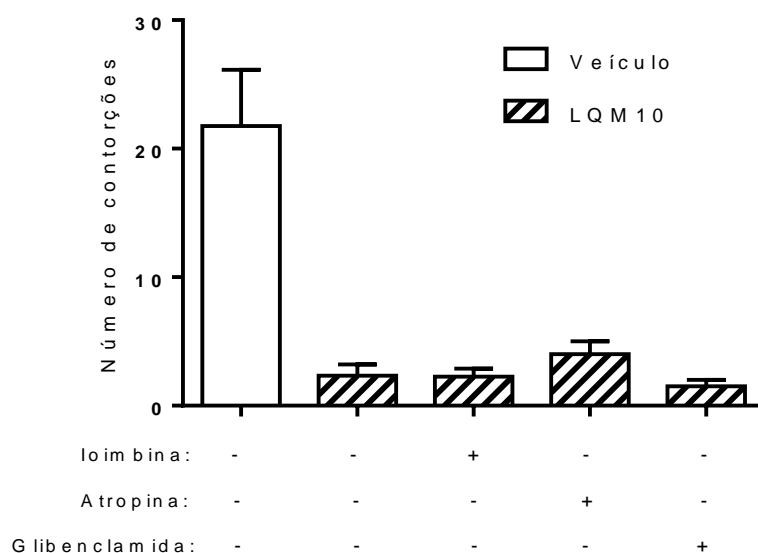


Dados expressos por média  $\pm$  SEM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewels. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

### 5.1.2 Efeito de antagonistas de receptores $\alpha$ 2-adrenérgicos, muscarínicos e $K^+$ ATP-dependente sobre a antinocicepção induzida por LQM10

Com propósito de investigar as possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito antinociceptivo do LQM10 decidimos avaliar o envolvimento dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, muscarínicos e  $K^+$ ATP-dependente. Para isso, os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal com os antagonistas ioimbina (2,8  $\mu$ mol/kg), atropina (17,2  $\mu$ mol/kg) e glibenclamida (20,2  $\mu$ mol/kg) 15 minutos antes da injeção do LQM10. Após 60 min, os animais foram estimulados com ácido acético (0,8%). Conforme apresentado na Figura 13, a injeção de ácido acético foi capaz de induzir contorções abdominais como uma resposta nociceptiva, fenômeno que foi inibido fortemente pelo tratamento com 30  $\mu$ mol/kg de LQM10. Esta inibição induzida pelo LQM10 não foi alterada pelo pré-tratamento com os antagonistas de receptores ioimbina, atropina e glibenclamida.

**Figura 13.** Efeito de diferentes antagonistas de receptor sobre a antinocicepção induzida pelo LQM10.

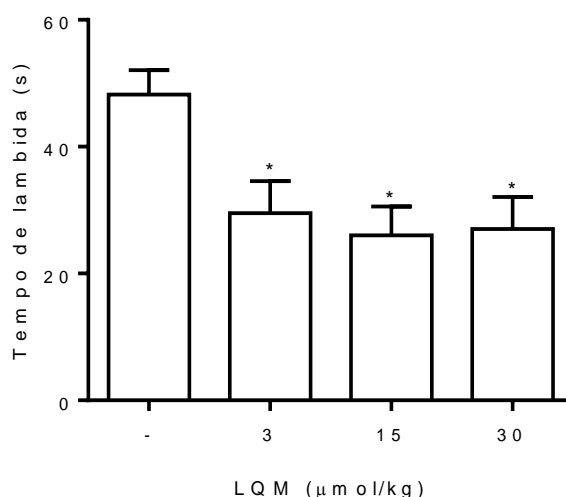


Os animais foram pré-tratados com ioimbina (2,8  $\mu$ mol/kg), atropina (17,2  $\mu$ mol/kg) e glibenclamida (20,2  $\mu$ mol/kg) 15 minutos antes da injeção com LQM10. Após 60 min, os animais foram estimulados com ácido acético. Dados expressos por média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

### 5.1.3 Resposta nociceptiva induzida por capsaicina

Adicionalmente, avaliamos o envolvimento de receptores TRPV1 no efeito antinociceptivo do LQM10 utilizando como estímulo a capsaicina. Como mostrado na figura 14, a injeção de capsaicina (2 µg/pata) em animais tratados com solução salina permaneceram em média  $48,2 \pm 3,9$  s lambendo/mordendo a pata estimulada. Já os animais tratados com LQM10 nas concentrações de 3, 15 e 30 µmol/kg apresentaram uma redução no tempo de lambida de 38%, 46% e 43%, respectivamente.

**Figura 14.** Efeito do LQM10 na resposta nociceptiva induzida pela capsaicina em camundongos.

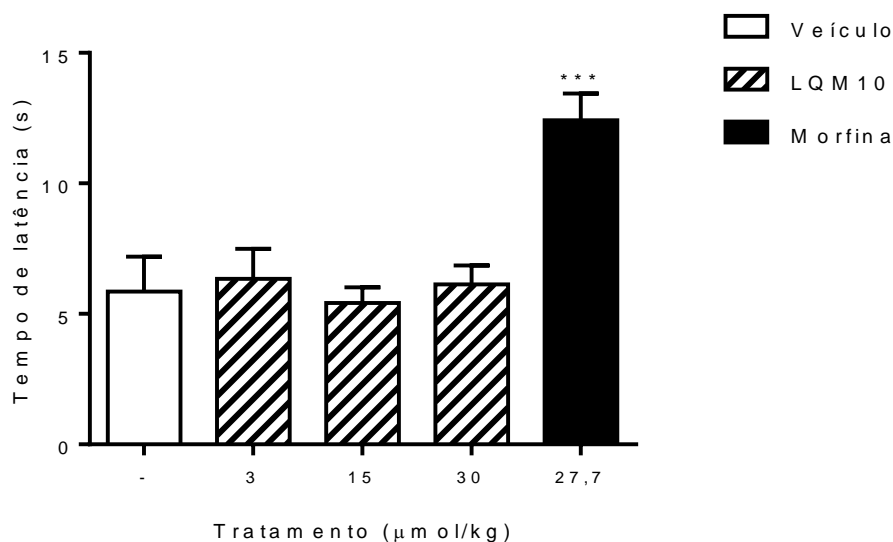


Os animais foram tratados com veículo ou LQM10 antes do estímulo com capsaicina. Dados expressos por média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \* $p \leq 0,05$ .

### 5.1.4 Efeito do LQM10 na nocicepção induzida por estímulo térmico

Os animais após tratamento com LQM10 (0,3, 15 e 30 µmol/kg), morfina ou veículo foram expostas ao estímulo térmico (placa quente) por no máximo 20 s. Como mostra a Figura 15 o tratamento com LQM10 não alterou o tempo de latência de percepção do estímulo térmico de forma semelhante aos animais tratados com veículo. Como fármaco referência, a morfina (27,7 µmol/kg) induziu um aumento de aproximadamente duas vezes (2x) no tempo de latência para o estímulo térmico.

**Figura 15.** Efeito do LQM10 sobre a nocicepção por estímulo térmico em camundongos.

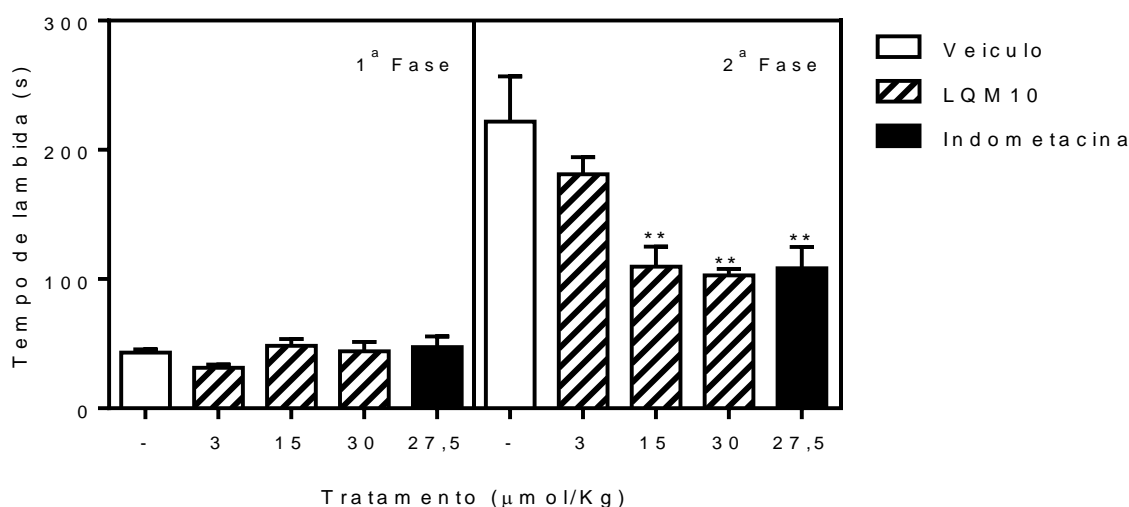


Os animais foram tratados com veículo (barra branca), LQM10 (barras hachuradas) ou morfina (barras pretas) antes do estímulo térmico. Dados expressos por média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewels. \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 5.1.5 Efeito do LQM10 na nocicepção induzida formalina

Neste modelo, a injeção da solução de formalina induz nos animais uma resposta nociceptiva aferida pelo tempo em que os animais permanecem lambendo a pata no tempo de 5-10 min (primeira fase) e 20-35 min seguintes (segunda fase). Neste modelo, animais tratados com veículo apresentaram na primeira fase um tempo de lambida de  $43,0 \pm 2,6$  s, enquanto que na segunda fase esse tempo foi de  $221,8 \pm 35$  s (Figura 16). O tratamento com LQM10 nas doses testadas não afetaram a resposta nociceptiva induzida pela formalina na primeira fase (fase neurogênica). Entretanto, o tratamento com LQM10 nas duas maiores doses (15 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ ) reduziu a resposta nociceptiva da segunda fase (fase inflamatória) em 50% e 53%, respectivamente. Como fármaco referência, a indometacina (27,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) reduziu apenas a resposta nociceptiva da segunda fase em 51% (Figura 16).

**Figura 16.** Efeito do LQM10 sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.

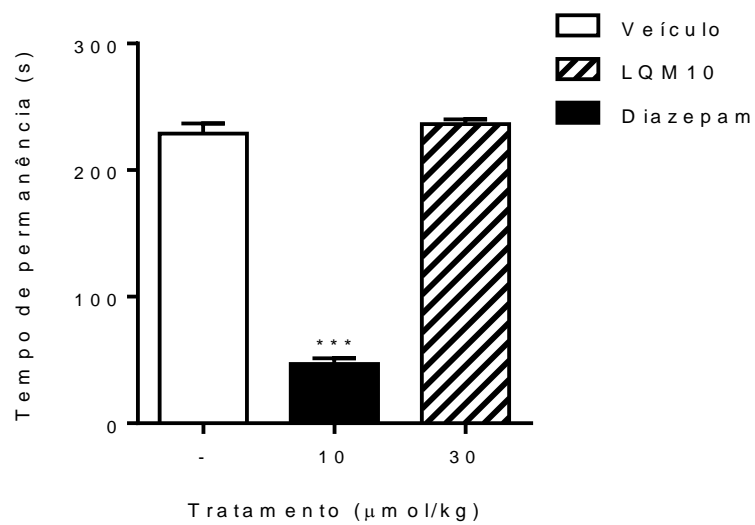


Os animais foram tratados com veículo (barra branca), LQM10 (barras hachuradas) ou indometacina (barras pretas) antes do estímulo. Dados expressos por média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \*\*p < 0,01.

#### 5.1.6 Efeito do LQM10 sobre o desempenho motor

Como a resposta nociceptiva está diretamente relacionada ao comportamento dos animais, em especial a eventos dependentes do desempenho motor, verificamos se faz o LMQ10 seria capaz de afetar o desempenho motor. Para isso, foi utilizado o teste de rota-rod, que permite diferenciar substâncias com efeito antinociceptivo daquelas que afetam o desempenho motor dos animais. Conforme apresentado na figura 17, o tratamento com LQM10 (30 µmol/kg) não afetou o desempenho motor dos animais quando colocados sobre uma barra giratória permanecendo, de modo que os animais tratados com LQM10 permaneceram em movimento pelo tempo total de experimento como os animais tratados com veículo (240 segundos) (Figura 17). Como fármaco referência foi utilizado o diazepam (10 µmol/kg), que reduziu de forma significativa a motricidade dos animais.

**Figura 17.** Efeito do LQM10 sobre a motricidade de camundongos no teste de Rota-rod.



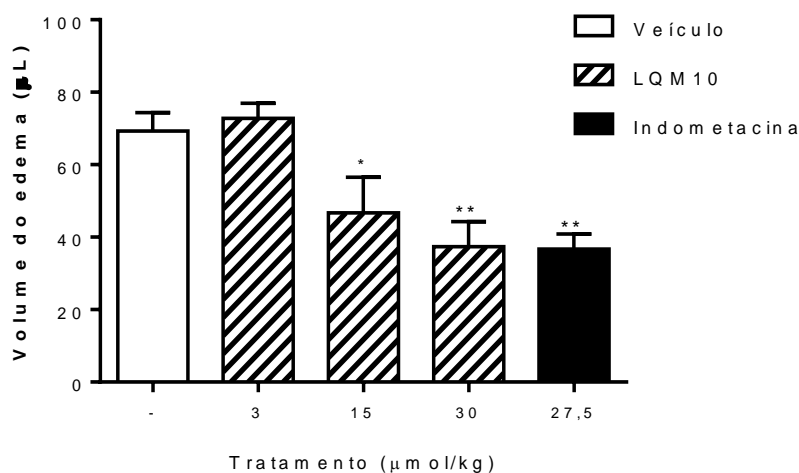
Os animais foram tratados com veículo (barra branca), LQM10 (barras hachuradas) ou diazepam (barras pretas) antes de serem expostos ao rota-rod. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.2 Atividade anti-inflamatória

### 5.2.1 Efeito do LQM10 no edema de pata induzido por carragenina

O potencial anti-inflamatório do LQM10 foi avaliado neste modelo de formação de edema. Neste experimento, observamos que no tempo de 4 horas após a injeção do carragenina ocorreu uma intensa resposta inflamatória revelada pela intensa formação de edema (Figura 18). Quando os animais foram tratados com LQM10 houve uma significativa redução da formação de edema apenas nas doses de 15 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ . A menor concentração, 3  $\mu\text{mol/kg}$ , não interferiu na formação do edema induzido por carragenina. A injeção do fármaco referência, indometacina na dose de 27,5  $\mu\text{mol/kg}$ , também foi capaz de inibir a formação edema em cerca de 50% (Figura 18).

**Figura 18.** Efeito do LQM10 sobre a formação de edema de pata induzido por carragenina.

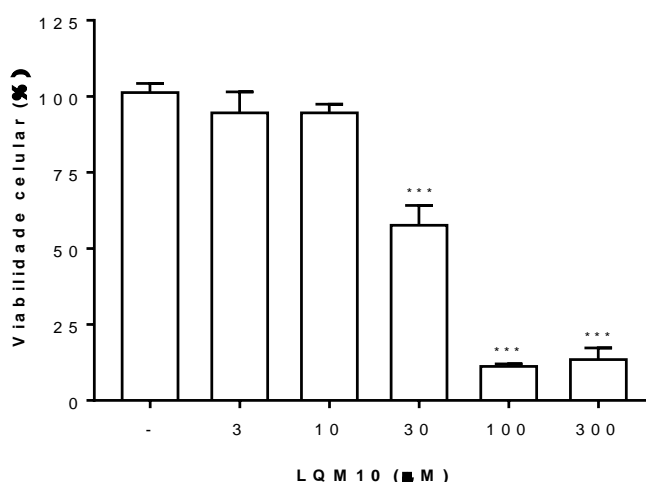


Os animais foram tratados com veículo (barra branca), LQM10 (barras hachuradas) ou indometacina (barras pretas) antes do estímulo. Dados expressos por média  $\pm$  EPM. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.2.2 Avaliação da viabilidade das células A549 após exposição com LQM10

Com o objetivo de avaliar o efeito direto do LQM10 sobre a viabilidade de células A549, foi realizado o ensaio de MTT. Como apresentado na Figura 19, o tratamento de células A549 com LQM10 por 24 horas resultou em redução da viabilidade de maneira dependente de concentração, uma vez que as concentrações de 3 e 10  $\mu\text{M}$  não afetaram a viabilidade, ao contrário das concentrações de 30, 100 e 300  $\mu\text{M}$ , que reduziram de forma significativa a viabilidade das células. A partir daqui, decidimos utilizar valores abaixo da concentração de 10  $\mu\text{M}$  de LQM10 para os próximos ensaios.

**Figura 19.** Efeito do LQM10 sobre a viabilidade de células A549.



Após 24 h de exposição ao LQM10 a viabilidade foi mensurada pelo método do MTT. Grupo controle foi composto por células mantidas apenas com meio de cultura (barra branca). O gráfico representa valores obtidos de três experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,001$  comparados ao controle (células sem tratamento).

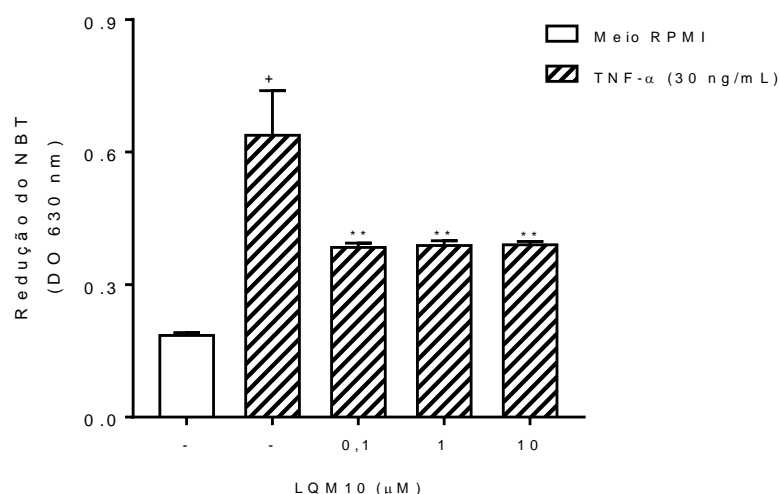
### 5.2.3 Efeito do LQM10 sobre a produção de ERO em células A549

Uma vez que o tratamento das células A549 com LQM10 nas concentrações inferiores a 10  $\mu\text{M}$  não causaram alterações significativas na viabilidade das células, decidimos por usar as concentrações de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  para avaliar o efeito do LQM10 sobre a produção das espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$  (30 mg/mL). Conforme apresentado na Figura 20, células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$  por 24 h exibiram uma significativa produção de ERO quando comparado



com células sem estímulo. Quando células pré-tratadas com 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  de LQM10 foram estimuladas com TNF- $\alpha$  foi possível observar uma redução significativa na geração de ERO que se mostrou independente de concentração (Figura 20).

**Figura 20.** Efeito do tratamento com LQM10 sobre a produção de ERO em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ .

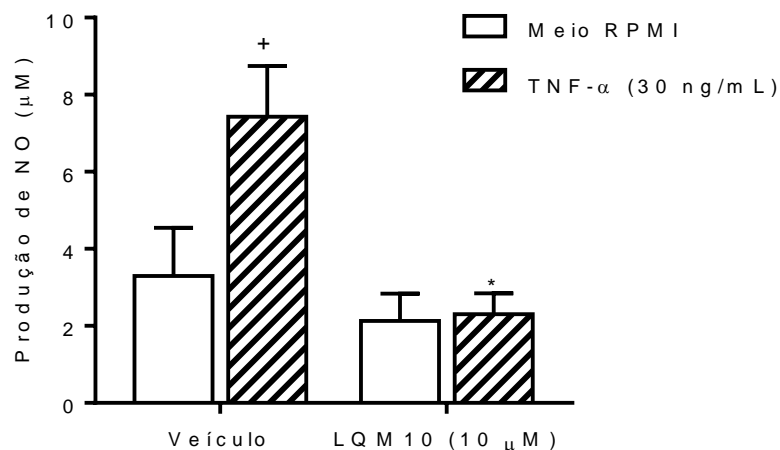


A quantificação de ERO foi realizada pelo método do NBT no sobrenadante das células mantidas sob 24 h de exposição ao TNF- $\alpha$ . O resultado representa três experimentos independentes. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. \*\*  $p < 0,01$  comparado as células estimuladas e não tratadas.

#### 5.2.4 Efeito do LQM10 sobre a produção de NO em células A549

Uma vez que LQM10 reduziu a produção de ERO em todas as concentrações avaliadas, decidimos verificar se o tratamento das células A549 com LQM10 também afetaria a produção de óxido nítrico. Conforme apresentado na figura 21, o tratamento de células A549 foi capaz de induzir a produção de NO em comparação com células não estimuladas (controle). O pré-tratamento de células A549 com 1  $\mu\text{M}$  de LQM10 não interferiu nos níveis basais de produção de NO, porém quando as células foram estimuladas com TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) houve uma significativa redução na produção de NO (Figura 21).

**Figura 21.** Efeito do LQM10 sobre a produção de NO em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ .

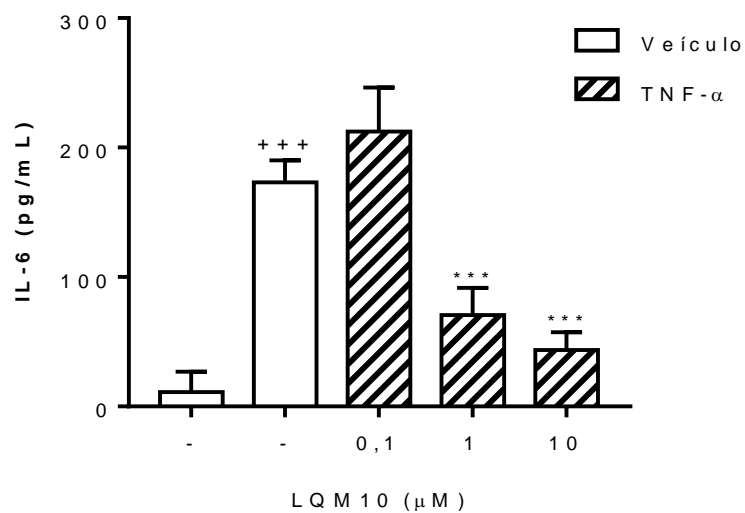


A quantificação de NO foi realizada pelo método do Griess no sobrenadante das células mantidas sob 6 h de exposição ao TNF- $\alpha$ . O resultado representa três experimentos independentes. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. +  $p < 0,01$  comparado as células não estimuladas. \*  $p < 0,01$  comparado com células estimuladas e não tratadas.

#### 5.2.5 Efeito do LQM10 sobre a produção de IL-6 em células A549 estimuladas

Com propósito de verificar se os efeitos do LQM10 em inibir a geração de mediadores pró-inflamatórios também se estende a produção de citocinas, decidimos avaliar o efeito do tratamento com LQM10 sobre a produção de IL-6 em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ . Como apresentado na figura 22, a estimulação de células A549 com TNF- $\alpha$  por 24 h foi capaz de induzir um aumento significativo na produção de IL-6. O pré-tratamento com LQM10 na concentração de 0,1  $\mu$ M não interferiu na produção dessa citocina quando comparado com as células estimuladas sem tratamento, entretanto, quando as células foram pré-tratadas com LQM10 nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M ocorreu uma redução significativa na produção de IL-6 por células A549 estimuladas (Figura 22).

**Figura 22.** Efeito do LQM10 sobre a produção de IL-6 em células A459 estimuladas com TNF- $\alpha$ .



A quantificação de IL-6 foi realizada por ELISA a partir do sobrenadante das células mantidas sob 24 h de exposição ao TNF- $\alpha$  ou ao veículo. O resultado representa três experimentos independentes. Diferenças significativas determinadas por teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Kewls. +++ p < 0,001 comparado as células não estimuladas. \*\*\* p < 0,001 comparado com células estimuladas e não tratadas.

## 6 DISCUSSÃO

A resposta nociceptiva é decorrente da ação de vários mediadores químicos atuando em sítios periféricos, medulares ou centrais. O modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético avalia a resposta motora decorrente de um estímulo nociceptivo aplicado por via intraperitoneal. Em camundongos, esta resposta caracteriza-se por contorções do abdômen seguida de extensão de uma ou ambas as patas. Este modelo geralmente utiliza o ácido acético e é usado para testes de triagem, pois a nocicepção é produzida por um conjunto de eventos, neurotransmissores e neuromoduladores, sendo sensível a analgésicos centrais e/ou periféricos (LE BARS et al., 2001). O teste de contorções abdominais é amplamente empregado para o *screening* de novos agentes terapêuticos com propriedades analgésicas ou anti-inflamatórias (TJOLSEN; HOLE et al., 1997). Já foi demonstrado que a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal promova a dor visceral devido à liberação local de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, substância P, prostaglandinas e citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 a partir de macrófagos residentes na cavidade peritoneal (IKEDA et al., 2001).

Nosso estudo demonstrou que as doses testadas de LQM10 apresentaram um efeito antinociceptivo de maneira dependente de dose no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Buscando investigar o envolvimento dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, muscarínicos e canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, constatamos que o pré-tratamento com os respectivos antagonistas, ioimbina, atropina e glibenclamida não reverteu os efeitos antinociceptivos do LQM10, sugerindo que estas vias classicamente relacionadas na percepção do estímulo nociceptivo não se mostram envolvidos na atividade antinociceptiva do LQM10.

Para se obter um teste mais específico, pode-se substituir o ácido acético por outro estímulo como a capsaicina (FRIAS e MERIGHI), 2016. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida) é a substância pungente encontrada em diversas espécies de pimentas do gênero *Capsicum* (LECCI et al., 2010). A nocicepção induzida pela capsaicina decorre da ativação de receptores vaniloides (TRPV1) causando acúmulo de Ca<sup>+2</sup> intracelular, gerando a liberação diversos mediadores químicos que resultam no comportamento nociceptivo (CHEN et al., 2008). Partindo para investigar a

resposta nociceptiva dependente deste receptor específico, seguimos para avaliar o efeito do LQM10 na nocicepção induzida pela capsaicina. Em nosso estudo, o tratamento com LQM10 reduziu o comportamento nociceptivo desencadeado pela capsaicina sugerindo que o efeito antinociceptivo deste derivado de guanilhidrazona mostra-se depender da via de sinalização evocada pelos receptores TRVP1. Além disso, já foi reportado também que a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de capsaicina mostra-se mediada, pelo menos em parte, pela produção de óxido nítrico, glutamato e aspartato além dos neuropeptídios (substância P, NKB, NKA e CGRP) (CHEN et al., 2008). Portanto, não se pode desconsiderar que os efeitos observados após o tratamento com LQM10 possam depender de uma possível inibição na produção de óxido nítrico e/ou neuropeptídios.

Buscando expandir as informações sobre os efeitos antinociceptivos do LQM10 decidimos avaliar o envolvimento das vias centrais de nocicepção utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo estímulo térmico (placa quente). Neste modelo, a temperatura (54 °C) provoca a ativação imediata dos nociceptores periféricos conduzindo o impulso nociceptivo ao SNC, que em resposta imediata emite o sinal aos tecidos periféricos na tentativa de afastar rapidamente o organismo do contato com o agente agressor (BANNON e MALMBERG, 2007; JULIUS; BASBAUM, 2001). Onde se avalia o tempo de latência que o animal apresenta quando colocado sobre a superfície aquecida O tratamento com LQM10, não provocou alterações significativas sobre a percepção do estímulo térmico como nocivo pelos animais, um indicativo de que seus efeitos antinociceptivos não se mostram dependentes de mecanismos centrais de percepção da dor.

Para avaliar a atividade antinociceptiva o teste da formalina é classicamente empregado. Este modelo caracteriza-se pela injeção de formalina na pata traseira do camundongo. É um modelo bifásico, ou seja, na primeira fase que acontece até 5 min após a injeção da formalina, há um caráter neurogênico e é sensível a analgésicos opioides. Já a segunda fase que acontece entre 15 a 20 min após estímulo (formalina) é sensível a analgésicos não-esteroidais. O índice de nocicepção é avaliado pelo tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a para injetada (BANNON e MALMBERG, 2007).

O teste de formalina foi utilizado a fim de avaliar em que fase da dor (neurogênica ou inflamatória) o LQM10 exerce seus efeitos antinociceptivos. A nocicepção bifásica induzida pela formalina é distinguida, primeiramente, em decorrência da ativação direta dos nociceptores periféricos (FAP's do tipo C e A $\delta$ ). A segunda fase é marcada pela estimulação de diversos mediadores inflamatórios. Se apresentando como uma estratégia útil para a distinção de substâncias com diferentes potenciais analgésicos, central – atenuando a resposta nociceptiva em ambas as fases do teste – e periférica, atuando apenas na segunda fase (HUNSKAAR et al., 1987; SANTOS; CALIXTO, 1997). Nossos resultados revelaram que o LQM10 se mostrou efetivo em reduzir o comportamento nociceptivo dos animais apenas na segunda fase (inflamatória) do teste de formalina. Estes dados reforçam que os efeitos antinociceptivos relacionados ao derivado guanilhidrazona LQM10 são independentes de vias centrais de nocicepção, atuando em vias periféricas, decorrente da liberação de mediadores inflamatórios no tecido.

Substâncias capazes de induzir sedação ou algum impedimento motor podem interferir diretamente na interpretação de resultados que dependem do comportamento para expressar dor (STONE et al., 2014). Para assegurar que os resultados detectados são decorrentes da atividade antinociceptiva do LQM10 e não de uma interferência na atividade motora dos animais, utilizamos o teste de rotarod. Neste modelo, o tratamento com derivado guanilhidrazona LQM10 não afetou a capacidade motora dos animais, o que reforça os efeitos antinociceptivos do LQM10.

Estudos prévios reportam que substâncias capazes de apresentar um efeito antinociceptivo na fase inflamatória do modelo de formalina comumente atuam sobre mediadores inflamatórios (FERRO *et al.*, 2015). Com isso, seguimos para investigar se os efeitos do LQM10 se estenderiam para inibir a resposta inflamatória. Inicialmente, buscamos avaliar se o LQM10 teria algum efeito na formação do edema de pata induzido por carragenina. A carragenina é um agente flogístico capaz de evocar um processo inflamatório caracterizado inicialmente pelo exsudato de fluído rico em proteínas e grande número de neutrófilos (LO et al., 1982). Vários fatores estão relacionados à inflamação aguda gerada pela injeção de carragenina, entre eles a liberação inicialmente de histamina e serotonina, e posteriormente de bradicinina e prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971). Nossos resultados revelaram que o

tratamento com LQM10 preveniu substancialmente a formação do edema, comprovando sua atividade anti-edematogênica e evidenciando seu potencial anti-inflamatório. De forma interessante, estudos recentes têm demonstrado que receptores vaniloides também estão envolvidos com a formação de edema induzido por carragenina (FLYNN et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018). Esta informação parece reforçar os efeitos anti-inflamatórios do LQM10, entretanto, experimentos adicionais são necessários para comprovar esta proposta.

Dando seguimento aos experimentos para verificar os efeitos anti-inflamatórios do LQM10. Seguimos para realizar estudos *in vitro* utilizando células A549. Esta linhagem celular A549 foi a escolhida para o desenvolvimento deste estudo por tratar de uma linhagem epitelial amplamente utilizada para estudos *in vitro* que visam investigar potencial anti-inflamatório de substâncias obtidas a partir de síntese química ou fontes naturais (SOUFFRIAU et al, 2018). Em nosso estudo, observamos que o tratamento de células A549 com LQM10 reduziu a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) induzida pela estimulação com TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$ , é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir um vasto elenco de respostas biológicas, incluindo proliferação, apoptose, inflamação e geração de ERO (WOO et al., 2000). Já foi evidenciado que TNF- $\alpha$  mostra-se capaz de induzir estresse oxidativo em de células inflamatórias (LEE et al., 2009). Lee e colaboradores (2013) demonstraram que TNF- $\alpha$  induz a ativação da enzima NADPH oxidase, conseqüente geração de ERO e expressão de ICAM-1 em células A549. Em sintonia com este estudo, nossos resultados demonstraram que a estimulação de células A459 com TNF- $\alpha$  também resultou na produção de ERO e NO, fenômenos que foram inibidos pelo tratamento com LQM10. Apesar de não estar esclarecido os mecanismos moleculares capazes de induzir estes efeitos do LQM10, é possível sugerir uma possível interferência na formação do complexo TNFR1/TRAF2/Rac1/p47<sup>phox</sup> que ativa a NADPH oxidase em células A549 quando estimuladas com TNF- $\alpha$  (LIU et al., 2000). Essa interferência poderia ocorrer tanto através do bloqueio do receptor TNFR1 que inicia a formação do complexo ou na inibição da própria enzima NAPDH oxidase, ou ainda o efeito direto da molécula através do sequestro desses radicais livres. Entretanto experimentos adicionais são necessários para investigar esta suposição.

Muitas citocinas inflamatórias, como o próprio TNF- $\alpha$ , podem gerar ERO (LEE et al., 2013) e induzir a geração destas espécies, bem como ativar NF $\kappa$ B em células A549 (JANG et al., 2012). Este fator transcricional, NF $\kappa$ B, medeia a expressão de vários genes pró-inflamatórios a partir da ativação de receptores de TNF- $\alpha$ . Está bem estabelecido que a ativação de células A549 por TNF- $\alpha$  induz a via canônica de ativação do NF $\kappa$ B para induzir a ativação de vários genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6, que possui na região promotora do seu gene um sítio de ligação para o NF $\kappa$ B (BRASIER, 2010). A IL-6, como outras citocinas pró-inflamatórias, mostra-se importante pelo seu papel na iniciação e propagação da inflamação. A IL-6 vem sendo considerada, na prática clínica, um importante biomarcador para prognóstico de pacientes portadores de doenças como a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (BUTT et al., 2015). Wang e colaboradores (2019) recentemente propuseram que em células A549 a fumaça do cigarro é um oxidante direto, que induz estresse oxidativo e inflamação pulmonar, uma vez que as ERO atuam nas vias de TRPV1 para iniciar o inflamassoma NLRP3, que estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias seguida pela ativação da caspase-1, levando a secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18. Mostrando uma correlação da inflamação das vias aéreas associadas ao estresse oxidativo através da via do receptor TRPV1. Nossos resultados revelaram que o derivado de guanilhidrazona LQM10 mostrou-se capaz de inibir a produção de IL-6, o que reforça seu papel anti-inflamatório. A partir das informações acima, não se pode descartar o possível efeito do LQM10 em inibir outros parâmetros da resposta inflamatória.



## 7 CONCLUSÃO

Em conjunto, estes resultados apresentam, pela primeira vez, que derivado guanilhidrazona 2-[(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida, denominado de LQM10, possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória quando avaliados em diferentes modelos experimentais. Apesar deste derivado de guanilhidrazona mostrar-se como um potencial candidato para o manejo de desordens inflamatórias, estudos adicionais são necessários a fim de caracterizar os possíveis alvos moleculares e vias de sinalização responsáveis pelos efeitos do LQM10.

## 8 PERSPECTIVAS

Apresentamos nesse trabalho as primeiras evidências de que o derivado de guanilhidrazona 2-[(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)metileno]hidrazinacarboximidamida, denominado LQM10, possui efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório, porém os alvos celulares e moleculares envolvidos não foram completamente elucidados. Está bem posto que o efeito antinociceptivo de LQM10 ocorre periféricamente, independente de vias centrais. Além disso, os efeitos sobre a redução de outros mediadores e parâmetros inflamatórios importantes como a inibição de ERO e NO em células A549 ativadas, nos levam a crer que o derivado de guanilhidrazona pode ter atividade sobre a modulação de sistemas de enzimas anti-oxidantes e/ou anti-inflamatórias como SOD, GRO- $\alpha$ , iNOS, COX-2, e MCP-1, bem como a possível interferência na formação do complexo TNFR1/TRAF2/Rac1/p47<sup>phox</sup> que ativa a NADPH oxidase em células A549 quando estimuladas com TNF- $\alpha$ , fenômenos estes que serão esclarecidos através de ensaios de PCR *in vitro*.

Uma vez que ficou comprovado o efeito antiedematogênico de LQM10, estudos *in vivo* adicionais serão desenvolvidos a fim de investigar mais detalhadamente a interferência do LQM10 sobre a produção de mediadores inflamatórios importantes, como IL-1, IL-8 e IL-10. Adicionalmente, modelos *in vivo* capazes de mensurar o influxo de células inflamatórias como pleurisia, são relevantes para melhor compreensão dos efeitos anti-inflamatórios promissores identificados até o presente.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. **Cell Mol Neurobiol.**, v.20, n.2, p.131-47, 2000.
- ABDEL-RAHMAN, E.; BOLTON, W. K. Pimagedine: a novel therapy for diabetic nephropathy. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 4, p. 565-74, 2002.
- ATKINS MB, REDMAN B, MIER J, GOLLOB J, WEBER J, SOSMAN J, MACPHERSON BL, PLASSE T. A phase I study of CNI-1493, an inhibitor of cytokine release, in combination with high-dose interleukin-2 in patients with renal cancer and melanoma. **Clin Cancer Res** v. 7, p.486–492, 2001.
- AZEVEDO DE BRITO, W.; DANTAS, M.G.; NOGUEIRA, F.H.A.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; AQUINO, T.M.; RIBEIRO, Ê.A.N.; ARAGÃO, C.F.S.; GOMES, A.P.B. Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanyldihydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.
- BALDWIN AS Jr: Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **J Clin Invest** v.107, p. 3-6, 2001.
- BAI, G.; REN, K.; DUBNER, R. Epigenetic regulation of persistent pain. **PMC**, v.165, n.1, p.177-199, 2015.
- BANNISTER, K.; DICKENSON, A.H. What do monoamines do in pain modulation? **Curr Opin Support Palliat Care**, v.10, n.2, p.143-8, 2016.
- BANNON, A.W.; MALMBERG, A.B. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, Chp. 8, unit 8.9, 2007.
- BASIT A, REUTERSHAN J, MORRIS MA, SOLGA M, ROSE JR CE, LEY K. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** v.291, n.2, p. L200–7, 2006.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n.9164, p.1610-5, 1999.
- BERNADETTE A. MITCHELL, MELISSA H. BROWN, AND RONALD A. SKURRAY. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanyldihydrazones. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* Feb. 1998, p. 475–477.
- BIANCHI, M., BLOOM, O., RAABE, T., COHEN, P. S., CHESNEY, J., SHERRY, B., SCHMIDTMAYEROVA, H., CALANDRA, T., ZHANG, X., BUKRINSKY, M.; ULRICH, P.; CERAMI, A.; TRACEY, K.J. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanyldihydrazone. **J. Exp. Med**, v.183, n.3, p.927-936 1996.

BRASIER, A. R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **Cardiovasc Res**, v.86, n.2, p.211-8, 2010.

BUTT Y FAU - KURDOWSKA, A.; KURDOWSKA A FAU - ALLEN, T. C.. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Arch Pathol Lab Med**, v.140, n.4, p.345-50, 2016.

CAI, Z. S.; SUN, Y. M.; YANG, C.; ZHU, X. Preparation, Characterization, and Antibacterial Activities of Para-Biguanidinyl Benzoyl Chitosan Hydrochloride. **Polymers Bulletin**, v. 70, p.1085-1096, 2013.

CERUTTI PA: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381, 1985

CHENG, J.K.; JI, R.R.; Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Nerochem Res**, v.33, n.10, p.1970-8, 2008.

COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemoter**, v.32, n.2, p.295-310, 1968.

CORMAN, B.; DURIEZ, M.; POITEVIN, P.; HEUDES, D.; BRUNEVAL, P.; TEDGUI, A.; LEVY, B.I. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, n.3, p.1301-6, 1998.

CUI, M.; GOSU, V.; BASITH, S.; HONG, S.; CHOI, S. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Nociceptor: Structure, Modulators, and Therapeutic Applications. **Adv Protein Chem Struct Biol**. v. 104, p. 81-125, 2016.

EDVINSSON, L. Tracing neural connections to pain pathways with relevance to primary headaches. **Cephalalgia**, v.31, n.6, p. 737-47, 2011.

EISENBERG, E.; MCNICOL, E. D.; CARR, D. B. Efficacy and safety of opioid agonists in the treatment of neuropathic pain of nonmalignant origin: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*, v. 293, n. 24, p. 3043-52, Jun 2005.

EPIFÂNIO, WAN. Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos. **Dissertação de mestrado** (Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, 2011

FERRO, J. N.; De AQUINO, F.L.; De BRITO, R.G.; DOS SANTOS, P.L.; QUINTANS JDE, S.; SOUZA, L.C.; ARAÚJO, A.F.; DIAZ, B.L.; LUCCA-JÚNIOR, W.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BARRETO, E. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 12, p. 1287-95, 2015.

FESTIC E, CARR GE, CARTIN-CEBA R, HINDS RF, BANNER-GOODSPEED V, BANSAL V, ASUNI AT, TALMOR D, RAJAGOPALAN G, FRANK RD, GAJIC, O.; MATTHAY, M.A. LEVITT, J.E. Randomized clinical trial of a combination of an inhaled corticosteroid and Beta agonist in patients at risk of developing the acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, v. 45, n.5, p. 798-805, 2017.

FLYNN, R.; CHAPMAN, K.; IFTINCA, M.; ABOUSHOUSA, R.; VARELA, D.; ALTIER, C. Targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) assembly domain attenuates inflammation-induced hypersensitivity. **J Biol Chem**. v.289, n.24, p.16675-87, 2014.

FULLER, P. J.; YOUNG, M. J. Mechanisms of mineralocorticoid action. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1227-35, 2005.

FRANÇA, P.H.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; AQUINO, P.G.V.; SANTANA, A.E.G.; FERRO, J.N.S.; BARRETO, E. O.; PESSOA, C.; MEIRA, A.S.; AQUINO, T.M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; SCHIMITT, M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylylhydrazone derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 66, n. 1, 2016.

FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, Nociception and Pain. LID - 10.3390/molecules21060797 [doi] LID - E797 [pii]. n. 1420-3049 (Electronic), Ghosh S, May MJ and Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260, 1998.

GOLAN, D.E. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2009.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J.A.; SCHIMIDT, A.M.; CREAGER, M.A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v.114, n.6, p.597-605, 2006.

GONCALES, C.E.; ARALDI, D.; PANATIERI, R.B.; ROCHA, J.B.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antinociceptive properties of acetylenic thiphenes and furan derivatives: evidence for the mechanism of action. **Life Sci**, v.76, n.19, p.2221-34, 2005.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [<sup>15</sup>N]Nitrate in Biological Fluids. **Anal Biochem** v.126, n.1, p.131- 138, 1982.

HAGIWARA, T.; YOSHIDA, S.; HIDAKA, Y. Gene expression. Of the concentration-sensitive sodium channel is suppressed in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Exp Lung Res.**, v.43, n.3, p.150-157, 2017.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n.1, p.103-14, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v.69, n.24, p. 2911-9, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I.; Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-10, 2001.

KIM I, MOON SO, KIM SH, KIM HJ, KOH YS, KOH GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor- $\kappa$ B activation in endothelial cells. **J Biol Chem** v.276, n.10, p.7614-20, 2001.

KIKKAWA, Y.; YONEDA, K.; SMITH, F.; PACKARD, B.; SUZUKI, K. The type II epithelial cells of the lung. II. Chemical composition and phospholipid synthesis. **Lab Invest**. v.32, n.3, p.295-302, 1975.

KLAUS, M.H.; CLEMENTS, J.A.; HAVEL, R.J. Composition of surface-active material isolated from bee lung. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.47, p.1858-9, 1961.

KONOPKA RJ FAU - BENZER, S.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. n. 0027-8424 (Print),

KURAIISHI, Y.; HARADA, Y. ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Res**, v.273, n.2, p.245-52, 1983.

LAZAAR AL, PANETTIERI RA JR. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.116, n.3, 488-95, 2005.

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

LEE IT, LUO SF, LEE CW, WANG SW, LIN CC, CHANG CC, CHEN, Y.L.; CHAU, L.Y.; YANG, C.M. Overexpression of HO-1 protects against TNF- $\alpha$ -mediated airway inflammation by down-regulation of TNFR1-dependent oxidative stress. **Am J Pathol** v.175, n.2, p.519-32, 2009.

LECCI, A. Antinociceptive and pro-inflammatory roles for NPY Y(1) receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 5, p. 221, May 2001.

LEE IT, LEE CW, TUNG WH, WANG SW, LIN CC, SHU JC, et al. Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rac1 in lipoteichoic acid-induced cPLA2/COX-2-dependent airway inflammatory responses. **Am J Pathol** 2010;176:1671-84.

LEMKE, K.A. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. **Can Vet J**, v.45, n.5, p.405-13, 2004.

LEUNG, K. (99m)Tc-Fucoidan, a polysaccharidic ligand of P-selectin BTI- Molecular Imaging and contrast agent database. **MICAD**, 2012.

LIEBER, M.; SMITH, B.; SZAKAL, A.; NELSON-REES, W.; TODARO, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **Int J Cancer**, v.17, n.1, p.62-70, 1976.

LIN CC, LEE CW, CHU TH, CHENG CY, LUO SF, HSIAO LD, YANG, C.M. Transactivation of Src, PDGF receptor, and Akt is involved in IL-1 $\beta$ -induced ICAM-1 expression in A549 cells. **J Cell Physiol** v.211, n.3, p. 771-80, 2007.

LIN FS, LIN CC, CHIEN CS, LUO SF, YANG CM. Involvement of p42/p44 MAPK, JNK, and NF- $\kappa$ B in IL-1 $\beta$ -induced ICAM-1 expression in human pulmonary epithelial cells. **J Cell Physiol** v.202, n.2, p.464-73, 2005.

LIN CC, TSENG HW, HSIEH HL, LEE CW, WU CY, CHENG CY, YANG, C.M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor- $\kappa$ B in A549 cells. **Toxicol Appl Pharmacol** v.229, n.3, p.386–98, 2008.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221, n. 1, p. 261-7, 1982.

LÖWENBERG M, VERHAAR A, VAN DEN BLINK B, TEN KATE F, VAN DEVENTER S, PEPPELENBOSCH M, HOMMES D. Specific inhibition of c-Raf activity by semapimod induces remission in severe Crohn's disease. **J Immun** v.175, n.4, p.2293–300, 2005.

MARSHALL RP, BELLINGAN G, WEBB S, PUDDICOMBE A, GOLDSACK N, MCANULTY RJ, LAURENT GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1783–8

MASON, R.J. Biology of alveolar type II cells. **Respirology**. v.11, p.S12-S15, 2006.

MASON, R.J. Disaturated lecithin concentration of rabbit tissues. **Am Rev Respir Dis**. v.107, n.4, p.678-9, 1973.

MOORE, K.A.; KOHNO, T.; KARCHEWSKI, L.A.; BABA, H.; WOOLF, C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **J Neurosci**, v.22, n.15, p.6724-31, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OCHS, M.; KNUDSEN, L.; HEGERMANN, J.; WREDE, C.; GROTHAUSMANN, R.; MÜHLFELD, C. Using electron microscopes to look into the lung. **Histochem Cell Biology**. v.146, n.6, p.695-707, 2016.

OLIVEIRA, P.A.; de ALMEIDA, T.B.; OLIVEIRA, R.G.; GOLÇALVES, G.M.; OLIVEIRA, J.M.; NEVES DOS SANTOS, B.B.; LAUREANO-MELO, R.; CÔRTEZ, W.D.S.; FRANÇA, T.D.N.; VASCONCELLOS, M.L.A.A.; MARINHO, B.G. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of piperic acid: Involvement of the cholinergic and vanilloid systems. **Eur J Pharmacol**. v.834, p.54-64, 2018.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discov Today**, v.10, n.7, p.495-502, 2005.

PIERCE JW, READ MA, DING H, LUSCINSKAS FW AND COLLINS T: Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. **J Immunol** v.156, n.10, p.3961-3969, 1996.

PINHATTI, V. R. et al. Cytotoxic, mutagenicity, and genotoxicity effects of guanylhydrazone derivatives. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 806, p. 1-10, 2016.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SANDES, S. M. S.; HEIMFARTH, L.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L; GOUVEIA, D.N.; CARVALHO, A.M.S.; QUINTANS, J.S.S.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; AQUINO, T.M.; FRANÇA, P.H.B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; ZENGIN, G.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J.J.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Evidence for the involvement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of indole-3-guanylhydrazone hydrochloride, an aromatic aminoguanidine, in rodents. **Chemico-Biological Interactions**, v. 286, p. 1-10, 2018.

SANTANA, C.C.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; SANTOS, J.C.N.; RODRIGUES, É.E.D.S.; SILVA, I.M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; NASCIMENTO, T.G.; OLIVEIRA BARBOSA, L.A.; DORNELAS, C.B. Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorg Chem**, v. 87, p. 169-180, 2019.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381-9, Aug 1997.

SCHULTZ, M. Rudolf Virchow. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 1480-1481, 2008.



SIEGMUND, E. CADMUS, R.; LU, G. A method for evaluating both non narcotic and narcotic analgesics. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 95, n.4, p.729-31, 1957.

SOUFFRIAU, J.; EGGERMONT, M.; VAN RYCKEGHEM, S.; VAN LOOVEREN, K.; VAN WYNGENE, L.; VAN HAMME, E.; VUYLSTEKE, M.; BEYAERT, R.; De BASSCHER, K.; LIBERT, C. A screening assay for Selective Dimerizing Glucocorticoid Receptor Agonists and Modulators (SEDIGRAM) that are effective against acute inflammation. **Sci-Rep.** v.8, n.1, 2018.

SPOCUA M., HOEIJMAKERS, J.G.J.; MERKIES, I.S.J.; LAURIA, G.; WAXMAN, S.G. Small-fiber neuropathy: Expanding the clinical pain universe. **J Peripher Nerv System**, v. 24, n.1, p.19-33, 2019.

STAUDACHER, A.G.; STEVENS, W.W. Sinus infections, inflammation and asthma. **Immunol Allergy clin North Am.**, v.39, n.3, p.403-415, 2019.

STEINBERG KP, HUDSON LD, GOODMAN RB, HOUGH CL, LANKEN PN, HYZY R, THOMPSON BT, ANCUKIEWICZ M, NATIONAL HEART L. Blood institute acute respiratory distress syndrome clinical trials N: efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2006;354:1671–84

STONE, L.S.; GERMAN, J.P.; KITTO, K.F.; FAIRBANKS, C.A.; WILCOX, G.L.; DATTA, P.K. Morphine and Clonidine Combination Therapy Improves Therapeutic Window in Mice: Synergy in Antinociceptive but Not in Sedative or Cardiovascular Effects. **PLoS One**, v.9, n.10, 2014.

SUISSA, S.; ERNST, P. Inhaled corticosteroids: impact on asthma morbidity and mortality. **J Allergy Clin Immunol**, v. 107, n. 6, p. 937-44, 2001.

SUNG, J.J.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Aliment Pharmacol.** v.29, n.9, p. 938-46, 2009.

THILLE AW, ESTEBAN A, FERNÁNDEZ-SEGOVIANO P, RODRIGUEZ JM, ARAMBURU JA, VARGAS-ERRÁZURIZ P, MARTÍN-PELLICER A, LORENTE JA, FRUTOS-VIVAR F. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med.* 2013;1:395–401

Tjølsen A., Hole K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson A., Besson JM. (eds) *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 130. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997.

TRELLE, S.; REICHENBACH, S.; WANDEL, S.; HILDEBRAND, P.; TSCHANNEN, B.; VILLIGER, P.M.; EGGER, M.; JÜNI, P. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. **BMJ.** v. 342, 2011.

VERHAGEN, A.P.; DAMEN, L.; BERGER, M.Y.; LENSSINCK, M.L.; PASSCHIER, J.; KROES, B.W. Treatment of tension type headache: paracetamol and NSAIDs work: a systematic review. *Ned Tijdschr Geneeskd.* v.154, 2010.

WANG; LIU, ZHU, PEIJIAN WANG, DAOYAN LIU AND ZHIMING ZHU. Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel in Cardiometabolic Protection. *J Korean Soc Hypertens.* v.17, n. 2, p. 37-47, 2011.

WONG, F. F.; CHEN, C. Y.; LIN, H. C.; HUANG, Y. Y.; CHEN, K. L.; HUANG, J. J.; YEH, M. Y.; 'One-flask' transformation of isocyanates and isothiocyanates to guanidines hydrochloride by using sodium bis(trimethylsilyl)amide. *Tetrahedron*, v.66, p. 1892-1897, 2010.

WOO CH, EOM YW, YOO MH, YOU HJ, HAN HJ, SONG WK, YOO YJ, CHUN JS, KIM JH. Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J Biol Chem* v.275, n.41, p.32357-62, 2000.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, v.152, n.3, p. 2-15, 2011.

YAN, S.D.; SCHMIDT, A.M.; ANDERSON, G.M.; ZHANG, J.; BRETT, J.; ZOU, Y.S.; PINSKY, D.; STERN, D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, v.269, n.13, p.9889-97, 1994.

ZEMANS, R.L.; MATTHAY, M.A. Bench-to-beside review: The role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute injury. *Critical Care* v.8, n.6, p. 469-477, 2004.

ZHOU, H.Y.; CHEN, H.; PAN, H.L. The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. *J Neurochem*, v.108, n.1, p. 305-18, 2009.