



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**YOLANDA KARLA CUPERTINO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
NOVOS PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

**Maceió-AL**

**2014**



## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**YOLANDA KARLA CUPERTINO DA SILVA**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor**

**Área de concentração: Biotecnologia em saúde**

**Linha de pesquisa:** Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes de diagnósticos

**Prof. Orientador:** Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

**Prof. Co orientador (a):** Dra. Lidia Moreira Lima

**Maceió-AL**

**2014**

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

**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

- S586a Silva, Yolanda Karla Cupertino da.  
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos protótipos de fármacos / Yolanda Karla Cupertino da Silva. – 2014.  
141 f. : il.
- Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
Co-orientadores: Lidia Moreira Lima.  
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2013.
- Bibliografia: f. 92-103.  
Anexos: f. 104-141.
1. Atividade antinociceptiva. 2. Anti-inflamatórios – Avaliação farmacológica. 3. Hidrazonas. 4. Aminoquinolinas. 5. 3-amino-2-acilidrazonas-tiofeno. 6. 4-aminoquinolínicos . I. Título.

CDU: 54:615.276

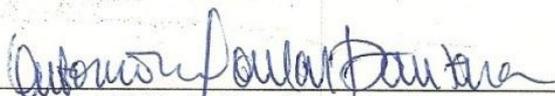
YOLANDA KARLA CUPERTINO DA SILVA

**Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos  
protótipos de fármacos**

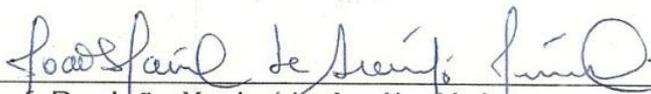
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 30/05/2014.

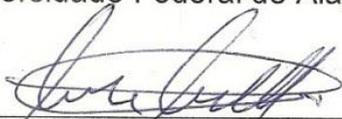
BANCA EXAMINADORA



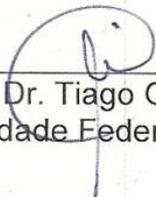
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana (Presidente)  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

**Dedico essa tese a minha querida  
mãe (*in memoriam*), que durante  
sua vida toda fez tudo por mim.  
Mamãe, eu te amo para sempre!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e permissão que eu realizasse mais um sonho em minha vida;

A minha mãe Maria Deusa por toda a dedicação e amor inigualável durante toda a sua vida;

A minha filha Larissa Beatriz, o meu maior presente, a minha vida. Tudo o que eu faço é para vocês e por vocês;

Ao amor da minha vida, meu marido, meu melhor amigo, Leandro Nunes, por todo seu amor, apoio e dedicação a nossa família ao longo desses anos;

A minha afilhada Bellynha por todo amor a mim dedicado;

A minha família que sempre acreditara e me apoiara em todas as etapas da minha vida, em especial minhas tias e tios que mesmo alguns já tendo partido para o plano superior se encontram perto de mim, em meu coração, na minha memória;

Aos meus avós *in memoriam*: Maria Cecília, José Cupertino, Pertunílio Ferreira e Eudócia por todo amor as nossas famílias;

A todos os primos e em especial Damião Márcio por todos os anos de convivência e momentos bons que passamos juntos;

A todas as primas e em particular: Fabiana Cupertino, Luciana Débora, Maria Cecília, Maria Gabriella e Maria Goreth, por tudo que existe na nossa amizade;

A toda a família do meu amado marido, especialmente minha cunhada Lívia Maria, minha sogra Lourdinha, meu sogro Vicente Nunes e meu cunhado Dowell Pinheiro;

A professora Magna Suzana por tudo que fizera por mim todo esse tempo, pela sua dedicação ao meu crescimento científico, não apenas como minha orientadora, mas como uma amiga, pelo apoio sempre em todos os momentos, muito obrigada;

A toda equipe do LASSBio®, especialmente à minha co-orientadora Professora Lídia Moreira, Professor Eliezer Barreiro, sua aluna Marina Amaral e a Christian Tadeo;

Ao professor Mario Meneghetti e sua aluna Raquel de Menezes pela síntese dos derivados aminoquinolínicos, pela paciência e pela disponibilidade;

A professora Eliane Campesatto por todos os ensinamentos de farmacologia e disponibilidade sempre em ajudar;

A minha amiga-irmã Gabriela Muniz por todo o companheirismo e amor, você sem dúvida é a irmã que eu não tive;

A minha amiga Ana Carolina Santana Vieira por todos os momentos maravilhosos, respeito, compreensão e carinho ao longo desses quatro anos de amizade;

Aos meus queridos amigos Luiz Henrique Agra, Carolina da Matta, Aline Queiroz, Alice Falcão, Morgana Vital, Thays Dias, Max Viana, Thiago Matos, Mariana Santos, Anderson Queiroz, Amanda da Silva por tudo que partilhamos juntos, por todos os ensinamentos mútuos, pela nossa amizade;

Aos demais membros do LaFI: Walfrido Bispo, Liliane Braga, Jefferson Miguel, Edla Karoline, Layse Maria, Nívea Karla, Benedito Esteves, Geraldo Neto, Ellymaira Freitas, João Flávio, Gicele Dias, Luiz Antonio, João Kaique e Karoline Jatobá por carinho, respeito e disponibilidade. Vocês estão no meu coração;

Aos ex-Lafianos: Ariane Priscilla, Anne Priscilla, Anansa Aquino, Diogo Costa, Everton Tenório, Diego, Angélica e Débora. Muita saudade de tudo que vivemos!

Aos amigos Pedro Guedes e Alessandra, Helenice, Yaponira Karla, por todo apoio não apenas nesse momento, mas em diversas etapas da minha vida;

A todos os professores, funcionários e equipe da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO que foram infinitamente responsáveis pela execução desse sonho. Muito obrigada!

A todos os órgãos de fomento pelo apoio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

**Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.**

**Chico Xavier**

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de duas séries de derivados racionalmente planejados. A primeira série pertence à classe hidrazonas tiofeno, é formada por nove derivados numerados de 5a-i. A segunda são aminoquinolínicos denominadas de BAQ, 7-Cl-MAQ, 2-CF<sub>3</sub>-MAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ, sintetizadas a partir de modificações estruturais na molécula de cloroquina. As duas séries foram sintetizadas e submetidas a ensaios para atividade antinociceptiva (ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético e ensaio de nocicepção induzida por formalina), ensaios para atividade anti-inflamatória aguda (peritonite induzida por carragenina/zymosan A) e crônica (síndrome experimental da artrite induzida por adjuvante completo de Freund's). A primeira série foi ainda submetida a um estudo *in silico* de toxicidade teórica através do programa Osiris® o qual os dados não demonstraram efeitos tóxicos significativos. Para a realização do estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (20-30g) e ratos *Wistar* (130-170g). Os fármacos dexametasona, dipirona e indometacina foram utilizados como padrões de referência para as duas séries. Todas as substâncias foram administradas 40 minutos antes do estímulo. A série dos derivados hidrazonas tiofeno foi administrada por via oral, enquanto que aminoquinolinas foram administradas por via intraperitoneal. Todos os derivados da primeira série exibiram atividade anti-inflamatória e elevada potência e eficácia antinociceptiva destacando-se os derivados 5a e 5d que foram submetidos ao ensaio crônico de síndrome de artrite, sendo capazes de reduzir o edema de pata a partir do 4º dia de tratamento, sem produzir efeitos tóxicos renais, hepáticos ou gástricos nas condições testadas. Os derivados da série das aminoquinolinas induziram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, sendo selecionados para o ensaio crônico os derivados BAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ. O tratamento por sete dias dessa série evidenciou uma significativa redução do tamanho das patas dos animais, especialmente a partir do 4º dia de tratamento, sem alterar os níveis das enzimas hepáticas, alterar o peso ou gerar toxicidade gástrica. Esses resultados demonstram que a administração dos derivados das séries hidrazonas tiofeno e aminoquinolinas por via sistêmica gerou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, no entanto novos estudos são necessários para elucidação dos seus mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** Atividade antinociceptiva. Atividade anti-inflamatória. 3-amino-2-acilidrazonas-tiofeno. 4-aminoquinolínicos.

## ABSTRACT

In this work, the evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of two series of rationally designed derivative was performed. The first series belong to the class hydrazones thiophene derivative is formed by nine numbered 5a-i. The second is termed aminoquinolínicos BAQ, 7-Cl-MAQ, 2-CF<sub>3</sub>-MAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ, synthesized from structural modifications in the molecule chloroquine. The two series were synthesized and subjected to testing for antinociceptive activity (writhing test induced by acetic acid and testing of formalin-induced nociception), testing for acute anti-inflammatory activity (zymosan A/carrageenan-induced peritonitis) and chronic (experimental arthritis syndrome induced by Freund's complete adjuvant). The first series was still subjected to a theoretical study in silico toxicity Osiris® program through which the data showed no significant toxic effects. For the study, *Swiss* male mice (20-30g) and *Wistar* rats (130-170g) rats lineages were used. The drugs dexamethasone, dipyron and indomethacin were used as reference standards for the two series. All substances were administered 40 minutes before stimulation. The number of hydrazones thiophene derivatives was administered orally, while aminoquinolines were administered intraperitoneally. All derivatives of the first series exhibited anti-inflammatory activity and high potency and antinociceptive efficacy highlighting derivatives 5a and 5d were submitted to chronic testing of arthritis syndrome, being able to reduce the paw edema from the 4<sup>th</sup> day of treatment without producing renal, hepatic or gastric toxicity under the conditions tested. The derived series of aminoquinolines induced anti-inflammatory and antinociceptive activity, being selected for the chronic test the BAQ derivatives and 7-CF<sub>3</sub>-MAQ. The treatment for seven days this series showed a significant reduction in the size of the legs of animals, especially from the 4<sup>th</sup> day of treatment, without changing the levels of liver enzymes, change the weight or generate gastric toxicity. These results demonstrate that administration of derivatives of thiophene and hydrazones series aminoquinolines systemically generated antinociceptive and anti-inflammatory activity, but further studies are needed to elucidate their mechanisms of action.

**Keywords:** Activity antinociceptive. Activity anti-inflammatory. 3-amino-thiophene-2-acylhydrazones. 4-aminoquinolines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Sinais clínicos da inflamação.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2 - Interação dos fagócitos nas fases da inflamação.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3 - Metabolismo do ácido araquidônico. Biossíntese das PGs e TXA2.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 4 - Circuito do SNC e periférico envolvido na transmissão e modulação da informação somatossensorial.....</b>	<b>24</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AAS</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>AIE</b>	Anti-inflamatório esteroidal
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não-esteroidal
<b>AR</b>	Artrite reumatoide
<b>ASIC</b>	Canal iônico sensível a ácido
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>CFA</b>	Adjuvante completo de Freund's
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
<b>COX</b>	Cicloxygenase
<b>COX<sub>1</sub></b>	Cicloxygenase 1
<b>COX<sub>2</sub></b>	Cicloxygenase 2
<b>COX<sub>3</sub></b>	Cicloxygenase 3
<b>DBPOC</b>	Doença broncopulmonar obstrutiva crônica
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal 50%
<b>DMARD</b>	Droga anti-reumática modificadora de doença
<b>EDRF</b>	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
<b>EM</b>	Esclerose múltipla
<b>E<sub>max</sub></b>	Efeito máximo
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GABA</b>	Ácido gama aminobutírico
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-4</b>	Interleucina-4

<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico-sintase induzível
<b>LAFi</b>	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
<b>LASSBio</b>	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócitos tipo 1
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PG</b>	Prostagladina
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina I <sub>2</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TVRP1</b>	Receptor vanilóide transitório tipo 1
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VIP</b>	Peptídeo Intestinal Vasoativo
<b>V.O.</b>	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Aspectos gerais da resposta inflamatória.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Principais mediadores envolvidos na inflamação.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Modelos para avaliação da atividade anti-inflamatória.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Dor.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Testes de avaliação da atividade nociceptiva.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Farmacoterapia da dor e da inflamação.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>3. CAPÍTULO I-ARTIGO I DERIVADO DA TESE.....</b>	<b>29</b>
<b>“3-amino-thiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates”</b>	<b>34</b>
<b>4. CAPÍTULO II-ARTIGO II DERIVADO DA TESE.....</b>	<b>54</b>
<b>“Synthesis and evaluation antinociceptive and anti-inflammatory of 4-aminoquinolines derivatives”</b>	<b>59</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>104</b>
<b>8.1 Anexo A- Folha De Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais.....</b>	<b>105</b>
<b>8.2 Anexo B- Artigos publicados durante o período de Doutorado.....</b>	<b>107</b>

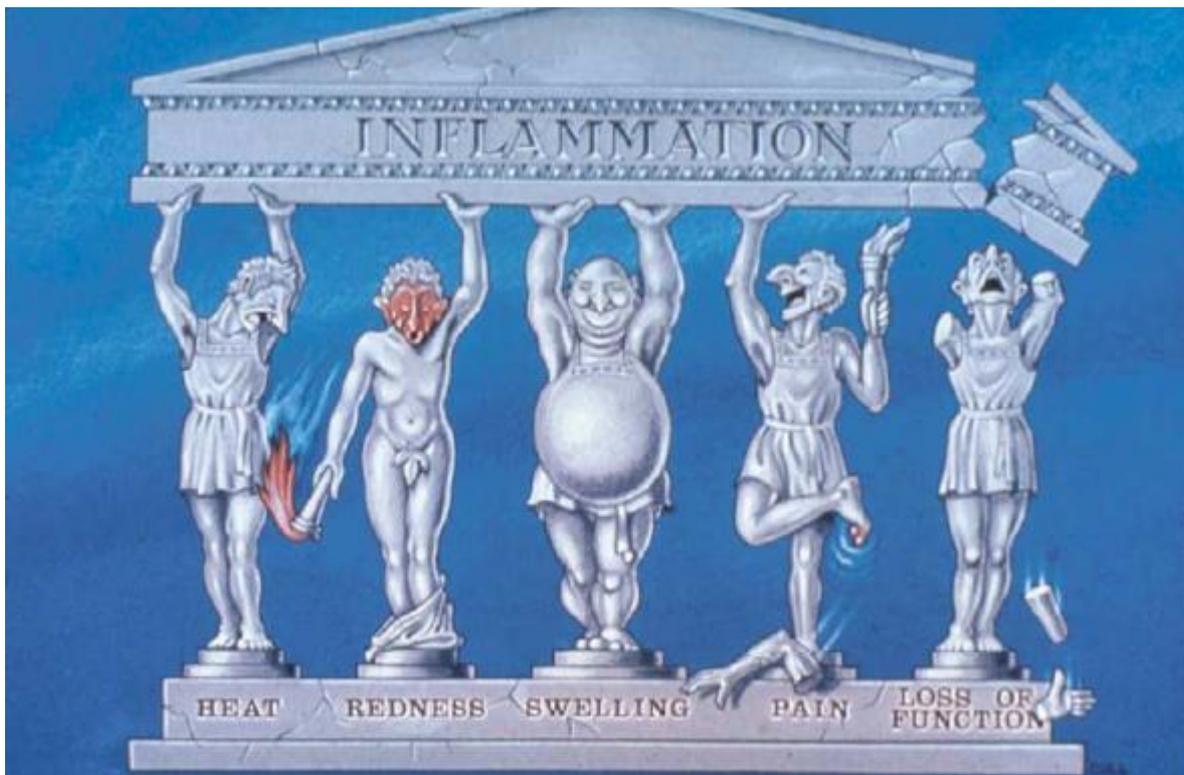
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória

A inflamação é um mecanismo do sistema imunológico em resposta a um estímulo agressor que pode ser: térmico, químico, mecânico ou infeccioso atuando na patogênese de diversas doenças, dentre elas: artrite reumatoide, câncer, acidente vascular cerebral, bem como em doenças neurodegenerativas. A inflamação é intrinsecamente um evento benéfico que leva à destruição ou neutralização do agente agressor, portanto uma reação de defesa com reestruturação do tecido e sua função fisiológica (Ricciotti; Fitzgerald, 2012). Dessa forma, o processo inflamatório agudo é representado por um conjunto de alterações bioquímicas e celulares do organismo no qual ocorrem vários fenômenos que se associam e se complementam formando uma reação em cascata, orquestrada por células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos) e vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa) (Tedgui; Mallat, 2001).

O termo inflamação é originário do latim “*inflammare*” e do grego “*phogos*” que significa atear fogo. Cornelius Celsius no século I, d.C descreveu os quatro sinais cardinais ou clínicos principais do processo inflamatório: rubor, calor, dor e tumor, sendo uma resposta dos tecidos vivos e vascularizados. O rubor e calor são resultantes do maior fluxo sanguíneo em áreas adjacentes ao foco inflamatório gerando dessa forma a hiperemia. Outro evento importante é o edema, que resulta do aumento da permeabilidade vascular. A dor ocorre pela irritação química nas terminações nervosas pela liberação de agentes algésicos e compressão mecânica devido ao edema. Um quinto sinal foi descrito por Virchow em 1858 e foi descrito com perda da função da região lesada (Edwards; Sedgewick; Willoughby, 1981) (**Figura 1**). Esse processo ocorre frequentemente em doenças inflamatórias crônicas, tais como: artrite reumatoide, Alzheimer, esclerose múltipla, cardiovasculares e lúpus eritematoso sistêmico (Kumar; Abbas; Fausto, 2005; Ricciotti; Fitzgerald, 2012).

**Figura 1 - Sinais clínicos da inflamação**



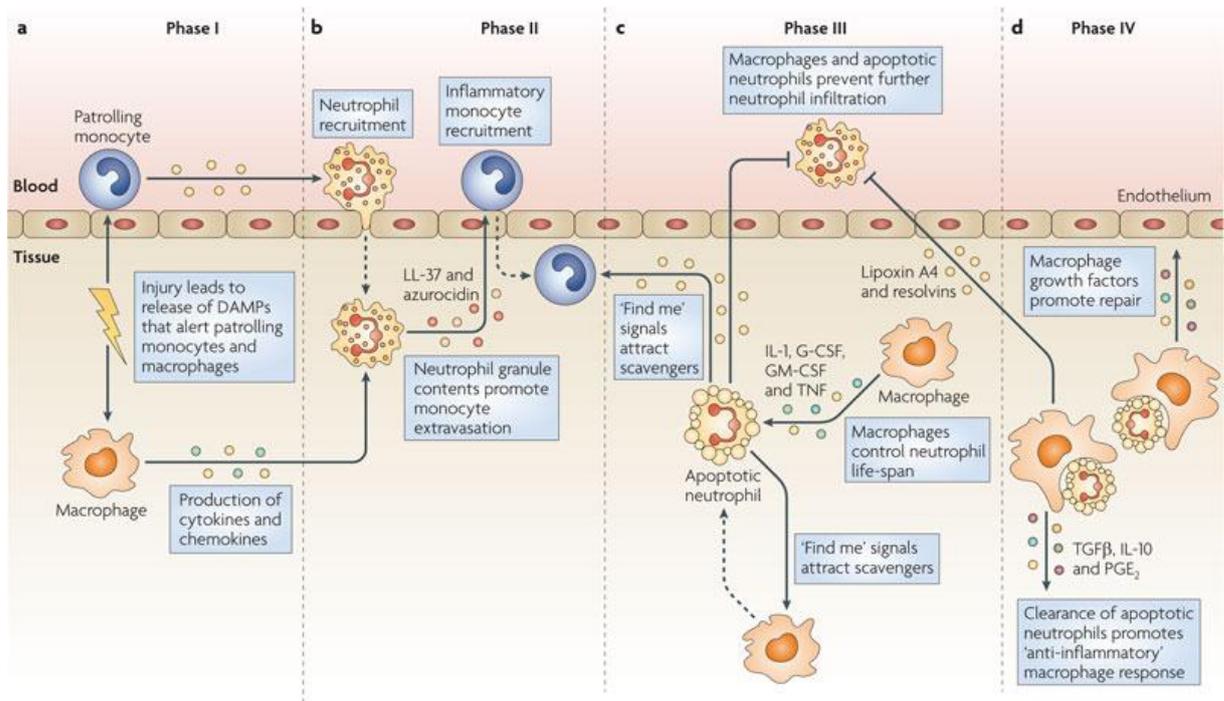
Fonte: Lawrence; Willoughby; Gilroy, 2002.

A inflamação envolve as principais células do sistema imunológico, no qual neutrófilos, monócitos e macrófagos atuam de forma coordenada visando eliminar o agente etiológico ou restos celulares. Os neutrófilos são células de vida curta e são as primeiras a chegar ao foco inflamatório (Nathan, 2006). Eles utilizam uma grande variedade de mecanismos inflamatórios que na, maioria das vezes, são prejudiciais ao tecido inflamado. Assim, a ativação de neutrófilos deve ser rigorosamente controlada. Os monócitos chegam mais tardiamente ao foco inflamatório podem ser classificados em duas subpopulações distintas de acordo com as características fenotípicas e funcionais: monócitos clássicos  $CD14^+ CD16^-$  e não clássicos  $CD14^{baixo} CD16^+$ . O papel de cada população de monócitos ainda não foi completamente elucidado, no entanto, estudos sugerem que eles possuem funções diferentes na homeostase e inflamação, em que monócitos clássicos agem nas fases iniciais da inflamação e os não clássicos agem promovendo a cicatrização e angiogênese. Contudo, tem sido sugerido que os monócitos clássicos produzem baixos níveis de citocinas e são menos eficazes para apresentar antígenos que os não clássicos (Soehnlein; Lindbom, 2010).

A inflamação é dividida em quatro fases principais: inicialmente macrófagos residentes e monócitos percebem a alteração homeostática. Eles rapidamente produzem

citocinas e quimiocinas para alertar o sistema imune e os neutrófilos. Na segunda fase, os neutrófilos fazem transmigração e ao chegarem o sítio da inflamação liberam os conteúdos dos seus grânulos favorecendo a instalação do processo inflamatório. Na terceira fase, o tempo de vida dos neutrófilos é relativamente curto e assim eles sofrem a ação de fatores pró-apoptóticos, alguns dos quais são produzidos por macrófagos. Nessa etapa não há mais a migração de neutrófilos, mas especialmente uma transmigração contínua de monócitos. Na última fase ocorre o “clearance” dos neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos, produzindo uma resposta anti-inflamatória (Soehnlein; Lindbom, 2010) (**Figura 2**).

**Figura 2 - Interação dos fagócitos nas fases da inflamação**



Fonte: Soehnlein; Lindbom, 2010

Pela característica e persistência da inflamação, ela pode ser classificada como aguda e crônica. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, persistindo por alguns minutos, horas ou dias e ocorre independente da natureza do estímulo ou do agente agressor (Nathan, 2002). Por outro lado a inflamação crônica é persistente e pode durar a vida toda com inflamação ativa, com destruição tecidual e resposta de reparo sem, no entanto resolução do processo.

A inflamação aguda se caracteriza pelo predomínio de fenômenos exsudativos, que é consequência das alterações na permeabilidade vascular, gerando acúmulo de líquido na região inflamada, depósito de fibrina, recrutamento de leucócitos (especialmente neutrófilos) e hemácias. Evidências demonstram que vários fatores desempenham importantes papéis na modulação da resposta inflamatória aguda. Esta resposta, na sua fase mais precoce, tem como mediadores a histamina e bradicinina que aumentam o calibre e o fluxo vascular, responsável pelos sintomas clínicos de calor e rubor presente no foco de inflamação (Kumar; Abbas; Fausto, 2005; Albertini et al., 2004). Numa fase tardia da inflamação aguda, há predominância de estímulos celulares que permitem a marginação, aderência endotelial, diapedese e migração de leucócitos decorrentes dos estímulos quimiotáticos. Todos os granulócitos, monócitos e, em menor grau, os linfócitos respondem aos estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade na fase aguda da inflamação (Kumar; Abbas; Fausto, 2005). A inflamação crônica inicia-se normalmente de forma latente na qual não há predomínio dos sinais clínicos da inflamação. Muitas vezes ela pode originar-se de infecções persistentes por microrganismos, inalação de sílica ou distúrbios autoimunes e seus mecanismos ainda são parcialmente entendidos (Medzhitov, 2008).

Diferentemente da inflamação aguda que se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração principalmente de neutrófilos, a inflamação crônica se caracteriza por um forte infiltrado de células mononucleares, que incluem macrófagos e linfócitos. Isto é reflexo de uma lesão persistente com destruição tecidual, provocada pelas células inflamatórias, numa tentativa frustrada de reparar o tecido lesado. Ainda nesta fase crônica um importante fenômeno é a cicatrização que opera no sentido de substituir o tecido danificado por tecido conjuntivo e acontece devido à neovascularização que é acompanhado por fibrose (Nathan, 2002; Toby; Willoughby; Gilroy, 2002).

## **1.2 Principais mediadores envolvidos na inflamação**

A resposta inflamatória é coordenada por uma grande variedade de mediadores que formam redes reguladoras complexas. Um único sinal inflamatório pode ser produzido por um conjunto de mediadores agindo independente e sinergicamente. Além disso, um mesmo mediador pode agir em várias etapas do processo inflamatório. Dentre os principais mediadores do processo inflamatório identificados, podem-se exemplificar as aminas vasoativas, eicosanoides, citocinas, cininas plasmáticas, radicais livres e componentes do

sistema do complemento. A quantidade e os tipos de mediadores presentes no sítio inflamatório variam de acordo com o estímulo lesivo e o desenvolvimento do processo inflamatório (Lapa, 2003).

Muitos mediadores envolvidos no processo inflamatório são pré-formados e estão estocados em vesículas ou compartimentos específicos. Outros são gerados no momento do estímulo inflamatório sendo classificados como mediadores neoformados. Assim sendo, a despeito de alguns serem constitutivos, estes também necessitam do estímulo para serem liberados. A seguir, serão exemplificados alguns dos mediadores mais importantes para a geração do processo inflamatório (Rankin, 2008).

A histamina é um dos mediadores chave de condições relacionadas à inflamação e alergia. Também é encontrada nos basófilos e plaquetas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por degranulação dessas células sob diferentes estímulos, inclusive reação antígeno-anticorpo, muito comum em asmáticos. Em humanos a histamina causa dilatação das arteríolas e aumenta a permeabilidade vascular. A histamina pode se ligar a quatro tipos de receptores: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, no entanto o receptor H<sub>1</sub> está intimamente relacionado na geração dos sinais clínicos da inflamação e alergia (Thurmond; Gelfand; Dunford, 1993).

A bradicinina (BK) é um mediador peptídico de alta massa molecular com vida muito curta, gerada pela ação das calicreínas, apresentando um potente efeito sobre a permeabilidade vascular, com efeitos similares aos da histamina. A BK é um importante mediador da resposta inflamatória tecidual a estímulos irritantes, podendo agir em receptor B<sub>1</sub> ou B<sub>2</sub> (Dray; Perkins, 2003). A degradação enzimática pode ser feita por várias peptidases, incluindo a dipetidil carboxipeptidase cininase II (Boura; Svolmanis, 1984).

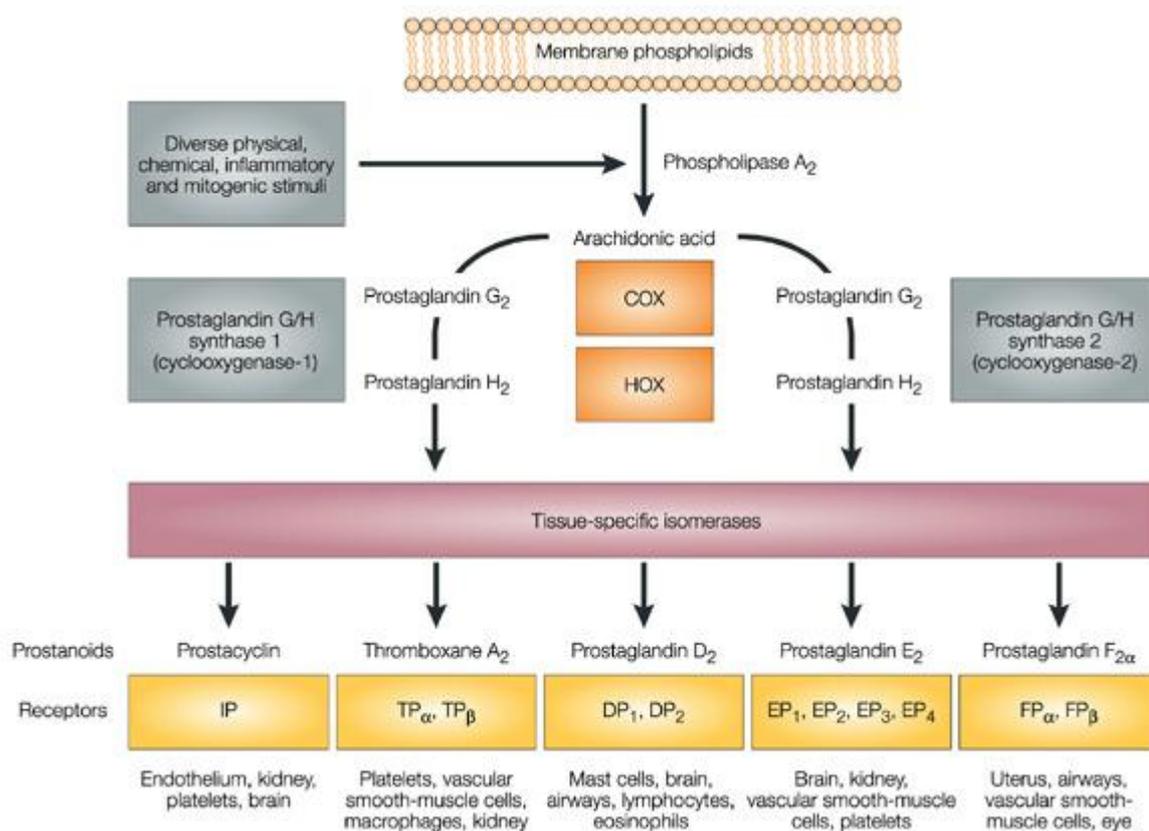
O óxido nítrico (NO), outro mediador que exerce um papel fundamental na resposta inflamatória, desempenha importantes funções na regulação do sistema imune, do processo inflamatório. Baixas concentrações de óxido nítrico inibem a expressão de moléculas de adesão, de citocinas, de quimiocinas, com consequente efeito na transmigração dos leucócitos. No entanto, grandes quantidades de NO, produzidas pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS), podem ser tóxicas e pró-inflamatórias, aumentando, por exemplo, a produção de prostaglandinas que desempenha um papel chave na amplificação da resposta inflamatória (Guzik; Korbut; Adamek-Guzik, 2003).

O Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) também exibe um papel muito importante na inflamação, sendo produzido principalmente por macrófagos e linfócitos T ativados.

Usualmente não é detectado em indivíduos saudáveis, mas elevado no soro e tecidos em condições inflamatórias e infecciosas e os níveis no soro estão relacionados de acordo com a gravidade da inflamação e infecção. O (TNF- $\alpha$ ) participa da expressão de moléculas de adesão, regula a produção de IL-1 e IL-6, ativação de neutrófilos, degranulações celulares, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), defesa contra microrganismos e modulação da expressão gênica, atuando tanto da patogênese de doenças inflamatórias quanto não inflamatórias (Fernandes, 2008). No caso de doenças inflamatórias ele é um dos mediadores que exibem papel chave a geração e progressão dos distúrbios autoimunes como: artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose múltipla (EM) (Esposito; Cuzzocrea, 2009).

Dentre as citocinas que participam da gênese, manutenção e resolução da inflamação, as interleucinas (IL) exibem um papel importante. Pode-se citar como representantes: IL-1, IL-4, IL-6 e IL-10. Cada uma exercendo o seu papel como mediador pró-inflamatório ou anti-inflamatório. A interleucina-6 (IL-6) é considerada um mediador fundamental em diversas etapas da inflamação (Gallucci et al., 2000). Dentre os vários efeitos pró-inflamatórios que lhe são atribuídos, os intimamente relacionados ao processo de reparo são, na etapa mais tardia, a indução mitótica de queratinócitos e, na fase mais precoce, os seus efeitos quimioatraente sobre neutrófilos (Sato et al., 1999). A interleucina-10 (IL-10) é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação, atuando com efeito anti-inflamatório. Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Adicionalmente, ela não só regula o crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune, mas também de queratinócitos e células endoteliais (Moore et al., 2001).

Além dos mediadores citados anteriormente, após lesão tecidual, diversos mediadores lipídicos são sintetizados. Os mais importantes são os derivados do ácido araquidônico (AA), denominados de eicosanoides. Estes são classificados como mediadores neoformados, devido ao fato de serem sintetizados apenas após um estímulo. Ao contrário, por exemplo, da histamina, os eicosanoides não são encontrados pré-formados nos tecidos e sim produzidos a partir da clivagem de fosfolipídios (Ricciotti; Fitzgerald, 2012). A produção dos eicosanoides ocorre a partir do metabolismo do AA. O AA livre, pode servir de substrato para várias enzimas tais como: as cicloxigenases, que iniciam a biossíntese das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e por várias lipoxigenases, que iniciam a síntese dos leucotrienos (LTs) (Botting, 2006) (**Figura 3**).

Figura 3 - Metabolismo do ácido araquidônico. Biossíntese das PGs e TXA<sub>2</sub>

Fonte: FitzGerald, 2003.

Existem duas isoformas conhecidas da ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, tendo sido identificado uma variante da COX-1, a COX-3 (Vane; Bakhle; Botting, 1998; Chandrasekharan et al., 2002). A COX-1 é expressa constitutivamente por células inflamatórias residentes, e não há evidência de indução de COX-1 durante a resposta inflamatória mediada por LPS e diferenciação celular. Acredita-se que os prostanoídeos por ela produzidos estão envolvidos na homeostasia na regulação das respostas vasculares (McAdam et al, 2000). A COX-2 pode ser induzida por diferentes células após um estímulo inflamatório, mas também é produzida constitutivamente em diversos locais, especialmente nos vasos, onde funciona como um potente fator relaxante derivado de endotélio (EDRF). As etapas de metabolismo do AA diferem em diferentes células. Nas plaquetas, a via induz à síntese de tromboxano A<sub>2</sub>, ao passo que, no endotélio vascular conduz a síntese de prostaciclina (PGI) e, nos macrófagos, resulta principalmente na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A PGE<sub>2</sub> é uma das prostaglandinas (PGs) mais abundante no corpo, é mais amplamente caracterizada em várias espécies animais e exibe atividade biológica versátil. Sob condições fisiológicas a PGE<sub>2</sub> é um importante mediador de várias funções biológicas, como a

regulação das respostas do sistema imune, pressão sanguínea, integridade gástrica e fertilidade. A desregulação da síntese ou degradação de PGE<sub>2</sub> tem sido associada a uma ampla taxa de condições patológicas (Legler, et al., 2010). Na inflamação, a PGE<sub>2</sub> possui um largo interesse em relação às pesquisas científicas devido ao seu envolvimento nos sinais clínicos da inflamação (Funk, 2001). A COX-3 compartilha de todas as características estruturais e catalíticas importantes da COX-1 e COX-2 e está provavelmente envolvida na biossíntese de mediadores anti-inflamatórios no sistema nervoso central (SNC) (Serhan et al., 2002)

Os prostanoídes afetam a maioria dos tecidos, exibindo uma notável variedade de efeitos. A ação da prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) provoca vasodilatação, inibição plaquetária, relaxamento do músculo gastrointestinal, relaxamento uterino, modificação da liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários. A ação de PGF<sub>2</sub>α promove contração do miométrio em humanos. A ação da PGI<sub>2</sub> causa inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese através de efeitos sobre a reabsorção tubular de Na<sup>+</sup>. A ação do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) causa vasoconstrição, agregação plaquetária e broncoconstrição. As prostaglandinas principalmente a PGE<sub>2</sub> e PGI são mediadores importantes em processos inflamatórios, de dor e de febre. Além disso, (Vane; Bakhle; Botting, 1998). As prostaglandinas são hiperalgésicas e realçam a nocicepção causada por outros mediadores tais como: bradicinina e substância P (Ferreira; Moncada; Vane, 1973).

As lipoxigenases são encontradas nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos, estando localizadas no citossol dessas células. A principal enzima desse grupo é a 5-lipoxigenase, a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos. Existem diversos tipos de leucotrienos, dentre eles o leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) pode ser encontrado em exsudatos inflamatórios e ocorre nos tecidos em muitas condições inflamatórias agudas e crônicas, incluindo artrite reumatoide e psoríase. Na asma eles atuam na fase inicial e tardia da doença. Além disso, eles contribuem para o remodelamento e hiper-responsividade brônquica subjacente em asmáticos (Rang et al., 2012).

Outro grupo importante na inflamação são as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que regem diversos processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, sobrevivência e resposta ao estresse. Nos seres humanos, MAPKs medeiam sinais a partir de uma variedade de fatores de crescimento, citocinas (Badger et al., 1996, 1998; Cobb, 1999). Baseado nisso, diversos grupos de pesquisa tem concentrado esforços na

busca de novos anti-inflamatórios que possam agir através de alvos enzimáticos, modulando a resposta inflamatória.

### **1.3 Modelos para avaliação da atividade anti-inflamatória**

Os ensaios para avaliação da atividade anti-inflamatória utilizados na pesquisa experimental visam aferir diversos parâmetros, dentre eles: a migração celular, o quantitativo do edema e a permeabilidade capilar. Podem ainda serem diferenciados quanto ao critério temporal na realização do ensaio em modelos agudos e crônicos. Um ensaio muito utilizado para avaliação da atividade aguda é a peritonite induzida por agentes flogísticos que são capazes de correlacionar a inflamação com a quantidade de célula migrada para o foco inflamatório. Os principais agentes flogísticos utilizados nesse ensaio são: carragenina e zymosan A. Ensaios crônicos também são bastante utilizados, dentre eles: modelo do granuloma induzido por pellet de algodão e síndrome experimental semelhante a artrite reumatoide. Para a realização do ensaio de artrite normalmente são utilizados colágeno tipo IV, formaldeído e o adjuvante completo de Freund's.

### **1.4 Dor**

A dor é considerada um processo fundamental para a manutenção da vida, pois serve de alerta em relação contra a presença de um estímulo nocivo. É uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tissular ou real ou mesmo sem nenhuma lesão. A sensação dolorosa apresenta um componente subjetivo, que envolve aspectos emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos, além da percepção do estímulo nocivo propriamente dito (Oliveira, 1997) sendo fundamental para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo, no entanto, quando persiste, provoca sofrimento e reações emocionais negativas, reduzindo a qualidade de vida do indivíduo (Dubin; Patapoutan, 2010).

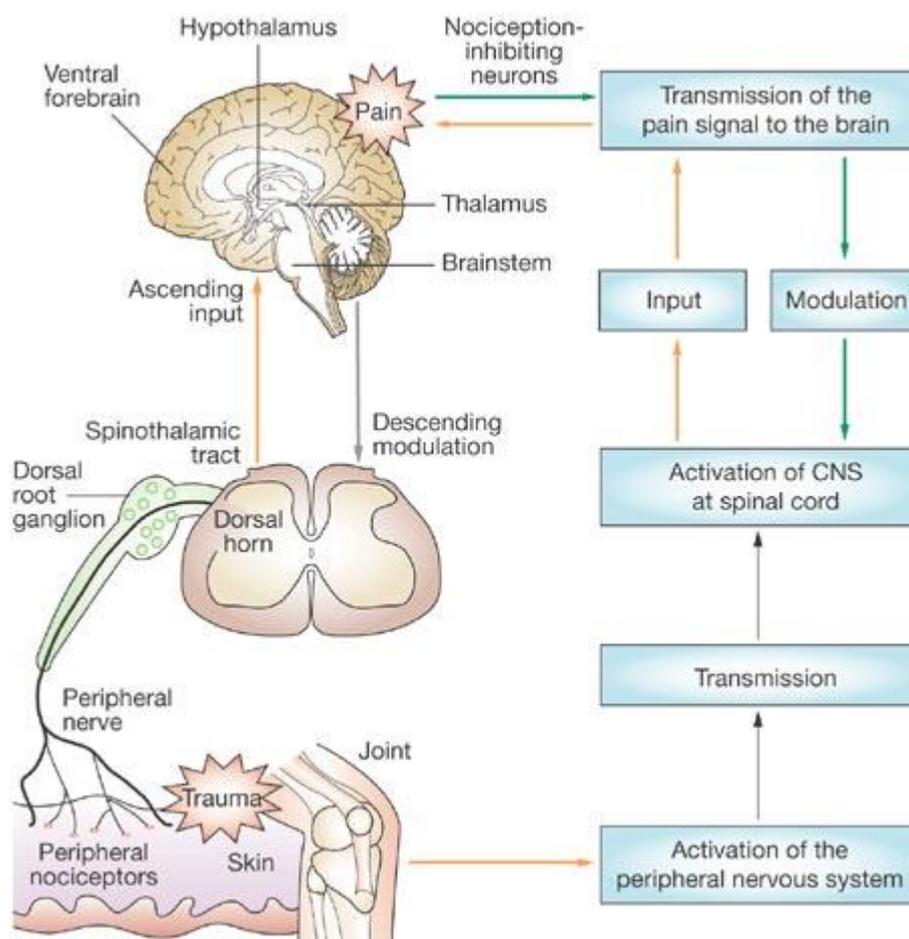
A dor apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial e o componente afetivo/emocional. O componente sensorial é denominado nociceção ou também conhecido como componente fisiológico, ou seja, é o sistema nervoso periférico e central responsável pelo processamento de estímulos gerados nos nociceptores. (Loeser; Treede, 2008). O componente sensorial que corresponde ao mecanismo neurofisiológico

permite por meio da ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo, que em geral, é o forte o suficiente para produzir lesão tecidual. O componente emocional corresponde à tomada de consciência com conseqüente reação. É uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (Ramadabran; Bansinath, 1996). Muitas vezes pode ocorrer nocicepção sem dor. A sensibilidade tem uma grande relação com a variabilidade genética de cada indivíduo bem como ambiente que o indivíduo está inserido (Muralidharan; Smith, 2011).

O componente afetivo apresenta também um critério muito importante para percepção da dor, o componente subjetivo. Somente os humanos possuem esse componente, não tendo sido detectado em animais. Por esse motivo, ao referir-se a um estudo de avaliação de dor em animais, nocicepção é o termo mais adequado já que não é possível avaliar o componente afetivo.

Para que seja realizada a interpretação da sensação dolorosa são necessárias duas etapas fundamentais: “transdução” que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nódico mecânico, térmico e químico, em potencial de ação; “transmissão”, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja conduzido para o SNC com modulação no tálamo ou córtex cerebral (Roy et al., 2009) (**Figura 4**). Na ocorrência de uma lesão tecidual e conseqüente liberação e interação dos mediadores químicos locais com seus respectivos receptores é desencadeado um processo de transmissão do estímulo doloroso até o alcance em níveis centrais. Após essa sensibilização dos nociceptores periféricos e geração dos potenciais de ação, são liberados vários neurotransmissores, tais como: substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina 8 (CCK-8), somatostatina e peptídeo do gen da calcitonina (CGRP) no corno dorsal da medula espinhal (Maggi, 1996). Os neurônios de segunda ordem são, então, ativados pelos neurotransmissores e o sinal segue para as áreas do sistema límbico (tálamo) e córtex cerebral pelo trato espinotalâmico, que compreendem as regiões finais da via nociceptiva. Chegando ao tálamo, o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, enquanto no córtex existe o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (Roy et al., 2009).

**Figura 4 - Circuito do SNC e periférico envolvido na transmissão e modulação da informação somatossensorial**



Fonte: Bingham et al., 2009.

A detecção de estímulos nocivos requer ativação dos nociceptores que promovem a interpretação consciente da dor e transdução em potenciais de ação de condução para o SNC. Os neurônios aferentes nociceptivos são amplamente distribuídos por todo o corpo e se encontram especialmente na pele, músculo, articulações, vísceras e meninges (Loeser; Treede, 2008). Dessa forma dois indivíduos possuindo o mesmo estímulo nociceptivo, podem ter processos dolorosos diferentes, dependendo do contexto em que mesmo que se encontra (Tracey; Dickenson, 2002).

Em relação à denominação da dor, ela pode ser determinada de acordo com o tipo de lesão e/ou dos mediadores envolvidos, duração e topografia. No que se refere ao tipo de lesão, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica a qual está associada, respectivamente, com estimulação excessiva dos nociceptores, com lesão

do tecido neural, com a disfunção de um nervo ou com fatores psicológicos. Pode ainda ocorrer ainda alterações chamadas de hiperalgesia (sensibilidade aumentada a um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta um estímulo não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (Besson; Chaouch, 1987; Carr; Goudas, 1999).

Além do tipo de lesão, o critério temporal também é bastante utilizado para classificar a dor. Quanto à duração, a dor pode ser aguda, transitória ou crônica. Quando o episódio doloroso é transitório, ocorre ativação dos nociceptores sem que haja dano tecidual. A dor aguda é definida como dor de início recente e duração limitada (Ready; Edwards, 1992). Geralmente está associada a uma lesão recente, ativação dos nociceptores no local da lesão, e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (Carr; Goudas, 1999). A dor crônica ocorre devido a uma lesão ou patologia, podendo ser perpetuada por outros fatores além daqueles que causaram a dor propriamente dita, e pode permanecer por meses ou anos (Loeser; Melzack, 1999). A dor crônica pode ainda persistir além do tempo de cicatrização de uma lesão e, frequentemente, não pode haver qualquer causa identificável (Ready; Edwards, 1992). Ela é tipicamente de origem inflamatória ou neuropática, sendo caracterizada pela hipernocicepção. Pode acarretar consequências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas, e psicossociais, além de envolver grave estresse emocional. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação a sua persistência, alterações adaptativas, tais como neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, e dificuldade do tratamento (Iadarola; Caudle, 1997).

A dor crônica representa um grande desafio na atualidade para a população mundial e os profissionais da saúde. Por sua etiologia multifatorial, seu diagnóstico e tratamento são mais complexos, nem sempre alcançando uma boa eficácia com o tratamento com analgésicos. A dor crônica influencia negativamente a qualidade de vida, leva o indivíduo ao sofrimento intenso, depressão, distúrbios do sono, além dos custos socioeconômicos e incapacidades (Tracey; Dickenson, 2012). O número de indivíduos com dor crônica vem crescendo a cada dia e especialmente no Brasil a dor representa um terço das consultas médicas comprometendo a qualidade de vida e aumentando o risco do desenvolvimento de depressão e ansiedade em até quatro vezes mais do que indivíduos que não possuem a doença (Gureje et al., 1998).

Os nociceptores são neurônios incomuns por que eles possuem um corpo celular e um axônio periférico que responde ao estímulo e o envia ao SNC para ser modulado (Julius; Basbaum, 2001). Portanto, estão envolvidos nos mecanismos de transdução da dor são

distinguidos por seu relativo alto limiar de ativação, ou seja, eles podem ser ativados por intensos estímulos que são danosos ou potencialmente danosos aos tecidos, mas não por estímulos inócuos como o toque (Djoughri; Lawson, 2004). Além dos receptores de alto limiar, destacam-se, também, os receptores com baixo limiar para estímulos naturais, principalmente mecânicos, e responsivos a estimulações de intensidades nócicas ou não. Outros tipos de nociceptores têm sido postulados para sinalizar estímulos mecânicos nocivos, incluindo os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), TRPV1 (Receptor vanilóide transitório tipo 1) e canais de potássio (Woolf; Ma, 2007). Existem outras estruturas identificadas nas terminações nervosas denominadas nociceptores “silenciosos” presentes nas fibras C de nervos articulares e vísceras. Tipicamente eles não respondem a estímulos nocivos de natureza mecânica, exceto em faixas extremas de intensidade. Em condições normais encontram-se em repouso, porém na vigência de processos inflamatórios, estímulos químicos ou térmicos tornam-se responsivos até mesmo àqueles inócuos. Acredita-se que este grupo de receptores contribua na sinalização da dor crônica, alterações prolongadas nos reflexos espinhais e regulação autonômica anormal de órgãos internos (Cervero, 2002).

O dano ao tecido, tal como ocorre em infecções, inflamação ou isquemia, produz diversas alterações celulares, como degranulação de mastócitos, ativação de células inflamatórias e expressão de enzimas como a COX-2. Os mediadores químicos presentes na dor podem agir através das ligações com canais iônicos, receptores metabotrópicos ativando e/ou sensibilizando os nociceptores. Diversos mediadores endógenos podem modular a nocicepção, dentre eles, as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1, citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Schafers; Sorokin, 2008) e quimiocinas como proteína quimiotática de monócito tipo 1 (MCP-1) podem agir como moléculas chaves na sinalização da dor. Após a ativação, uma cascata de quinases intracelular resulta em fosforilação de canais como os canais de sódio voltagem dependentes com alteração na cinética do canal e sensibilização do nociceptor. Os neuropeptídeos (substância P e CGRP) liberados nos terminais periféricos contribuem para o recrutamento de fatores do plasma e células inflamatórias no local da lesão, dando origem ao edema neurogênico. Esse aumento da sensibilidade dentro da área da lesão devido a mecanismos periféricos é denominado de sensibilização periférica e se manifesta como hiperlagesia primária. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) são capazes de modular a dor periférica reduzindo os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> ao inibir a COX-2 (Woolf; Ma, 2007).

### **1.5 Testes de avaliação da atividade nociceptiva**

Os estudos experimentais para proceder com avaliação farmacológica de substâncias sintéticas ou naturais e extratos são na maioria das vezes realizados em ratos e/ou camundongos, empregando as normas éticas de experimentação em animais estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

Os animais submetidos a um estímulo nociceptivo, seja ele mecânico, térmico ou químico, são capazes de exibir respostas comportamentais, fisiológicas e motoras, similares às observadas na espécie humana. Essas respostas são avaliadas e comparadas as que são encontradas na presença e ausência de medicamentos analgésicos.

Para realizar a avaliação farmacológica, a administração da substância teste deverá ser feita por vias oral ou intraperitoneal de 30 minutos a 1 hora antes da administração do estímulo álgico, sendo necessário ainda que os animais estejam em jejum de pelo menos 2 horas para diminuir interferentes farmacocinéticos (Neto, 2009).

Os modelos mais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva são: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ensaio de nocicepção induzido por formalina, ensaio de placa quente e o ensaio de retirada de cauda. Apesar da realização desses ensaios na maioria das vezes não é possível afirmar o mecanismo de ação do que está sendo testado, mas sem dúvida é o primeiro passo para avaliação farmacológica.

## **1.6 Farmacoterapia da dor e da inflamação**

O tratamento da dor e inflamação tem como objetivo a prevenção da incapacidade, o conforto e a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Existem três classes principais de medicamentos que se encontram disponíveis para o uso clínico, como analgésicos e/ou anti-inflamatórios AINES (anti-inflamatório não-esteroidal), AIE (anti-inflamatório esteroidal) e analgésicos). Os fármacos analgésicos podem ser divididos em duas classes principais: analgésicos opioides e analgésicos não opioides. Pode-se citar como exemplos da classe dos analgésicos não opioides a dipirona e o paracetamol, amplamente utilizados na clínica e dos opioides, morfina e codeína. O paracetamol e dipirona, ao contrário de outros AINES que inibem a cicloxigenase 2, possuem mecanismo de ação relacionado a inibição da COX-3, dessa forma carecendo do efeito anti-inflamatório (Ayoub et al., 2004).

Os AINEs destacam-se entre os grupos farmacêuticos mais utilizados na prática clínica devido a sua eficácia em suprimir dor e inflamação. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas para vários processos como: algesia, inflamação, pirose e profilaxia

contra doenças cardiovasculares (Ex. ácido acetil salicílico em baixas doses, AAS). Além disso, muitas publicações científicas sugerem que poderiam ser eficazes na prevenção de doenças neurológicas, como Alzheimer, e constituir-se em opção terapêutica para casos de câncer (Kummer; Coelho, 2002; Ong et al., 2007).

Os AINEs incluem uma diversidade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas, no entanto muitos desses fármacos possuem três principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético (Rang, et al., 2012). O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição do sistema enzimático denominado COX. O AAS foi o primeiro composto químico sintético utilizado como anti-inflamatório e analgésico. Desde a síntese do ácido acetilsalicílico, foram desenvolvidos vários AINEs, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes. Os AINEs são classificados como não seletivos, os quais inibem ambas as isoenzimas COX-1 e COX-2 como a indometacina, os que inibem seletivamente a COX-2 como a nimesulida e os que inibem seletivamente a COX-2 como o valdecoxibe. Embora os AINEs não seletivos sejam bastante efetivos no tratamento da dor e inflamação, o uso crônico de tais medicamentos está associado a lesões do trato gastrointestinal, anormalidade da coagulação e lesão renal (Ong et al., 2007). Entre os AINEs mais utilizados na clínica pode-se citar o diclofenaco, AAS, piroxicam, indometacina, nimesulida, a fenilbutazona e o naproxeno.

Durante muito tempo a indústria farmacêutica buscou fármacos que não produzissem os efeitos indesejáveis gastrintestinais gerados por diversos AINEs, dentre eles: AAS, diclofenaco e indometacina. Essas buscas permitiram não apenas a síntese e identificação de fármacos com a diminuição desses efeitos, mas também possibilitou o desenvolvimento de modelos animais para a pesquisa básica, como o edema de pata produzido por carragenina e a síndrome experimental da artrite. Após longos anos de pesquisa foram desenvolvidos os inibidores altamente seletivos para COX-2 com o intuito de amenizar as complicações gastrintestinais dos AINEs não seletivos (Hawkey et al., 2001). A descoberta de inibidores da COX-2 levou a obtenção da segunda geração de AINEs, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe, entre outros. Entretanto, o rofecoxibe e lumiracoxibe foram proscritos no mundo em 2004 e 2005, respectivamente devido à constatação de efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio do processo homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e TXA<sub>2</sub> nas plaquetas (Grosser; Fries; Fitzgerald, 2006).

Os glicocorticoides são classificados com anti-inflamatórios esteroidais que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (Schimmer; Parker, 2007). A liberação endógena de hormônios esteroides ocorrem naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Os glicocorticoides sintéticos, comumente chamados de AIES são muito semelhantes aos naturais (Bavaresco et. al., 2005). De uma maneira geral os fármacos glicocorticoides apresentam vários efeitos adversos, uma vez que eles interferem em inúmeras funções do organismo. Estas substâncias são capazes de reduzir a captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando glicemia de rebote, com consequente glicosúria, além de aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo protéico. Outros efeitos adversos da terapia com glicocorticoides são: a redução da absorção de cálcio no trato gastrointestinal e o aumento da excreção deste cátion pelos rins, podendo resultar, em osteoporose. Estes fármacos, também, alteram o metabolismo e a redistribuição das gorduras, característica da Síndrome de Cushing, uma síndrome frequente da terapia com AIEs (Rang et al., 2012; Bavaresco et al., 2005). Esses efeitos indesejáveis podem ser minimizados através da administração tópica desses fármacos, assim a indústria desenvolveu os corticoides inalatórios para tratar doenças respiratórias com asma, doença broncopulmonar obstrutiva crônica (DBPOC) e os cremes para tratar doenças dermatológicas (Whelan, 2003).

Dentre as doenças que possuem origem inflamatória crônica, os distúrbios autoimunes são alvo de grandes pesquisas na tentativa de elucidar seus mecanismos de geração e progressão, além a busca de tratamentos eficazes na sua remissão. Nesse contexto a Artrite Reumatoide (AR) possui grande destaque. A AR é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, caracterizada por intensa inflamação com concomitante destruição da cartilagem e do osso, além do comprometimento cardiovascular e pulmonar. Nos animais não é possível realizar o ensaio de artrite reumatoide, mas a indução de uma síndrome que pode se caracterizar com os mesmos sintomas da doença em humanos. Sabe-se que muitas citocinas tais como interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-2, IL-1 e especialmente o TNF- $\alpha$ , são mediadores da imunidade e atividade pró-inflamatória que assumem papel importante no desenvolvimento e manutenção da doença da AR. Mediadores inflamatórios como os derivados do ácido araquidônico também participam do desenvolvimento desta patologia (Feldmann; Brennan; Maini, 1996).

O tratamento farmacológico da AR visa alcançar a melhora significativa da doença melhorando a qualidade de vida, evitando alterações severas nas articulações e perda da

função, sem causar efeitos indesejáveis permanentes ou inaceitáveis. O tempo de tratamento e o fármaco escolhido dependerão dos efeitos da doença que o paciente esteja apresentando, sendo um grande desafio entre os profissionais fazer o equilíbrio entre os efeitos indesejáveis e a necessidade de controlar a inflamação (Scott; Wolfe; Huizinga, 2010). Vários fármacos podem ser utilizados para o tratamento da AR: AINEs, droga anti-reumática modificadora de doença (DMARD), glicocorticoides e se necessário, analgésicos. Os AINEs foram utilizados durante por várias décadas no manejo da AR. Como base no seu mecanismo de ação, os AINEs fazem parte do arsenal farmacológico como terapia adjuvante útil nas manifestações clínicas da doença: edema articular, hiperalgisia e dor, no entanto não impedem com eficácia a progressão da doença. As grandes complicações do tratamento com esses fármacos são os efeitos indesejáveis gástricos, renais, hepáticos e cardiovasculares, que na maior parte das vezes limitam o seu uso. Além disso, é difícil muitas vezes prever a resposta farmacológica a um AINE em virtude da progressão inesperada da doença. Outra classe também muito utilizada são os glicocorticoides, que possuem atividade anti-inflamatória e efeitos imunossupressores por mecanismos não específicos. Similar aos AINEs o tratamento com esses medicamentos é realizado para o manejo dos sintomas clínicos da doença e algumas vezes para diminuir rapidamente uma piora do quadro clínico. A grande vantagem do uso de corticoides além da boa disponibilidade oral são as formulações intra-articulares sendo capazes de reduzir rapidamente o edema, no entanto a imunossupressão e efeitos sobre o metabolismo de macronutrientes se tornam limitantes para o tratamento. Os DMARD atualmente são a base do tratamento da AR podendo ser fármacos biológicos e não biológicos. Os não biológicos incluem a cloroquina e sua forma hidroxilada, hidroxicloroquina, metotrexato, sulfassalazina e leflunomida. . O tratamento com cloroquina e hidroxicloroquina gera efeitos indesejáveis como: retinopatia, irritação dermatológica e alterações gástricas. Os biológicos são: infliximabe, etanercepte, golimumabe, adalimumabe e abatacepte, onde os apenas o abatacepte é modulador de IL-1 e os demais de TNF- $\alpha$ . Nos protocolos clínicos dos medicamentos biológicos, para iniciar o tratamento com esses fármacos é necessário realizar a pesquisa de infecções ativas em virtude do grande potencial imunossupressor e a escolha do tratamento ocorre dependendo da gravidade da doença (Singh; Cameron, 2012).

A despeito de todas essas alternativas farmacológicas existentes, muitos pesquisadores no mundo todo buscam medicamentos que possam promover a remissão da doença com o mínimo de efeitos indesejáveis. Deste modo fazem-se necessárias novas pesquisas, objetivando a busca por fármacos mais seguros e eficazes. Assim, diversos

modelos *in vivo* têm sido utilizados na pesquisa de compostos com atividade anti-inflamatória/antinociceptiva (Vergnolle, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de duas novas séries de derivados acilidrazonas-tiofeno e aminoquinolínicos planejados e sintetizados para atuarem com anti-inflamatórios e analgésicos.

### **3.2. Objetivos específicos:**

- ✚ Determinar as propriedades antinociceptivas com potência e eficácia dos compostos planejados e sintetizados, em modelos de nocicepção periférica aguda;
- ✚ Determinar as propriedades anti-inflamatórias em modelos animais de inflamação aguda dos compostos;
- ✚ Caracterizar o efeito dos derivados mais ativos em modelo de inflamação crônica.

### **3. CAPÍTULO I-ARTIGO DERIVADO DA TESE**

*Molecules*,

Impact Factor: 2.428

## **3-amino-thiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates**

Yolanda Karla Cupertino da Silva,<sup>a</sup> Christian Tadeo Moreno Reyes,<sup>b,c</sup> Gildardo Rivera,<sup>c</sup> Marina Amaral Alves,<sup>b</sup> Eliezer J. Barreiro,<sup>b</sup> Magna Suzana Alexandre Moreira,<sup>a\*</sup> Lídia Moreira Lima<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>LaFI—Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

<sup>b</sup>LASSBio (<http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>)—Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68024, 21944-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Centro de Biotecnologia Genômica, Instituto Politecnico Nacional, Boulevard del Maestro, s/n, 88710, Reynosa, Mexico

### **Abstract**

Different chemotypes are described as anti-inflammatory, among them the *N*-acylhydrazones (NAH) highlighted by their nature of privileged structures, being present in several anti-inflammatory drug-candidates. In this paper a series of functionalized 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were designed, synthesized and pharmacological evaluated. These new derivatives showed great anti-inflammatory and analgesic potency and efficacy. Compounds **5a** and **5d** standing out, being also active in CFA-induced arthritis in rats. After treatment daily for seven days with **5a** and **5d** (50 µmol/Kg), by oral administration, these compounds were not renal or hepatotoxic and didn't demonstrate an immunosuppressant

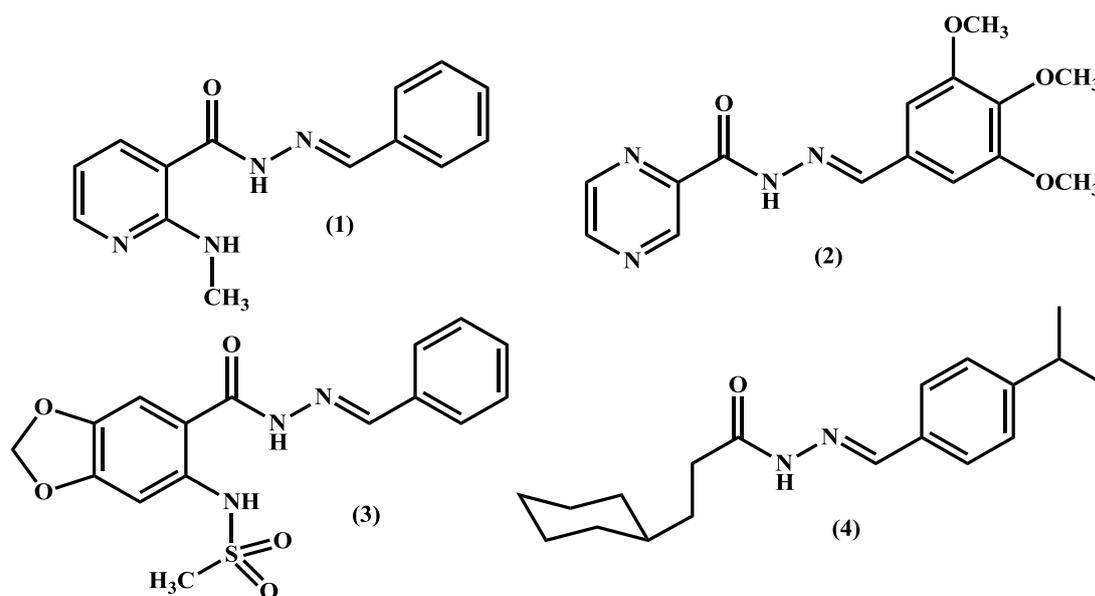
profile. These data are in agreement with the absence of toxicity identified *in silico* using the program OSIRIS Property Explorer.

Key-Words: inflammation, toxicity, acylhydrazone, analgesic, arthritis, privileged structure

\*Address for correspondence: Dr. Lídia Moreira Lima, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco B, sala 14, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21941-971 PH/FAX 55-21-39386503. Email: [lidia@lassbio.icb.ufrj.br](mailto:lidia@lassbio.icb.ufrj.br) or Dr. Magna Suzana Alexandre-Moreira, LaFi, ICBS, UFAL, Maceió, Brasil, 57072-900 Email [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com)

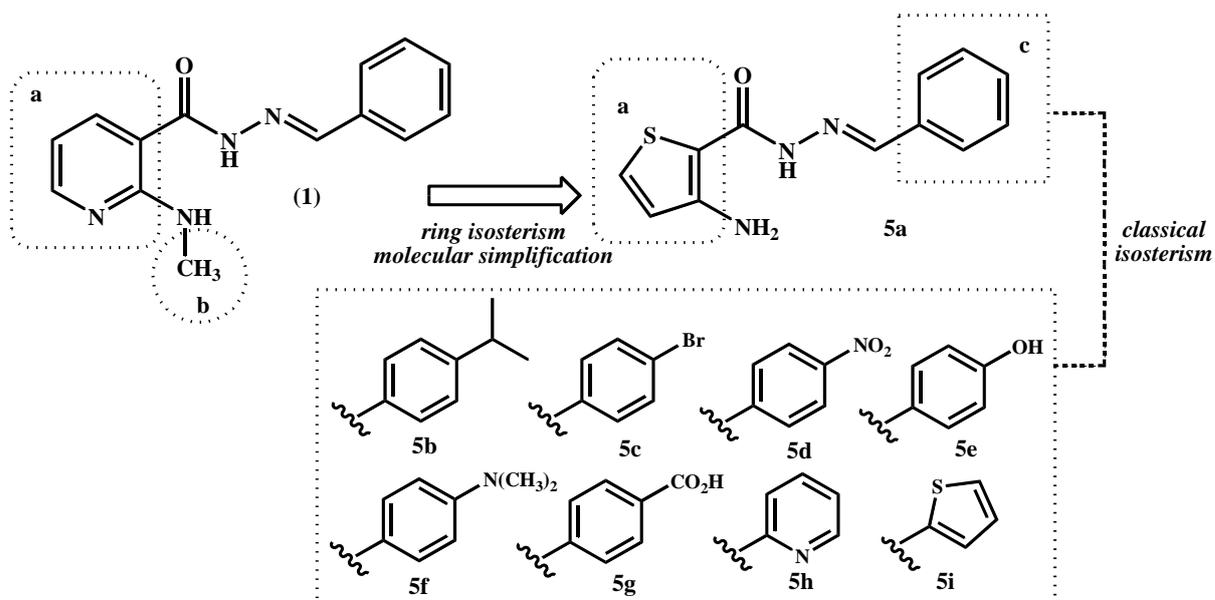
## 1. Introduction

Inflammation is an adaptive response that is triggered by noxious stimuli and conditions, such as infection and tissue injury, and can be classified into acute and chronic [1-2]. The role of inflammation in the etiology of several diseases is well-documented [3-4]. Many pathways are involved in acute and chronic inflammatory processes, among them the cyclooxygenase (COX) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). These enzymes have been studied as important target for the design of novel anti-inflammatory drugs [5-8] (COX and its isoenzymes (COX-1; COX-2 and COX-3) are the molecular targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs (e.g. indomethacin, diclofenac and celecoxib), and COX-3 are believed to be responsible for the antipyretic and analgesic effects of dypirone and paracetamol [9] Distinct chemotypes are described as anti-inflammatory, among them the *N*-acylhydrazones (NAH) are noteworthy [10]. These privileged structures [11] are present in several anti-inflammatory drug-candidates acting by different mechanism of action, as exemplified by compounds **1-4** (Figure 1) [12-18].



**Figure 1: Examples of anti-inflammatory lead-candidates presenting the privileged structure *N*-acylhydrazone**

In a continuous effort to identify new anti-inflammatory drug-candidates a series of functionalized 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were designed by molecular modifications on the prototype **1**. These modifications aiming to preserve the *N*-acylhydrazone moiety (CONHN=CH) and were based on application of ring isosterism between the pyridine and thiophene nucleus, and on molecular simplification with consequence elimination of methyl group of the original prototype **1** (Figure 2). The aromatic pattern of compound **5a** was later modified following classical isosteric replacement of monovalent groups and equivalent rings exchange [19] (Figure 2).



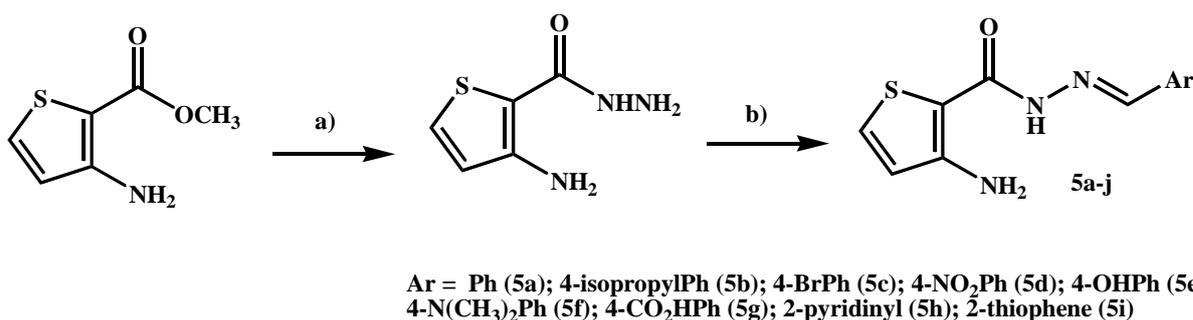
**Figure 2: Design concept of the 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives 5a-i**

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

The functionalized 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were synthesized as depicted in Scheme 1, following the methodology previously described [20].

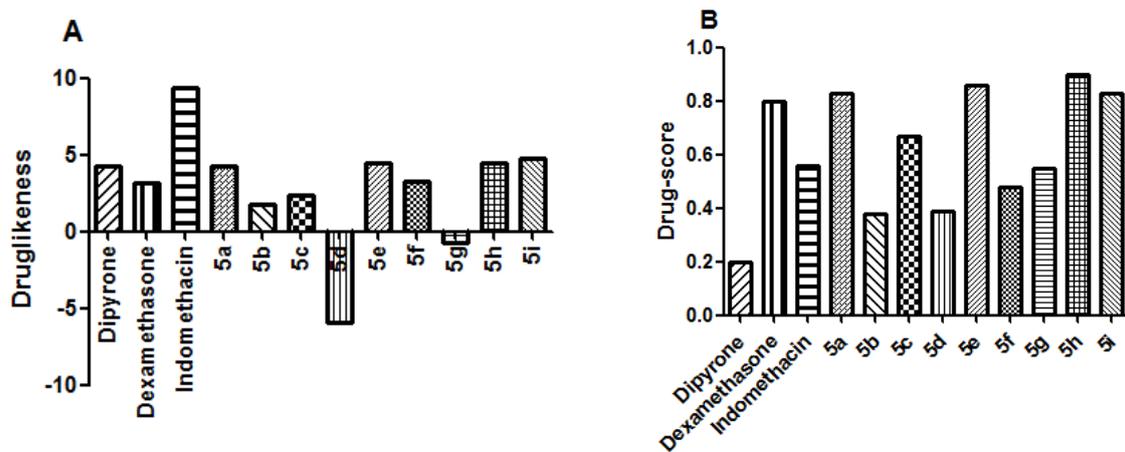
Compounds were characterized by infrared, nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) and mass spectroscopy. The purity was determined by HPLC. The stereochemistry of imine double bond ( $\text{N}=\text{CH}$ ) was assigned as *E*-isomer. This isomer was assigned based on the chemical shift of the imine-hydrogen singlet signal visualized in the  $^1\text{H}$  NMR spectra of NAH derivatives (**5a-i**) and considering similar data previously reported in the literature [21].



**Scheme 1: Conditions and reagents used in the synthesis of 3-amino-thiophene-2-acylhydrazones derivatives (5a-i): a) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (80%), EtOH, reflux, 24h, 64%; b) ArCHO, EtOH, HCl (cat), r.t., 1h, 47-95%.**

## 2.2. Biological assays

In order to investigate the potential toxicity of *N*-acylhydrazones **5a-i** and their drug-like profile, these compounds were evaluated *in silico* using the Program OSIRIS Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) [22]. As showed in Figure 3 (A-B), compounds **5a-i** presented satisfactory druglikeness, with exception of **5g** and **5d**, and great drug-score, indicating an adequate drug-like profile, similar to the standard drugs dipyrone, indomethacin and dexamethasone. Additionally, none compound showed toxicity risks (**Table 1**).



**Figure 3.** Drug-like profile of the functionalized 3-amino-thiophene-2-carbohydrazide derivatives 5a-i determined by Osiris Program. A) druglikeness; B) drug-score values

**Table 1.** *In silico* toxicity of the functionalized 3-amino-thiophene-2-carbohydrazide derivatives **5a-i** determined using Osiris program (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

Compound	Theoretical toxicity risks*			
	Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive effects
<b>Dipyrrone</b>	3	3	1	3
<b>Dexamethasone</b>	1	1	1	1
<b>Indomethacin</b>	1	1	1	1
<b>5a</b>	1	1	1	1
<b>5b</b>	1	1	3	1
<b>5c</b>	1	1	1	1
<b>5d</b>	1	1	1	1
<b>5e</b>	1	1	2	2
<b>5f</b>	1	3	1	1
<b>5g</b>	1	1	1	1
<b>5h</b>	3	1	1	1
<b>5i</b>	1	1	1	1

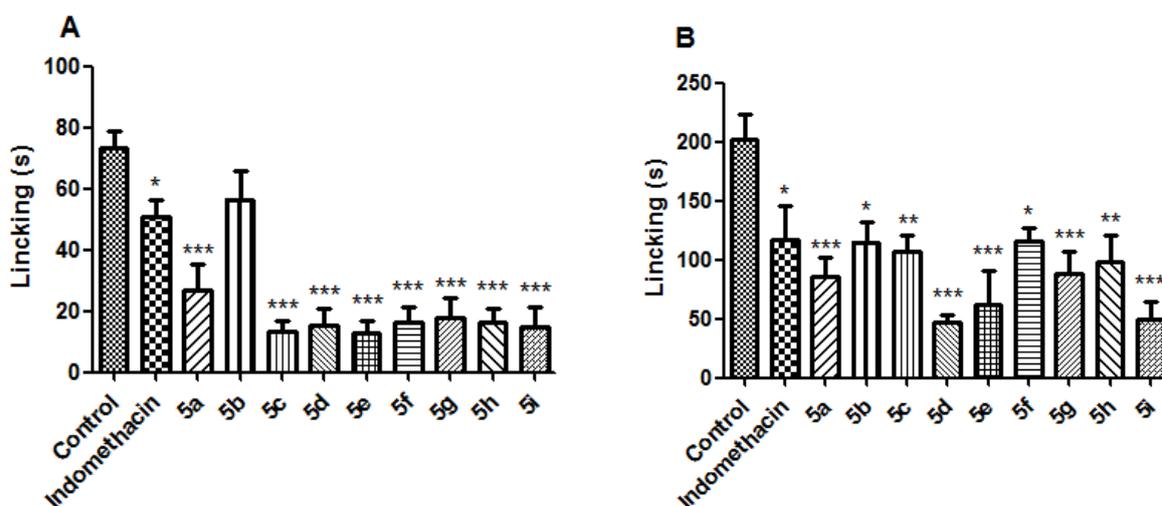
\*Theoretical toxicity risks calculated using Osiris program. The scale of side effects is low (1), medium (2), and high (3) toxicity profile.

To investigate the antinociceptive profile of compounds **5a-i**, we determined the dose-response of these derivatives in acetic acid-induced abdominal constriction test [23]. Therefore, mice were treated with compounds **5a-i** in doses of 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ , by oral administration, using dipyrrone as standard drug. As exemplified in Table 2, the *N*-acylhydrazone derivatives **5a-i** showed high potency and efficacy, standing out compounds **5a** ( $\text{ID}_{50} = 3.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/Kg}$ ), **5c** ( $\text{ID}_{50} = 2.3 \pm 0.4 \mu\text{mol/Kg}$ ), **5d** ( $\text{ID}_{50} = 2.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/Kg}$ ) and **5h** ( $\text{ID}_{50} = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{mol/Kg}$ ) that were more potent than the standard dipyrrone ( $\text{ID}_{50} = 11.4 \pm 4.9 \mu\text{mol/Kg}$ ).

Next, these compounds were evaluated in formalin test [24] using a screening dose of 30  $\mu\text{mol/Kg}$  (*per os*). All compounds were able to reduce the nociception response in phase 1 (neurogenic) and phase 2 (inflammatory) of formalin test. It is noteworthy compounds **5d** and **5i** that produced marked inhibition during inflammatory phase of formalin assay (Figure 4A and 4B).

**Table 2. ID<sub>50</sub> compounds 5a-i (100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o.) and dipyron (100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o.) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, for a period of 25 min.**

Compound	ID <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/Kg} \pm \text{S.E.M.}$ )	E <sub>max</sub> ( $\% \pm \text{S.E.M.}$ )
<b>Dipyron</b>	11.4 $\pm$ 4.9	75.2 $\pm$ 5.8
<b>5a</b>	3.5 $\pm$ 0.1	72.6 $\pm$ 4.1
<b>5b</b>	6.1 $\pm$ 2.2	64.3 $\pm$ 8.5
<b>5c</b>	2.3 $\pm$ 0.4	76.7 $\pm$ 5.2
<b>5d</b>	2.6 $\pm$ 0.5	81.0 $\pm$ 5.7
<b>5e</b>	> 100	-----
<b>5f</b>	32.8 $\pm$ 17.3	74.5 $\pm$ 9.6
<b>5g</b>	> 100	-----
<b>5h</b>	2.5 $\pm$ 0.4	84.1 $\pm$ 5.6
<b>5i</b>	7.8 $\pm$ 3.2	86.8 $\pm$ 5.2



**Figure 4.** Effect of compounds **5a-i** (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o.) and indomethacin (10  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o) on formalin (2.5%) test in mice. **A)** Neurogenic phase; **B)** inflammatory phase. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$

The anti-inflammatory activity of compounds **5a-i** was evaluated using carrageenan-induced peritonitis test [25]. Animals were treated with **5a-i** by oral administration in doses of 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ . The anti-inflammatory potency of compounds **5a-i** is depicted in Table 3. All compounds, with exception of **5e** and **5i** promoted a significant reduction of cell recruitment, being derivatives **5a** ( $\text{ID}_{50} = 7.2 \pm 1.8 \mu\text{mol/Kg}$ ) and **5d** ( $\text{ID}_{50} = 5.2 \pm 2.0 \mu\text{mol/Kg}$ ) the most promising, showing anti-inflammatory potency and efficacy similar to the standard indomethacin (Table 3).

**Table 3. ID<sub>50</sub> of compounds 5a-i (100, 30, 10, 3 and 1 μmol/Kg, p.o.) and indomethacin (100, 30, 10, 3 and 1 μmol/Kg, p.o.) on the carrageenan- induced peritonitis in mice.**

Compound	ID <sub>50</sub> (μmol/Kg ± S.E.M.)	E <sub>max</sub> (% ± S.E.M )
<b>Indomethacin</b>	3.3 ± 1.0	73.8 ± 5.1
<b>5a</b>	7.2 ± 1.8	69.7 ± 12.1
<b>5b</b>	15.9 ± 6.3	73.9 ± 11.7
<b>5c</b>	8.5 ± 4.2	72.7 ± 5.9
<b>5d</b>	5.2 ± 2.0	70.3 ± 5.2
<b>5e</b>	> 100	-----
<b>5f</b>	8.8 ± 6.1	62.4 ± 5.8
<b>5g</b>	15.3 ± 12.5	75.1 ± 1.6
<b>5h</b>	20.2 ± 17.2	76.4 ± 10.1
<b>5i</b>	> 100	-----

Confirmed the anti-inflammatory profile of 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** in a murine acute inflammatory model, compounds **5a** and **5d** were selected in order to investigate their activity in chronic model of inflammation. Therefore, these compounds (50 μmol/Kg, pathway orally) were evaluated in arthritis model induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in rats [26] and the results were compared to those obtained for the standard dexamethasone (5 μmol/Kg, pathway orally) (Figure 5). As demonstrated in Figure 5, the daily treatment for seven days with compounds **5a** e **5d** were able to reduce paw edema on the 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> days of experiment, although, this reduction was less prominent than the standard dexamethasone.

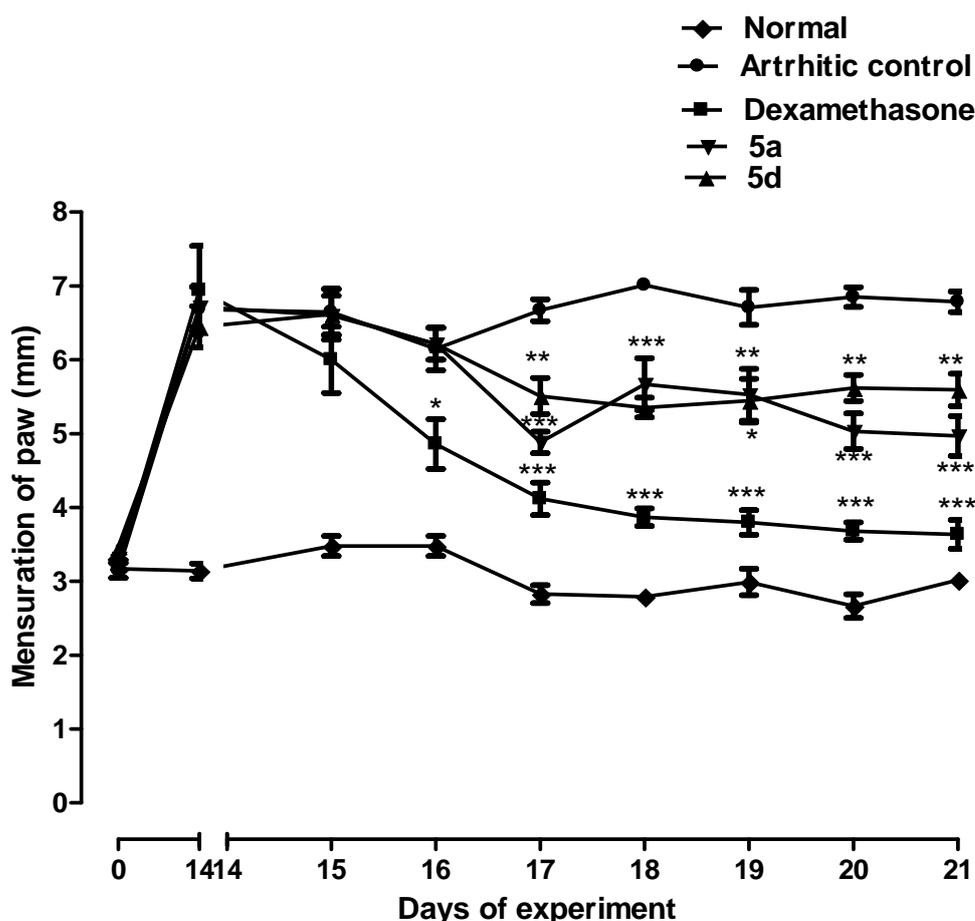
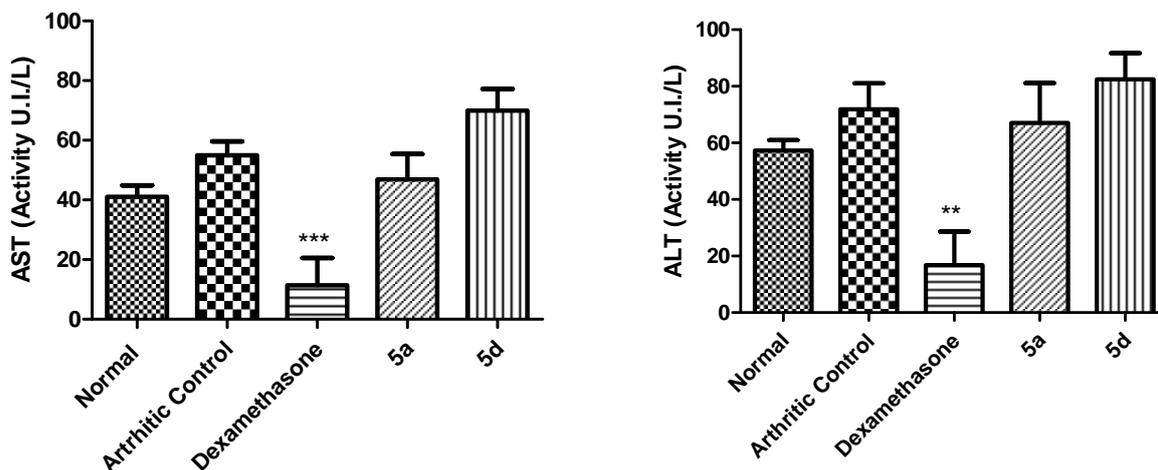


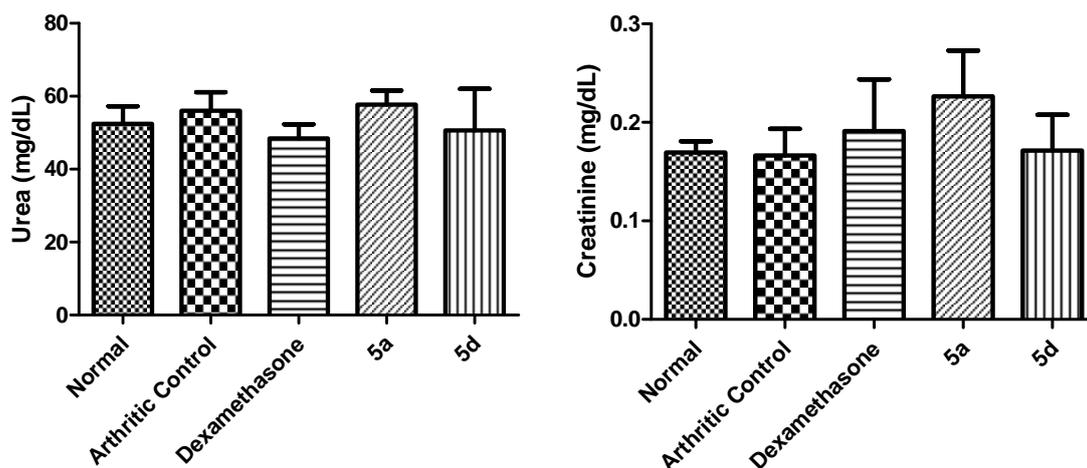
Figure 5. Effect of compounds 5a (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally) and 5d (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ; pathway orally) on the CFA-induced arthritis in rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ .

After 21<sup>st</sup> days of the arthritis experiment, animals were anesthetized and blood was collected to investigate whether treatment with 5a and 5d could generate some liver or kidney toxicity. To assess liver and renal functions the AST/ALT and urea/creatinine levels were determined on serum of animals treated with 5a and 5d (Figures 6 and 7). No alterations were observed in the levels of AST/ALT (Figure 6) and/or urea/creatinine (Figure 7), indicating that, in these conditions, compounds 5a and 5d are not hepatotoxic or nephrotoxic.

After the treated daily for seven days with **5a** and **5d** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally) the stomach of the animals was macroscopically analyzed and no signal of redness or bleeding was observed (data not shown).

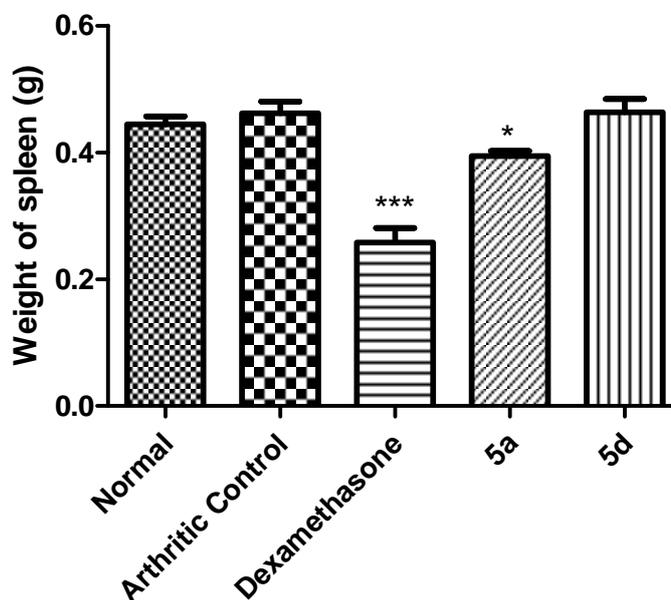


**Figure 6.** Effect of compounds **5a** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and **5d** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ) on serum ALT and AST levels. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.\*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 7.** Effect of compounds **5a** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and **5d** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ) on serum Urea and Creatinine levels. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA.

In order to discard an eventual immunosuppressant profile, animals spleen was also analyzed and no change in its body weight was observed after treatment with **5a**, whereas a slight alteration was detected with **5d**. These results indicate that **5d** doesn't promote immunosuppression, while the standard drug dexamethasone does, as indicated by its ability to change the spleen's weight (Figure 8).



**Figure 8.** Effect of compounds **5a** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and **5d** (50  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ ) on weight of spleen. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \*\*\* $p < 0.001$  and \* $p < 0.05$ .

In summary a series of functionalized 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were designed and synthesized. These new *N*-acylhydrazone derivatives showed potent analgesic and anti-inflammatory activities, standing out **5d** and **5a**. These compounds were active in acute and chronic inflammation models, and after animals treatment daily for seven days with **5a** and **5d**, with a dose of 50  $\mu\text{mol/Kg}$  by oral administration, they were unable to present renal or hepatic toxicity. Moreover, **5d** didn't

demonstrate an immunosuppressant profile. These results seem to be in agreement with the absence of toxicity identified *in silico* using the program OSIRIS Property Explorer. Taken together, these data suggest the 3-amino-thiophene-2-acylhydrazones **5a** and **5d** as new non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates. The mechanism of action of these two bioactive compounds is now being investigated.

### 3. Experimental

#### 3.1 General procedure for the preparation of 3-amino-2-thiophenecarbo hydrazide

To a solution of methyl 3-amino-2-thiophenecarboxylate in 5 ml of ethanol was added 2.5 mL of hydrazine monohydrate. The reaction mixture was maintained under reflux for 24 h, when TLC (hexane: ethyl acetate (1:1)) indicated the end of the reaction. Then the media was poured on ice and the resulting white precipitate was filtered out affording the title compound. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 4.3 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.3 (s, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>); 6.5 (d, 1H, H<sub>4</sub>), 7.4 (d, 1H, H<sub>3</sub>); 8.6 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 165 (CO); 152 (CNH<sub>2</sub>); 128 (C<sub>4</sub>); 120 (C<sub>1</sub>); 99 (C<sub>3</sub>). MS: m/z = 158 [M+H]<sup>+</sup>

#### 3.2 General procedure for the preparation of 3-amino-2-thiophenecarbo hydrazide derivatives.

Under anhydrous conditions was added 1.0 mmol of 3-amino-2-thiophenecarbo hydrazide, 5 ml of ethanol, 1 mmol of the corresponding benzaldehyde derivative and a catalytic amount of hydrochloric acid. The reaction was stirred for 1 hour at reflux and the solvent was evaporated under reduced pressure. After the reaction was added on ice and the precipitate obtained was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 2% mobile phase.

#### ***N'*-(*E*)-phenylmethylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5a; LASSBio-1660).**

Yield: 48%, white solid, m.p. 170-173°C. The melting point, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and IR data are in agreement with previous reports [27]. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3049(v NH), 1639 (v CO); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 4.45 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.68 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 7.39 (m, 3H, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>&H<sub>4'</sub>); 7.62 (d, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.74 (d, 2H, H<sub>1'</sub>&H<sub>2'</sub>); 8.04 (s, 1H, N=CH); 11.30 (s, 1H,

NH) ppm. 96% purity in HPLC (R.T. = 4.2 min; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30)). MS: m/z = 246 [M+H]<sup>+</sup>

***N'*-(*E*)-(4-isopropylphenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5b, LASSBio-1661).** Yield: 97%, white solid, m.p. 155-157°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3301 (ν NH), 1638 (ν CO), 1599 (ν CN); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.98 (m, 1H, H<sub>4</sub>); (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.62 (d, 1H, H<sub>3</sub>); 7.38 (d, 2H, H<sub>2</sub>' & H<sub>4</sub>'); 7.75 (d, 2H, H<sub>1</sub>' & H<sub>5</sub>'); 8.11 (s, 1H, N=CH); 11.3 (s, 1H, NH) ppm. 97% purity in HPLC (R.T. = 7.3 min; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30)). MS: m/z = 288 [M+H]<sup>+</sup>.

***N'*-(*E*)-(4-bromophenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5c, LASSBio-1654).** Yield: 62%, yellow solid, m.p. 230-233°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3290 (ν NH), 1637 (ν CO), 1597 (ν CN); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 6.63 (d, 2H, H<sub>2</sub>' & H<sub>3</sub>'); 7.0 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.5 (d, 2H, H<sub>1</sub>' & H<sub>4</sub>'); 7.58-7.73 (m, 2 H, 1H, H<sub>3</sub> & H<sub>4</sub>); 8.0 (s, 1H, N=CH); 11.29 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 165 (CO); 157 (C<sub>4</sub>'); 141 (C<sub>2</sub>); 134 (HC=N); 132 (C<sub>3</sub>' & C<sub>5</sub>'); 129 (C<sub>2</sub>' & C<sub>6</sub>'); 122 (H<sub>4</sub>); 119 (H<sub>3</sub>); 96 (C<sub>1</sub>'). 99% purity in HPLC (R.T. = 5.9 min; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30)). MS: m/z = 323 [M+H]<sup>+</sup>.

***N'*-(*E*)-(4-nitrophenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5d, LASSBio-1656).** Yield: 95%, orange solid, m.p. 255-257°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3369 (ν NH), 1645 (ν CO), 1586 (ν CN); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 4.62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.7 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 7.7 (d, 1H, H<sub>4</sub>); 8.0 (2, 2H, H<sub>3</sub>' & H<sub>5</sub>'); 8.1 (s, 1H, N=CH); 8.3 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>' & H<sub>6</sub>'); 11.6 (d, 1H, NH). 98% purity in HPLC (R.T. = 4.1 min; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30)). MS: m/z = 291 [M+H]<sup>+</sup>.

***N'*-(*E*)-(4-hidroxyphenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5e, LASSBio-1657).**

Yield: 84%, yellow solid, m.p. 245-248°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3289 (ν NH), 1637 (ν CO), 1581 (ν NH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): δ 3.87 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.62 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 6.84 (d, 2H, C<sub>3</sub>' & C<sub>5</sub>') 7.56-7.71 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>' & H<sub>6</sub>'); 7.92 (s, 1H, N=CH); 9.89 (s, 1H, OH) 11.02 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 165 (CO); 159 (C<sub>3</sub>); 157 (C<sub>4</sub>'); 142 (HC=N); 134 (C<sub>5</sub>); 129 (C<sub>3</sub>' & C<sub>5</sub>'); 126 (C<sub>4</sub>); 119 (C<sub>1</sub>'); 116 (C<sub>2</sub>' & C<sub>6</sub>'). 99% purity in HPLC (R.T. = 3.0 min; CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30)). MS: m/z = 262 [M+H]<sup>+</sup>.

***N'*-[*E*]-**(4-dimethylaminophenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5f, LASSBio-1653)**. Yield: 73%, brown solid, m.p. 180-184°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3301 (v NH), 1629(v CO), 1597 (v NH);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):  $\delta$  2.95 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.43 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.62 (d, 1H, H5); 6.76 (d, 2H, H3' & H5'); 7.55-7.60 (m, 3H, H4, H2' & H6'); 7.89 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ); 10.95 (s, 1H, NH) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 165 (CO); 157 (C4'); 151 (C3); 143 ( $\text{HC}=\text{N}$ ); 134 (C5); 128 (C3' & C5'); 122 (C2); 119 (C4); 112 (C2' & C6'); 97 (C1). 73% purity in HPLC (R.T. = 4.5 min;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). MS:  $m/z = 289$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .**

***N'*-[*E*]-**(4-carboxyphenyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5g, LASSBio-1655)**. Yield: 77%, yellow solid, m.p. >300°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3347 (v NH), 1692 (v CO), 1589 (v CO);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3.7 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.62 (d, 1H, H5); 7.59 (d, 1H, H4); 7.84 (d, 2H, C3' & C5'); 7.99 (d, 2H, C2' & C6'); 8.07 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ); 11.45 (s, 1H, NH) ppm. 99% purity in HPLC (R.T. = 2.8 min;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). MS:  $m/z = 290$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .**

***N'*-[*E*]-**(2-pyridin)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5h, LASSBio-1659)**. Yield: 53%, yellow solid, m.p. 226-228°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3288 (v NH), 1633 (v CO), 1579 (v NH).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3.5 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.64 (d, 1H, C5); 7.36 (t, 1H, H4'); 7.59 (d, 1H, H4); 7.89 (d, 1H, H6'); 8.06 (m, 2H, H3' & H5'); 8.5 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ); 11.42 (s, 1H, NH) ppm. 98% purity in HPLC (R.T. = 3.1 min;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). MS:  $m/z = 247$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .**

***N'*-[*E*]-**(2-thienyl)methylidene]-3-amino-2-thiophenecarbohydrazide (5i, LASSBio-1658)**. Yield: 79%, yellow solid, m.p. 221-225°C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 6.60 (s, 1H, H4'); (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7.09 (s, 1H, H5'); 7.37 (s, 1H, H3'); 7.55-7.60 (m, 2H, H4 & H5); 8.20 (s, 1H,  $\text{N}=\text{CH}$ ); 11.16 (s, 1H, NH). 99% purity in HPLC (R.T. = 3.8 min;  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). MS:  $m/z = 252$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .**

### 3.3. *In silico* Toxicological evaluation and drug-like profile

The *in silico* toxicity and drug-like profile of 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were calculated using the Program OSIRIS Property Explorer

(<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) [19]. Data were generated on-line and represented by toxicity risks (mutagenic, irritant, tumorigenic and reproductive effects), druglikeness and drug-score.

### **3.4 Analgesic and anti-inflammatory murine models**

#### **3.4.1 Reagents**

Acetic acid (Merck), arabic gum (Sigma–Aldrich), carrageenan (Sigma–Aldrich), complete Freund’s adjuvant (CFA) (Sigma–Aldrich), dipyrrone (Sigma-Chemical), indomethacin (Merck Sharp & Dome) and dexamethasone were obtained from commercial sources. A solution of 2.5% formalin was prepared with formaldehyde (Merck) in saline (NaCl 0.9%).

#### **3.4.2 Animals**

Experiments were conducted using Swiss mice obtained from the BIOCEN—UFAL breeding unit, weighing 20–30 g each, males, adult, with 6–8 weeks of age, distributed in groups up to 6–8 animals for treatment. Wistar rats (130–170 g), males, were used in the experiment of induction of arthritis. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25–28 °C under a controlled 12 h light/dark cycle. All animals were manipulated according to the norms established by the Ethics Commission—UFAL for handling animals (Protocol number: 14/2013).

#### **3.4.3 Acetic acid-induced abdominal constriction test**

The peripheral analgesic activity was evaluated in male mice using the acetic acid-induced writhing test [20]. The acetic acid-induced abdominal constriction test was carried out as described previously by Coolier, 1968 with minor modifications in groups of six animals. In order to induce pain in mouse peritoneal cavity, 0.6% of acetic acid (10 ml/Kg)

was injected intraperitoneally, 40 min after the oral administration of 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** (dose = 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ ) and the standard dipyrene (dose = 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu\text{mol/Kg}$ ). The  $\text{ID}_{50}$  was calculated by nonlinear regression. The abdominal constriction resulting from the injection of acetic acid consists of a contraction of the abdominal region together with a stretching of the hind limbs or all limbs. The number of abdominal constrictions was counted cumulatively over a period of 20 min, commencing 5 min after acetic acid administration. The animals were then placed immediately to individual in a transparent plastic box. Anti-nociception response was indicated by the reduction in the mean of 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** number of abdominal constrictions in the test groups compared to the control group. Dipyrene was used as reference drugs while control group received vehicle (arabic gum) that was used to dissolve compounds.

#### **3.4.4 Formalin Test**

The method used for this test was similar to that described by Hunskaar and Hole [21] with minor modifications. Adult Swiss mice were divided in groups of six mice each and pre-treated with 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** (dose = 30  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o.) or indomethacin (dose = 10  $\mu\text{mol/Kg}$ , p.o.). Forty minutes after this treatment they were administered with 20  $\mu\text{L}$  of a 2.5% solution of formalin, subcutaneously under the plantar surface of the left hind-paw. Using a chronometer, the total time spent in licking and biting the injected paw is recorded, quantifying thus the nociceptive behavior. Anti-nociceptive effect was determined in two phases, the early phase from 0 to 5 min and the late phase 15 to 30 min with a 10 min lag period in between both phases.

### 3.4.5 Carrageenan-Induced Peritonitis

Peritoneal inflammation in male mice was produced according to the method described by Ferrándiz and Alcaraz, 1991 [22]. Carrageenan was freshly prepared (10 mg/mL) in sterile 0.9% w/v saline, and 250  $\mu$ L were injected i.p., After 4 hours, the animals were killed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 3.0 mL cold PBS, and after a gentle manual massage, the exudate was retrieved and its volume was measured. The number of recruit leukocytes to the peritoneum was counted in a Newbauer chamber and results were expressed as cells  $\times 10^6$ /mL. The 3-amino-thiophene-2-acylhydrazone derivatives **5a-i** were tested orally in doses of 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu$ mol/Kg. The carrageenan group (arabic gum, p.o.) and the reference drug (indomethacin, 100, 30, 10, 3 and 1  $\mu$ mol/Kg, p.o.) were administered 30 min before the carrageenan injection. These five doses were performed in order to calculate the ID<sub>50</sub>. The ID<sub>50</sub> was calculated by nonlinear regression. In the negative control group, animals have just received the same dose of a vehicle (arabic gum, p.o.) 30 min before the saline injection by intraperitoneal route.

### 3.4.6 Arthritis model induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in rats

Before the onset of arthritis, Wistar rats were divided separately into 5 groups randomly: the normal control group, the AA model group, the positive control group (i.e. dexamethasone; 5  $\mu$ mol/Kg, pathway orally, daily), 5a (50  $\mu$ mol/Kg, pathway orally, daily), 5d (50  $\mu$ mol/Kg, pathway orally, daily), and Complete Freund's adjuvant (CFA) (0.2 mL/paw) was injected into the right paw of rats. The CFA solution was prepared as a 1 mg/mL suspension of heat-killed *Mycobacterium butyricum* in 0.85 ml of paraffin oil and 0.15 ml of mannide monooleate (Sigma-Aldrich) [23]. At 14 days after the CFA injection the animals received during seven days the treatment with 5d, 5a derivatives and dexamethasone. The paw volumes were measured on the 1st, 14th, 15th, 16th, 17th, 18th, 19th, 20th and 21st

days using a digital caliper (Mitutoyo). Mean paw volumes were obtained daily for treated groups and compared with paw volumes of the positive control group. At 21<sup>o</sup> day the animals were anesthetized with a solution ketamine/diazepam (75 mg/Kg and 5 mg/Kg, i.p.), blood was collected by cardiac puncture for biochemical measurements Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Urea and e Creatinin, methods kit Doles-Brazil. After collection held a deeper anesthesia for euthanasia of animals. The paw arthritic was collected for histological analysis and the spleen was collected for weighed.

### **3.4.7 Biochemical measurements**

The blood was collected by cardiac puncture using 50 µL of EDTA as an anticoagulant. The blood was centrifuged after collection was centrifuged at 1500 rpm for 5 min. After centrifugation the serum was aliquoted and used for carrying out the biochemical levels of urea, creatinine, AST and ALT. The level of AST/ALT was performed as follows. 200 µL of working reagent was placed in wells of a 96 well plate, 20 µL of serum was added and homogenized performed as reading spectrophotometer wavelength at 340 nm. This was done with the initial reading and repeated three readings at intervals of 1, 2, and 3 min to calculate the Delta Abs. The formula used to calculate the dose of ALT/AST is below:

$$\text{ALT UI/L} = \Delta A/\text{minute} \times 1746$$

$$\text{AST UI/L} = \Delta A/\text{minute} \times 1746$$

The urea was carried expressed as follows: 100 µL of reagent 1 was placed in cavity 96 well added 5 µL of urease and 1 µL of serum sample or standard plate. The plate was incubated in a spectrophotometer for 5 min at 37<sup>o</sup> C and then added to 100 µL of reagent 2. After that the reading plate with a wavelength of 600 nm was performed. The quantity of urea was performed followed by the formulas below:

$$\text{Factor (F)} = \frac{80}{\text{Absorbance of the standard}}$$

$$\text{Urea (mg/dL)} = \text{Absorbance test} \times \text{F}$$

The serum creatinine was performed according to the following protocol: 200  $\mu\text{L}$  of working reagent was aliquoted into 96-well plate, added 20  $\mu\text{L}$  of serum. The plate was incubated for 30 seconds in the spectrophotometer. After incubation took place after the initial reading and the final reading of 60 seconds. The formula used to calculate the amount of creatinine in the samples is as follows:

$$\text{Factor (F)} = \frac{5}{(\text{Absorbance initial} - \text{Absorbance final}) \text{ standart}}$$

$$\text{Creatinine (mg/dL)} = (\text{Abs ini} - \text{Abs fin}) \text{ sample} \times \text{F}$$

### 3.4.8 Macroscopic analyses of the stomach

After euthanasia, the stomachs were removed for macroscopic examination of the occurrence of lesions with daily treatment for 7 days with dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally), 5d (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally), and 5a (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally). The mucosal damage was examined by means of a magnifying glass. For each stomach, the mucosal damage was assessed according to the following scoring system [28].

---

0.5 Redness
1.0 Spot ulcers
1.5 Hemorrhagic streaks
2.0 Ulcers <3, but $\leq 5$
3.0 Ulcers >5

---

### 3.4.9 Weighing spleen

In order to evaluate a possible immunosuppression promoted by the daily treatment for 7 days with dexamethasone (5  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally), 5d (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway

orally), and 5a (50  $\mu\text{mol/Kg}$ , pathway orally), after euthanasia we proceeded with the removal of the spleen. The spleen was washed with PBS and weighed on an analytical balance. Treated groups were compared to the arthritic group.

### 3.3.10 Statistical analysis

Data obtained from animal experiments are represented by mean  $\pm$  standard error of the mean (mean  $\pm$  S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t of Student or ANOVA in the tutorial Prisma®. Values were considered significant if  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ .

## 4. References

1. Majno, G.; Joris, I. In: **Cells, Tissues and Disease**, 2004.
2. Kumar, V.; Cotran, R. S.; Robbins, S. L. In: **Robbins Basic Pathology**, 2010.
3. Nathan, C. Points of control in inflammation. **Nature**, 420: 846–885. 2002
4. Gilroy, D. W.; Lawrence, T.; Perretti, M.; Rossi, A. G. Inflammatory resolution: New opportunities for drug Discovery, **Nature Reviews Drug Discovery**: 401-16, 3, 2004.
5. Turini, M. E; DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. **Annual Reviews of Medicine**, 53:35-57, 2002.
6. Marnett, L. J; Kalgutkar A. S. "Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future **Trends in Pharmacological Sciences**, 20: 465-469, 1999.
7. Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., Manthey, C.L. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  in inflammatory cell lineages. **Journal of Immunology**, 162: 4246–52, 1999.
8. Philip, C. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, 1: 309-315, 2002.
9. Chandrasekharan, N.V.; Dai, H.; Roos, K.L.; Evanson, N.K.; Tomsik, J.; Elton, T.S.; Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 21: 13926-31, 2002.

10. Kajal, A.; Bala, S.; Sharma, N.; Kamboj, S.; Saini, V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. **International Journal of Medicinal Chemistry**, 2014: 1-11, 2014.
11. Duarte, C. M.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drugs Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 7: 1108-1119, 2007.
12. Tributino, J. L. M.; Duarte, C. D.; Correa, Rodrigo, S.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J.; Romeiro, N. C.; Castro, N. G.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17: 1125-1131, 2009.
13. Cupertino-Silva, Y.K.; Villarinho, A.C.; Barbosa, M. L. C.; Melo, G. M.A.; Queiroz, A. C.; Dias, T. L.M. Freire ; Júnior, W. B.; Barreiro, E. J. ; Lima, L. M.; Alexandre-Moreira, M. S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 18: 5007-5015, 2010.
14. Kheradmand, A; Navidpour, L; Shafaroodi, H; Saeedi-Motahar, G; Shafiee, A. Design and synthesis of niflumic acid-based N-acylhydrazone derivatives as novel anti-inflammatory and analgesic agents. **Medicinal Chemistry Research**, 22: 2411-2420, 2013.
15. Kaplancikli, Z. A; Altintop, M. D.; Özdemir, A.; Turan-Zitouni, Khan G S. I.; Tabanca, N. Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as anti-inflammatory agents. **Letters in Drug Design & Discovery**, 9: 310–315, 2012.
16. Asif, Mohammad.; Husain, Asif. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. **Journal of Applied Chemistry**, 2013: 1-7, 2013.
17. Rollas, S.; Küçükgül, Ş. G. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules**, 12, 1910-1939, 2007.
18. Zhai, X.; Huang, Q.; Jiang, N.; Wu, Di.; Zhou, H.; Gong P. Discovery of Hybrid Dual N-Acylhydrazone and Diaryl Urea Derivatives as Potent Antitumor Agents: Design, Synthesis and Cytotoxicity Evaluation. **Molecules**, 18: 2904-2923, 2013.
19. Lima, M. L; Barreiro, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, 12, 23-49, 2005.

20. Lima, P.C.; Lima, LM; da Silva, K.C.M; Léda, PHO; Miranda, ALP et al; Synthesis and analgesic activity of novel N-acylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 35:187-203, 2000.
21. Kummerle, A.E; Raimundo, J.M.; Leal, C.M.; da Silva, G.; Balliano, T.L. et al. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilatador arylidene N-acylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** 44: 4004–4009, 2009.
22. Sander, T.; Freyss, J.; Von-Korff, M.; Reich, J. R.; Rufener, C. OSIRIS, an Entirely in-House Developed Drug Discovery Informatics System. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 49, 232-246, 2009.
23. Coolier, H. O. J.; Dinnen, L. C.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, 32, 285 - 310, 1968.
24. Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.
25. Ferrándiz, M. L.; Alcaraz, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acidmetabolism by flavonoids. **Inflammation Research**, 32: 283–288, 1991.
26. Newbould, B. B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterium adjuvant. **British Journal of Pharmacology**, 45: 375-333, 1963.
27. Huddleston, Patrick R.; Barker, John M.; Synthesis and chemistry of some thieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-ones. **Journal of Chemical Research**, 72-3, 1993.
28. Cioli, V.; Putzolu, S.; Rossi, V.; Barcellona, P. S; Corradino, C. The Role of direct contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 50: 283-289, 1979.



# 4. CAPÍTULO II-ARTIGO II DERIVADO DA TESE

*Bioorganic and Medicinal Chemistry*

**Impact Factor: 2.903**

## **Synthesis and evaluation antinociceptive and anti-inflammatory of 4-aminoquinolines derivatives**

Raquel de Meneses Santos<sup>a</sup>, Pooline Rocha Barros<sup>a</sup>, Juliana Almerino Silva<sup>a</sup>, Mario Roberto Meneghetti<sup>a\*</sup>, Yolanda Karla Cupertino da Silva<sup>b</sup>, Magna Suzana Alexandre Moreira<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>GCaR – Grupo de Catálise e Reatividade Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

<sup>b</sup>LaFI - Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

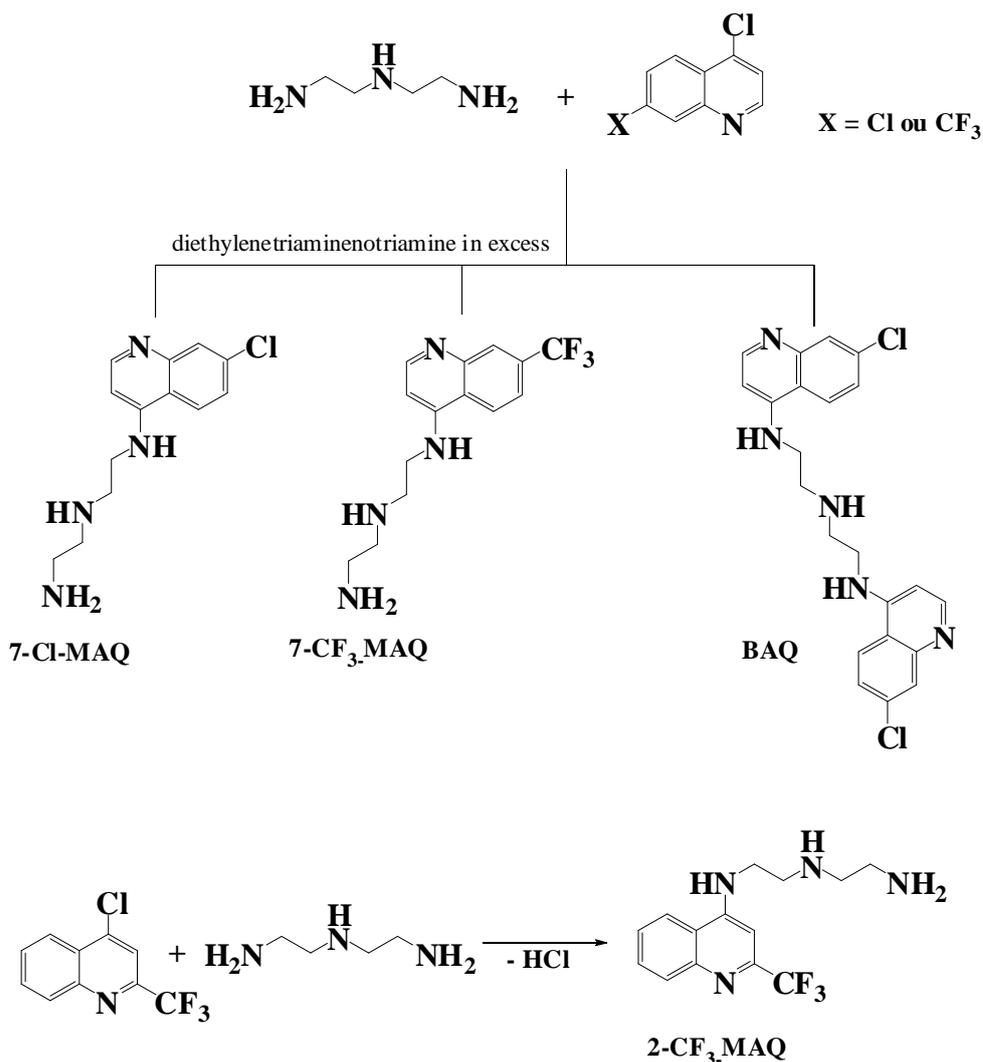
### **Abstract**

In this paper we describe the planning synthesis and pharmacological evaluation of a series of 4-aminoquinolines. The compounds were characterized and tested in models of pain and inflammation (writhing test by acetic acid, formalin test, peritonitis by zymosan and arthritis by adjuvant complete of Freund's). The results revealed that the all 4-aminoquinolines prepared promote antinociceptive and acute and chronic anti-inflammatory effects, with marked activity to the derivates labeled BAQ and 7-CF<sub>3</sub>-MAQ. After 7 days of treatment with BAQ and 7-CF<sub>3</sub>-MAQ did not induced hepatotoxicity, gastrotoxicity or nephrotoxicity.

### **1. Introduction**

Inflammation is a biological reaction to a disrupted tissue homeostasis. At its basic level, it is a tissue-destroying process that involves the recruitment of blood-derived products, such as plasma proteins, fluid, and leukocytes, into perturbed tissue. This migration is facilitated by alterations in the local vasculature that lead to vasodilation, increased vascular permeability, and increased blood flow [1]. When not regulated properly, excessive inflammation can have devastating effects, resulting in excessive collateral damage and pathology [2]. Thus, several drugs are used to treat inflammation, including chloroquine, an anti-malarial drug, but classified as a modifying agent for rheumatic disease due to its immunosuppressive potential. The Group of Catalysis and Chemical Reactivity designed and synthesized 4 compounds (**BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ**) (**Figure 1**) from chloroquine to be tested in models of pain and inflammation molecule.

The anti-rheumatic disease-modifying drugs (ARDMDs) are a group of drugs with the potential to decrease and prevent joint and preserve the functionality of the joints damage. Synthetic ARDMDs include chloroquine, hydroxychloroquine, sulfasalazine, methotrexate and cyclosporine [3]. Chloroquine and analogues are used to treat diseases other side of malaria, as drugs for treating various chronic diseases such as systemic lupus erythematosus, discoid lupus, sarcoidosis, among others [4]. For that reason, we develop and test aminoquinoline derivatives as drug prototypes against rheumatism.



**Figure 1.** Design of the 4-aminoquinolines derivatives

## 2. Results and Discussion

### 2.1 Synthesis of the compounds

All aminoquinoline were prepared in good yields, using the same strategy developed elsewhere (**Figure 1**), with slight modifications during workup [5]. These reaction mechanism in all these synthetic reactions are via a S<sub>N</sub>Ar. All compounds were isolated as white or slightly yellow solids, and were fully characterized by NMR and IR spectroscopy.

## 2.2. Spectroscopic Characterization

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra as well the infrared spectra of **7-Cl-MAQ** and **BAQ** were the same to that already published elsewhere [5]. For **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** the  $^1\text{H}$  NMR spectrum displays the five signals (two triplets, two duplets, and one singlet) for the aromatic hydrogens were observed between 8.16 and 6.79, as well as the four triplets related to the methylenic groups, between 3.53 and 2.73 *ppm*. The hydrogen signals of the amino groups were either not observed or had integration values lower than the predicted, due to the fast H/D exchange with the deuterated solvent. In the case of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of this compound, it was possible to identify the signal related to the CF<sub>3</sub> group (124.8 *ppm*), the nine signals related to the aromatic carbons (between 156.7 and 97.1 *ppm*) and the four signals associated to the methylenic carbons (between 54.8 and 44.2 *ppm*). In the infrared spectrum of **2-CF<sub>3</sub>-MAQ**, the typical absorption bands for this kind of chemical structure were observed. Similarly, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** presents a  $^1\text{H}$  NMR spectrum shows the five signals related to the aromatic hydrogens (four duplets and one singlet), and the four signals associated to the methylenic groups; and the expected fourteen signals on the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum. Also the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** shows the signals related to the CF<sub>3</sub> group (124.1 *ppm*), the nine aromatic carbons (between 155.7 and 97.8 *ppm*) and the four ones associated to the methylenic carbons (between 54.1 and 43.9 *ppm*). In the infrared spectrum of **7-CF<sub>3</sub>-MAQ**, the typical absorption bands for this kind of chemical structure were observed.

## 2.3 Biological Assays

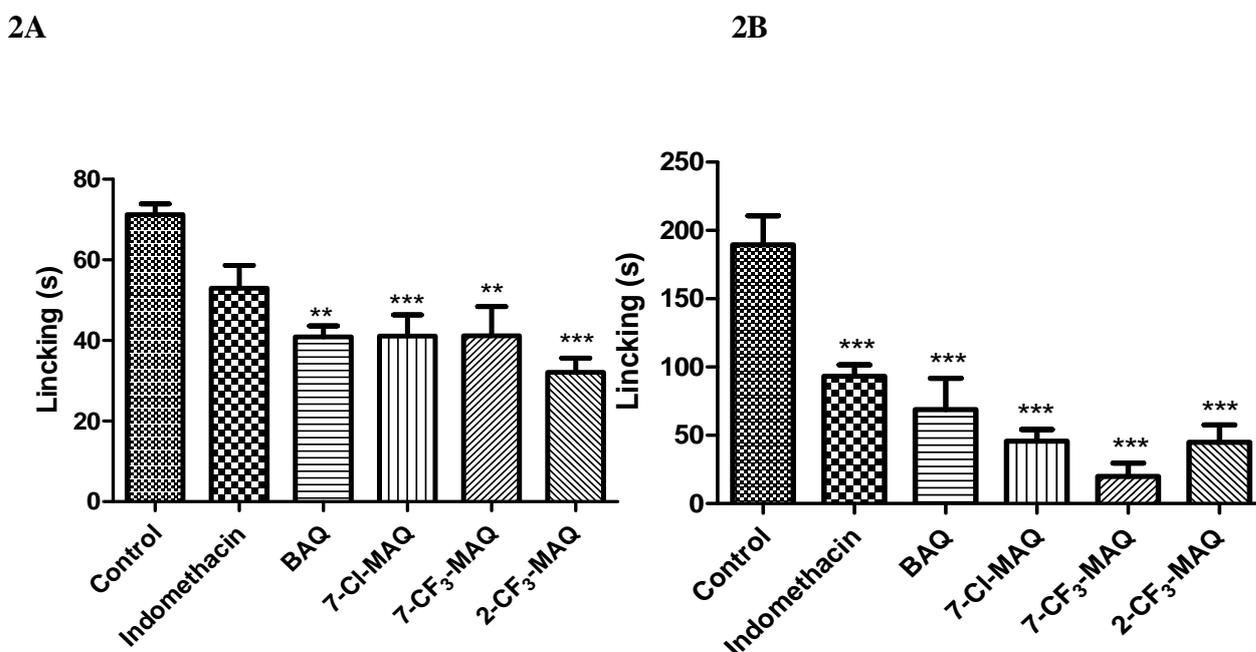
The present study was undertaken to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effect of 4-aminoquinolines derivatives on four classical models: the acetic acid induced writhing test, the formalin test, peritonitis by zymosan and arthritis by CFA in rats.

The i.p. administration the 4-aminoquinolines derivatives (**BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ**, and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ**) (100, 30, 3 and 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , **Table 1**), caused a significant reduction in the number of writhing episodes induced by acetic acid compared to the control groups with  $\text{ID}_{50}$ , **BAQ** ( $11.54 \pm 3.72 \mu\text{mol/kg}$ , 97,27%), **7-Cl-MAQ** ( $39.49 \pm 13.46 \mu\text{mol/kg}$ , 86.36%), **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** ( $15.39 \pm 4.24 \mu\text{mol/kg}$ , 96,72%) and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** ( $26.66 \pm 6.45 \mu\text{mol/kg}$ , 95.08%). The compounds, **BAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** cause a reduction in the number of writhes with high potency and efficacy, higher than the standard drug dipyrrone ( $36.84 \pm 6.77 \mu\text{mol/kg}$ , 74.85%). 4-aminoquinolines derivatives showed antinociceptive effect in the acetic acid- induced writhing. This is a classical model widely used to screen new agents with analgesic activity where both neurogenic and/or inflammatory pain are involved [6].

**Table 1.  $\text{ID}_{50}$  of 4-aminoquinolines derivates (100, 30, 3 and 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ ) and dipyrrone (100, 30, 3 and 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ ) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, for a period of 25 min.**

<b>Compound</b>	<b><math>\text{ID}_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/kg} \pm \text{S.E.M.}</math>)</b>	<b><math>\text{Emax}</math> (<math>\% \pm \text{S.E.M.}</math>)</b>
<b>Dipyrrone</b>	<b><math>36.84 \pm 6.77</math></b>	<b><math>74.85 \pm 3.88</math></b>
<b>BAQ</b>	<b><math>11.54 \pm 3.72</math></b>	<b><math>97.27 \pm 2.3</math></b>
<b>7-Cl-MAQ</b>	<b><math>39.49 \pm 13.46</math></b>	<b><math>86.36 \pm 7.65</math></b>
<b>7-CF<sub>3</sub>-MAQ</b>	<b><math>15.39 \pm 4.24</math></b>	<b><math>96.72 \pm 5.4</math></b>
<b>2-CF<sub>3</sub>-MAQ</b>	<b><math>26.66 \pm 6.45</math></b>	<b><math>95.08 \pm 6.9</math></b>

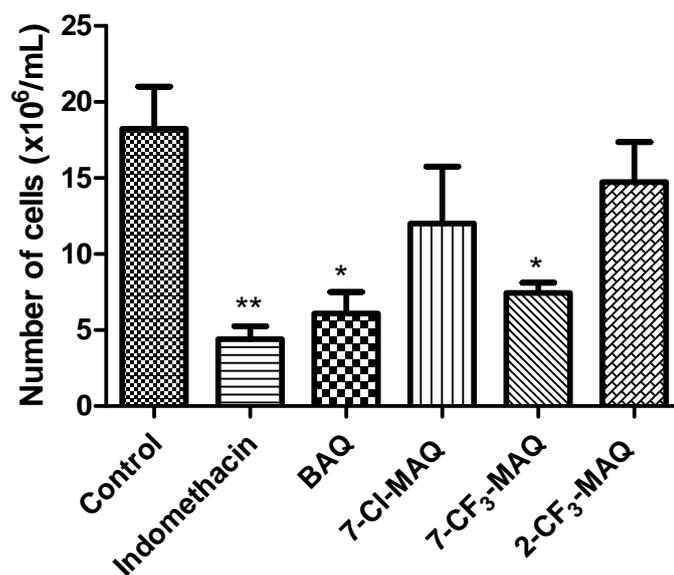
To continue pharmacological evaluation, testing nociception induced by formalin was performed. As shown in **Fig. 2A and 2B** all derivatives were able to statistically significantly reduce the time to lick the paw of the animals in neurogenic and inflammatory phase of formalin test with marked reduction of response the derivate **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** (89.57%) in second phase. The standard drug indomethacin inhibited 50.79% of licking of paw. The formalin test has an advantage over other frequently used tests as it involves a biphasic response with an early and a late phase representing neurogenic and inflammatory pain and agents can be screened for activity in these two models of pain [7].



**Figure 2.** Effect of 4-aminoquinolines derivatives and indomethacin on the formalin test in mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

The results obtained in the zymosan-induced peritonitis test are shown in **Figure 3**. The data revealed that at the dose tested the treatment with derivatives **BAQ** and **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** (100  $\mu$ mol/kg, i.p.) caused a significant reduction in the leukocyte migration into the

peritoneal cavity in comparison to the control group. **BAQ** inhibited cell migration by 66.54%, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** 59.14%. Indomethacin (10  $\mu$ mol/kg, i.p.), standart drug inhibited 75.86% the inflammatory response. The compounds 4-aminoquinolines derivatives were able to inhibit cell migration in zymosan-induced peritonitis model suggesting that these compounds have anti-inflammatory activity. Zymosan causes a reproducible inflammatory reaction and remains the standard irritant for examining acute inflammation and anti-inflammatory drugs [8]. Inflammation induced by zymosan develops immediately following subcutaneous injections, resulting from the combined action of prostaglandins, bradykinin, histamine, tachykinins and reactive oxygen species. Neutrophils readily migrate to sites of inflammation. [9].



**Figure 3.** Effect of 4-aminoquinolines derivatives and indomethacin on the zymosan-induced peritonitis in mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

To assess whether the derivatives interfere in chronic inflammatory processes held the test syndrome arthritis in rats. Administration of CFA produced increase in the joint diameter of all the animals which was persistent throughout the observation period. As illustrated in **Figure 4** BAQ and 7-CF<sub>3</sub>-MAQ decreased paw edema in a statistically significant way from the 17th day of treatment remained decreased until the day of sacrifice ( $p < 0.05$ ). The treatment with dexamethasone statistically significantly decreased the paw edema after the way from the 16<sup>th</sup> day.

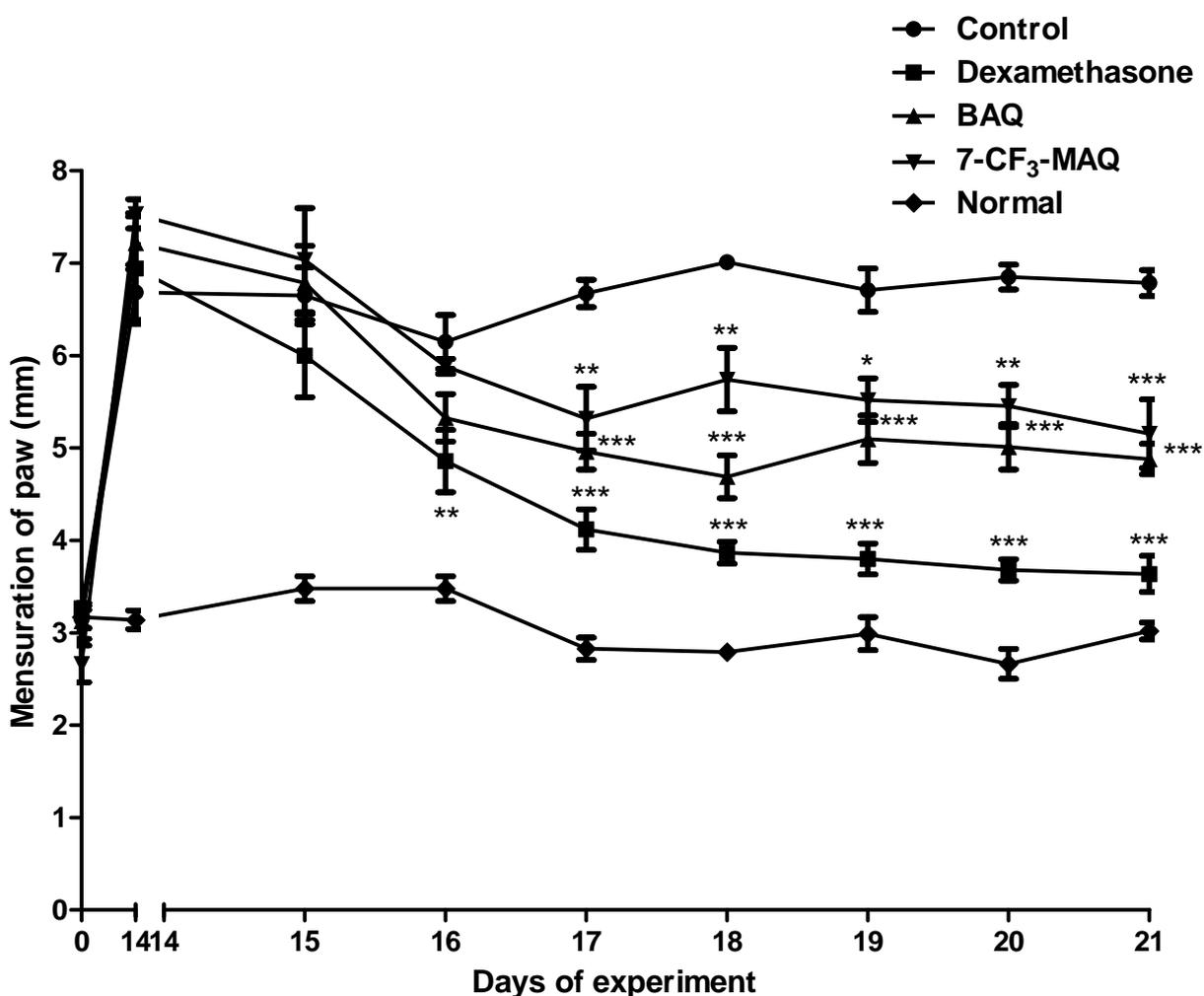


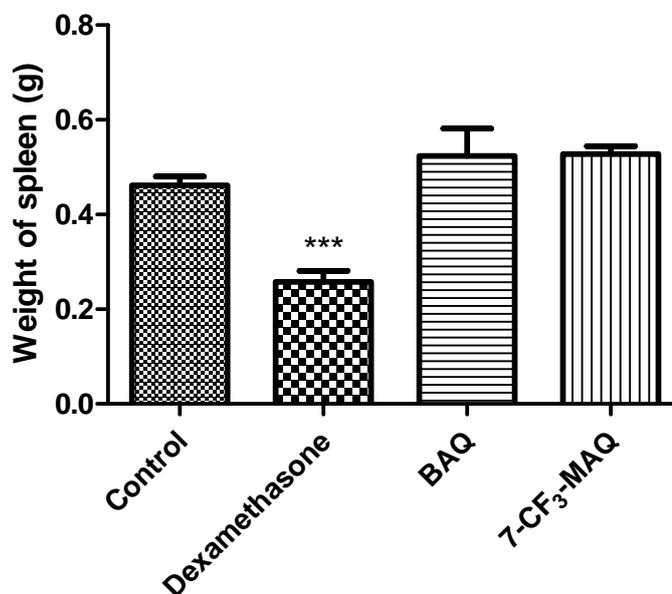
Figure 4. Effect of compounds BAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), 7-CF<sub>3</sub>-MAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/kg}$ ) on the CFA-induced arthritis in rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six animals. Statistical differences between the treated and the

**control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ .**

In assay arthritis by complete Freund's adjuvant, **BAQ** and **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** were evaluated. The treatment with derivatives showed significant ( $p < 0.05$ ) reduction in rat paw volume when compared with control group, indicating their ability to control a chronic inflammatory process. The model of adjuvant-induced arthritis in the rat has been used for many years for evaluation of anti-arthritic/anti-inflammatory agents [10] and is well characterized [11]. CFA and water in an oil emulsion containing heat-killed mycobacterium is frequently used to induce arthritis in experimental animals. The structure of heat killed mycobacterium resembles proteoglycans, and arthritis can be developed by a cross-reactive CD4 T cell clone that recognizes an epitope present on bacterial heat shock proteins and cartilage proteoglycans [12]. Animals develop arthritis within 10–14 days following CFA injection. The adjuvant arthritis animal model is very similar to human rheumatoid arthritis and resembles to pathological and serological changes, including the inflammatory mediators [13]. In the adjuvant-induced arthritis model, the rat develops chronic swelling and pain in multiple joints with a release of cytokines from inflammatory cells, culminating in erosion of cartilage and bone destruction, causing severe disability [14]. Inflammation in CFA arthritis model is indicated by increase in paw volume of injected paw. Quantification of such volume helps in determination of the severity of inflammation and therapeutic efficacy of drugs [15].

In the experiment of arthritis blood was collected for performing biochemical testing and verification of renal and hepatic toxicity. The stomach was removed for macroscopic examination of the occurrence of ulcers and the spleen was weighed to assess weight change

which may suggest immunosuppression. As can be seen in **Figure 5** derivatives did not alter the weight of the spleen, suggesting that they do not cause immunosuppression.



**Figure 5.** Effect of compounds BAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), 7-CF<sub>3</sub>-MAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/kg}$ ) on weight of spleen. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.\*\*\* $p < 0.001$ .

Regarding the determination of liver enzymes, and treatment with 7-CF<sub>3</sub>-MAQ BAQ not altered enzyme levels (ALT and AST) (**Figure 6**) suggesting that treatment for 7 days with these derivatives do not cause liver damage. In the evaluation of renal function (Urea and creatinine) (**Figure 7**) with secondary treatment BAQ altered creatinine levels suggesting impaired renal function. Macroscopic evaluation of the treatment did not cause stomach ulcers or bleeding points (data not shown).

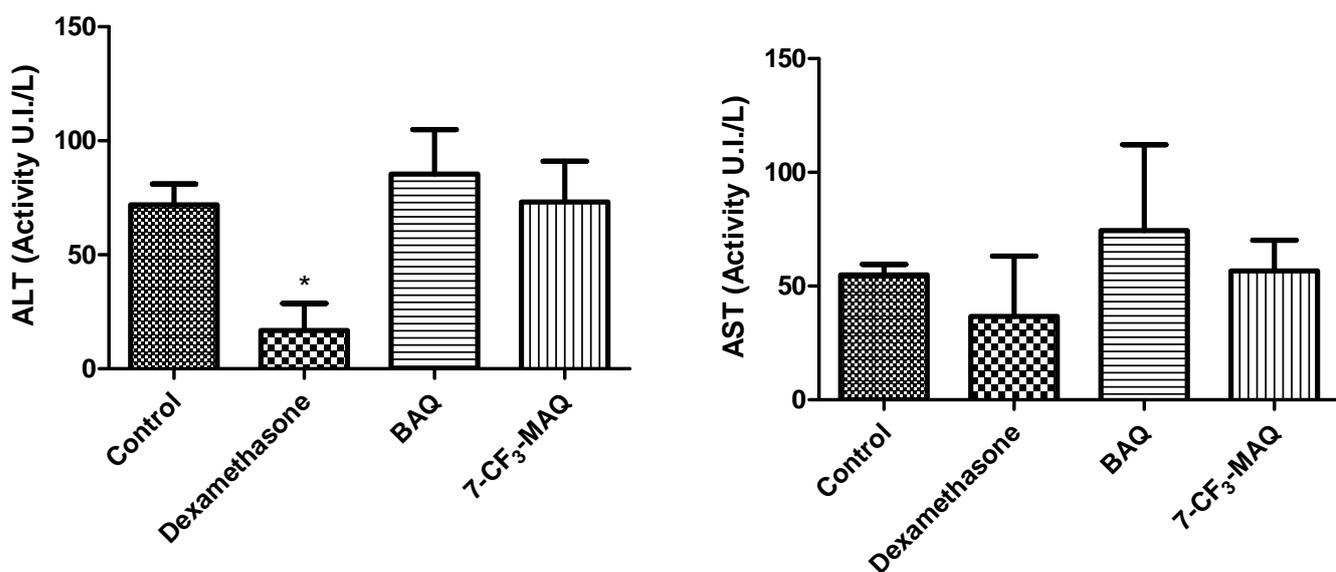
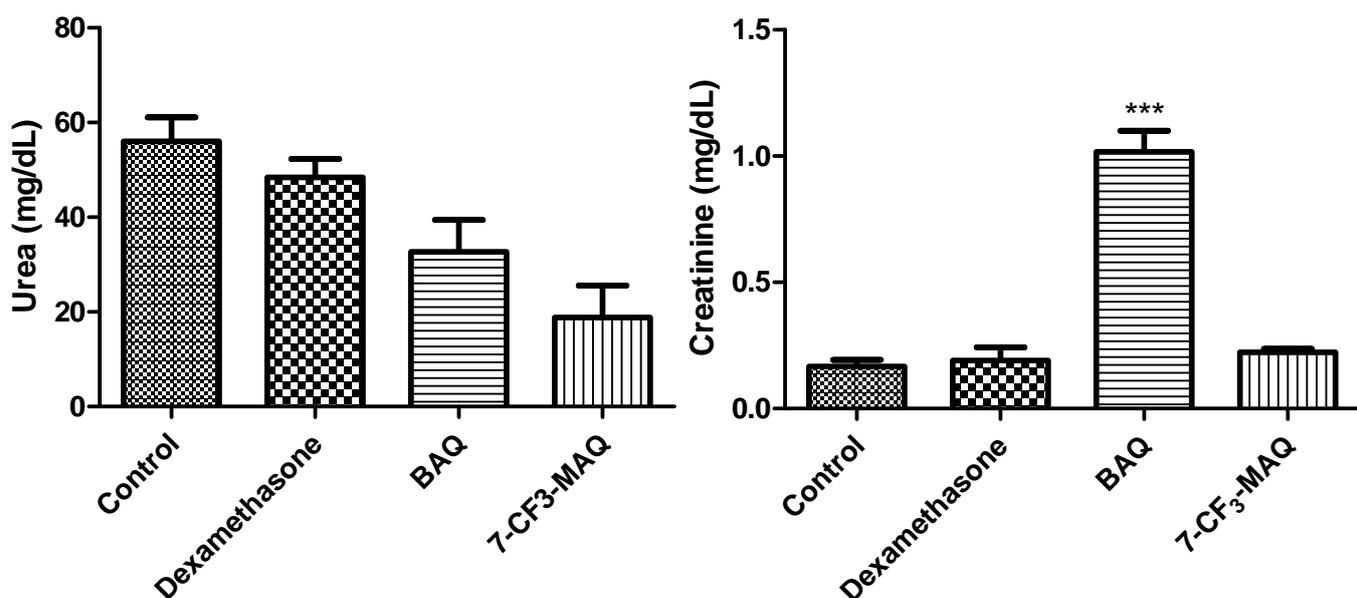


Figure 6. Effect of compounds BAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), 7-CF<sub>3</sub>-MAQ (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) and dexamethasone (5  $\mu\text{mol/kg}$ ) on serum ALT and AST levels. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.\* $p < 0.05$ .



**Figure 7. Effect of compounds BAQ (100 µmol/kg), 7-CF<sub>3</sub>-MAQ (100 µmol/kg) and dexamethasone (5 µmol/kg) on serum Urea and Creatinine levels. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups.\*\*\**p* <0.001.**

### **3. Experimental**

#### **3.1 Materials and Methods**

All reagents employed to the synthesis of the aminoquinoline derivatives were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. The aminoquinoline derivatives **7-Cl-MAQ** and **BAQ** were prepared as [15], with slight modifications. The IR spectra were recorded on a Varian 640-IR with an ATR device and the elementary analyses were conducted at the analytical center, University of São Paulo. The <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 400.130 MHz and the <sup>13</sup>C NMR spectra at 100.613 MHz on a Bruker instrument (Bruker Avance 400) and were externally referenced to the tetramethylsilane (TMS). Chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants (*J*) were expressed in ppm and Hz, respectively. The melting or decomposition points of the structures were determined on a MQAPF 302 apparatus. The following drugs were used in this study: Acetic acid (Merck), zymosan (Sigma–Aldrich), complete Freund’s adjuvant (CFA) (Sigma–Aldrich) were obtained from commercial sources. In all experiments, 4-aminoquinolines derivatives and standart drugs (dipyron, indomethacin and dexamethasone) were used with 20 µL of Tween 80 and distilled water.

### 3.2 Animals

Experiments were conducted using Swiss mice obtained from the BIOCEN—UFAL breeding unit, weighing 20–30 g each, males adult, with 6–8 weeks of age, distributed in groups up to 6–8 animals for treatment. Wistar rats (150–200 g), males were used in the experiment of induction of arthritis. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25–28 °C under a controlled 12 h light/dark cycle. All animals were manipulated according to the norms established by the Ethics Commission—UFAL for handling animals.

### 3.3 Synthesis of the aminoquinoline derivatives

To the synthesis of the **7-Cl-MAQ**, and **BAQ**, see the procedures described by Aguiar and co-workers (2012). Compounds **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** were prepared similarly.

#### 3.3.1 Synthesis of the **7-CF<sub>3</sub>-MAQ**, **N<sup>1</sup>-(2-aminoethyl)-N<sup>2</sup>-(7-trifluoromethyl)quinolin-4-yl)ethane-1,2-diamine**.

Briefly, a mixture of 4-chloro-7-(trifluoromethyl)quinoline (1.0 g, 4.9 mmol) and diethylenetriamine (2.7 mL, 25 mmol) was heated at 80 °C for 1 h without stirring, following by heating at 135 °C for 3 h with stirring. The mixture was cooled to room temperature, alkalized with an aqueous solution of 10% NaOH (30 mL), extracted with hot EtOAc (3x 50 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under vacuum leading to a light-yellow solid (F.M.: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>; M.M.: 298,31 g/mol).

Yield: 1.09 g, 75%.

M.P.:99 °C;

I.V. ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ): 3295 (Ar- NH); 3068 (CH quinoline ring); 2946 e 2831 (as/s CH e CH<sub>2</sub>); 1594 (C=N), 1571 e 1524 (C=C quinoline ring); 1438 (CH<sub>2</sub>); 1285 (Ar-C-N); 1123 (C-N); 824, 795 e 765 ( $\delta$  =C-H aromatic out of plane).

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  1.93 (s, NH amine), 2.78 (t,  $J$ = 5.76Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.85 (t,  $J$ = 5.76Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.95 (t,  $J$ = 6.38Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.47 (t,  $J$ = 6.38Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.70 (ls, NH aniline), 6.50 (d,  $J$ = 5.71Hz, 1H, Ar-H C-3), 7.35 (dd,  $J$ = 9.01 Hz,  $J$  = 2.14 Hz, 1H, Ar-H C-6), 7.73 (d,  $J$  = 2.14Hz, 1H, Ar-H C-8), 8.07 (d,  $J$  = 9.01Hz, 1H, Ar-H C-5), 8.32 (d,  $J$  = 5.62Hz, 1H, Ar-H C-2).

NMR <sup>13</sup>C(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Me OD):  $\delta$  155,7(C-2), 97,8(C-3), 152,3 (C-4), 129,6(C-5), 132,1 (C-6), 151,0 (C-7), 134,1 (C-8), 151,9 (C-9), 122,9 (C-10), 124,1 (CF<sub>3</sub>), ), 50,7 (C-12), 44,2 (C-13), 54,6 (C-15), 46,3 (C-16).

### 3.3.2. Synthesis of the 2-CF<sub>3</sub>-MAQ, N<sup>1</sup>-(2-aminoethyl)-N<sup>2</sup>-(2-trifluoromethyl)quinolin-4-yl)ethane.

Briefly, a mixture of 4-chloro-7-(trifluoromethyl)quinoline (1.0 g, 4.9 mmol) and diethylenetriamine (2.7 mL, 25 mmol) was heated at 80 °C for 1 h without stirring, following by heating at 135 °C for 3 h with stirring. The mixture was cooled to room temperature, alkalized with an aqueous solution of 10% NaOH (2 mL). After 24 h, a solid is formed that is recuperated by filtration, and washed with water (3x 10 mL). The solid is then dried under vacuum leading to a white solid (F.M.: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>; M.M.: 298.31 g/mol).

Yield: 1.17 g, 80%.

M.P.: 989 °C;

I.V. ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ): 3296 (Ar- NH); 3068 (CH quinoline ring); 2946 e 2831 (as/s CH e CH<sub>2</sub>); 1594 (C=N), 1571 e 1524 (C=C quinoline ring); 1438 (CH<sub>2</sub>); 1285 (Ar-C-N); 1123 (C-N); 824, 795 e 765 ( $\delta = \text{C-H}$  aromatic out of plane).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  2.73 (t,  $J = 5.18\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-16), 2.78 (t,  $J = 5.18\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-15), 2.96 (t,  $J = 6.41\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-13), 3.53 (t,  $J = 6.44\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-12), 6.79 (s, 1H, Ar-H C-3), 7.53 (t,  $J = 7.64\text{Hz}$ , 1H, Ar-H C-6), 7.74 (t,  $J = 7.64\text{Hz}$ , 1H, Ar-H C-7), 7.93 (d,  $J = 8.78\text{Hz}$ , 1H, Ar-H C-8), 8.16 (d,  $J = 8.78\text{Hz}$ , 1H, Ar-H C-5).

NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  156,7 (C-2), 97 (C-3), 152,3 (C-4), 129,9 (C-5), 132,4 (C-6), 151,1 (C-7), 134,1 (C-8), 151,8 (C-9), 122,8 (C-10), 124,8 (CF<sub>3</sub>), , 50,8 (C-12), 44,2 (C-13), 54,8 (C-15), 46,1 (C-16).

### 3.3 Writhing test by acetic acid

Nociception was induced by intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%, v/v) [16]. Acetic acid was administered i.p. in a volume of 0.1 mL/10 g body weight. The number of writhes, a response consisting of contraction of an abdominal wall, pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min beginning 5 min after the acetic acid injection. The 4-aminoquinolines derivatives (**BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ**) were administered at the dose of 100, 30, 3, 0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , 40 min before the acetic acid injection. These four doses were performed in order to calculate the ID<sub>50</sub>. The ID<sub>50</sub> was calculated by nonlinear regression. Control group received 10 mL/kg of vehicle (distilled water with 20  $\mu\text{L}$  of Tween 80) (i.p. route). The antinociceptive activity was expressed as the reduction on the number of abdominal writhing.

### 3.4 Formalin Test

The procedure used was essentially the same as that described previously [17]. Animals received 20  $\mu$ L of 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde in saline) in the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase) and the time that they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception. Animals received **BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** (100  $\mu$ mol/kg, i.p administration) and indomethacin (10  $\mu$ mol/kg, i.p administration) 40 min beforehand.

### 3.5 Zymosan-Induced Peritonitis

Peritoneal inflammation was induced according to the method described by [18]. Zymosan A (Sigma Aldrich) was freshly prepared (2 mg/mL) in sterile 0.9% w/v saline, and 500  $\mu$ L were injected i.p. After 4 hours, the animals were killed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 3.0 mL cold PBS, and after a gentle manual massage, the exudate was retrieved and its volume was measured. The number of recruit leukocytes to the peritoneum was counted in a Neubauer chamber and results were expressed as cells  $\times 10^6$ /mL. The 4-aminoquinolines derivatives **BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** were administered at the dose of 100  $\mu$ mol/kg (i.p.) and indomethacin (10  $\mu$ mol/kg, i.p.) were administered 30 min before the zymosan injection. In the negative control group, animals have just received the same dose of a vehicle 30 min before the saline injection by intraperitoneal route.

### 3.6 Induction of arthritis by complete Freund's adjuvant (CFA)

The arthritic syndrome was induced in rats (150–200 g) according to the method proposed by [19] with some modifications. Complete Freund's adjuvant (CFA) (0.2 mL) was

injected into the right paw of rats. After 13 days, animals with pronounced arthritis were separated randomly divided into groups of 6. Compounds **BAQ**, **7-Cl-MAQ**, **7-CF<sub>3</sub>-MAQ** and **2-CF<sub>3</sub>-MAQ** were administered at the dose of 100 µmol/kg (i.p., daily) from the 14th to the 21st day after immunization. Dexamethasone was administered at the dose 5 µmol/kg, (p.o. daily). The paw volumes were measured on the 1st, 14th, 15th, 16th, 17th, 18th, 19th, 20th and 21st days using a digital caliper (Mitutoyo). Mean paw volumes were obtained daily for treated groups and compared with paw volumes of the control arthritic group. At 21<sup>st</sup> day the animals were euthanized with were anesthetized with a solution ketamine/dyazepam (75 mg/kg and 5 mg/kg, i.p.), blood was collected by cardiac puncture for biochemical measurements Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Urea and Creatinin, methods kit Doles-Brazil. The paw arthritic was collected for histological analysis and the spleen was collected for weighed.

### 3.7 Biochemical measurements

The blood was collected for biochemical dosages realization urea, creatinine, AST and ALT. The serum was separated by centrifugation 1500 x g for 5 min and dosages were performed by kinetic method kit (Doles-Brazil).

The formula used to calculate the dose of ALT / AST is below:

$$\text{ALT UI/L} = \Delta A/\text{minute} \times 1746$$

$$\text{AST UI/L} = \Delta A/\text{minute} \times 1746$$

The quantity of urea was performed followed by the formulas below:

$$\text{Factor (F)} = \frac{80}{\text{Absorbance of the standard}}$$

$$\text{Urea (mg/dL)} = \text{Absorbance test} \times F$$

The formula used to calculate the amount of creatinine in the samples is as follows:

$$\text{Factor (F)} = \frac{5}{(\text{Absorbance initial} - \text{Absorbance final}) \text{ standart}}$$

$$\text{Creatinine (mg/dL)} = (\text{Abs ini} - \text{Abs fin}) \text{ sample} \times \text{F}$$

### 3.8 Effects on the stomach

After euthanasia, the stomachs were removed for macroscopic examination of the occurrence of lesions with daily treatment for 7 days with dexamethasone, **BAQ** and **7-CF<sub>3</sub>-MAQ**. The mucosal damage was examined by means of a magnifying glass. For each stomach, the mucosal damage was assessed according to the following scoring system [20]:

---

0.5 Redness
1.0 Spot ulcers
1.5 Hemorrhagic streaks
2.0 Ulcers <3, but ≤5
3.0 Ulcers >5

---

### 3.9 Weighing spleen

In order to evaluate a possible immunosuppression in Wistar rats because of the treatment, there was weighing the spleen of animals. After euthanasia proceeded with the removal and weighing. The spleen was washed with PBS and weighed on an analytical balance. Treated groups were compared to the arthritic group.

### 3.10 Statistical analysis

Data obtained from animal experiments are represented by mean ± standard error of the mean (mean ± S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups

were evaluated by test t of Student or ANOVA in the tutorial Prisma. Values were considered significant if  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ .

#### 4. References

1. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454: 428–35, 2008.
2. Nathan, C. Points of control in inflammation. **Nature**, 420: 846–52. 2002.
3. Allaart, C.F.; Huizinga, T.W.J. Treatment strategies in recente onset rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, 23: 241-244, 2011.
4. Doddaga, S.; Peddakonda, R. Chloroquine-N-oxide, a major oxidative degradation product of chloroquine: identification, synthesis and characterization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 81-82: 118-125, 2013.
5. Aguiar, A. C. C.; Santos, R. M.; Figueiredo, F. J. B.; Cortopassi, W. A.; Pimentel, A. S.; França, T. C. C.; Meneghetti, M. R.; Krettli, A. U. Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of Two Novel 4-Aminoquinolines against Chloroquine-Resistant Parasites. **Plos One**, 7: 37259, 2012.
6. Gorzalczany, S. L.; Acevedo, P.C.; Ferraro, G. Anti-inflammatory effect of Lithreamolleoides extracts and isolated active compounds. **Journal of Ethnopharmacology** 133, 994–998, 2011.
7. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.
8. Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G.W. Zymosan-induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 11, 544–547 1962.
9. Morris, C. J. Zymosan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, 225, 115–121, 2003.
10. Winder, C.V.; Lembke, L. A.; Stephens, M. D. Comparative bioassay of drugs in adjuvant-induced arthritis in rats: flufenamic acid, mefenamic acid, and Phenylbutazone. **Arthritis and Rheumatism**, 12, 472–482, 1969.
11. Walz, D. H.; Dimartimo, M. J.; Misher, A. Adjuvant induced arthritis in Rats II: drug effects of physiologic, biochemical and immunologic parameters. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 178, 223–231. 1971.

12. Prakken, B.J.; Roord, S.; Ronaghy, A.; Wauben, M.; Albani, S.; Van-Eden, W. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. **Seminars in Immunopathology**, 25: 47–63, 2003.
13. Shah, S.U.; Ashraf, N.; Soomro, Z. H; Shah, M. R; Kabir, N.; Simjee, S. U. The anti-arthritic and anti-oxidative effect of NBD (6-nitro-1,3-benzodioxane) in adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats. **Inflammation Research**, 2012.
14. Singh, S.; Majumdar, D.K. Effect of fixed oil of *Ocimum sanctum* against experimentally induced arthritis and joint edema in laboratory animals. **International Journal of Pharmacology**, 34: 218–22, 1996.
15. Raiss, R; Bartlett, R. Antiarthritic and immunomodulatory activity. In: Gerhard Vogel H (ed). **Drug discovery and evaluation: pharmacological Assays**. 2nd edn. New York: Springer, 775-820, 2002.
16. Coolier, H. O. J.; Dinnen, L. C.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, 32, 285 – 310, 1968.
17. Tjolsen, A.; Berge, O.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51, 5–17, 1992.
18. Doherty, N. X.; Poubelle, P.; Borgeat, P.; Beaver, T. H.; Westrich, G. L.; Schrader, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E<sub>2</sub>, **Prostaglandins**, 30: 769-789, 1985.
19. Newbould, B. B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterium adjuvant. **British Journal of Pharmacology**, 21, 127-136, 1963.
20. Cioli, V.; Putzolu, S.; Rossi, V.; Barcellona, P. S; Corradino, C. The Role of direct contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 50: 283-289, 1979.

## **5. DISCUSSÃO**

Neste trabalho foram sintetizadas e avaliadas em modelos funcionais de dor e inflamação *in vivo* duas séries de derivados com grupos químicos diferentes, mas propondo-se o mesmo objetivo: avaliar o perfil antinociceptivo e anti-inflamatório buscando novos protótipos de fármacos com melhor eficácia e redução dos efeitos indesejáveis.

A série 1 possui dois grupamentos químicos que são alvos de diversos estudos: a hidrazona e tiofeno. As hidrazonas fazem parte de um grupo de compostos muito estudado pelo LASSBio na Universidade Federal do Rio de Janeiro e por diversos grupos de pesquisa no mundo, em que é possível identificá-la como um dos principais farmacofóros responsável por atividades biológicas em relação à nocicepção e inflamação, tais como: inibição da enzima COX (Tributino, et al., 2009), antagonismo de receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) e inibição da enzima 5-LOX (Almasirad et al., 2005). O grupamento tiofeno já foi identificado como importante porção para atividade anti-inflamatória (Pillai, et al., 2005; Molvi et al., 2008; Mustaskim et al., 2008; Revannasiddaiah et al., 2014) . Diante disso, os nove derivados da série foram submetidos a um estudo teórico de toxicidade, ao ensaio de contorção abdominal induzido por ácido acético, ensaio de nocicepção induzida por formalina, ensaio de peritonite induzida por carragenina e ensaio da síndrome experimental da artrite induzida por adjuvante completo de Freund's.

Na primeira etapa foi realizado o estudo teórico de toxicidade *in silico* através do programa Osiris®. Ao analisar esses dados é possível observar que a maior parte dos derivados apresentou um perfil toxicológico teórico baixo, demonstrado nas variáveis estudadas (tumorigênese, mutagênese, efeitos irritativos e na reprodução), sugerindo que a substituição do anel C não modifica o perfil de toxicidade, exceto o derivado 5e que possui substituinte hidroxilado e esse parece influenciar no aumento da toxicidade teórica das variáveis referentes a efeitos irritantes e reprodutivos. Outros parâmetros avaliados foram o “druglikeness” e o “drug-score” e os dados obtidos revelaram que os derivados apresentaram

um índice de “druglikeness” inferior aos fármacos padrões utilizados nesse estudo. Pode-se observar ainda que o derivado 5d apresentou o índice para o “druglikeness” negativo, provavelmente pela presença do grupo nitro no anel C, no qual diversos estudos o apontam com um perfil toxicológico grande, no entanto também encontrado em fármacos utilizados na clínica, como antimicrobianos e o AINE seletivo COX-2 nimesulida (Bosquesi, et al., 2008). O índice de “druglikeness” sugere se um composto que apresenta grupos químicos semelhantes a fármacos existentes no mercado, no entanto esse parâmetro não deve ser avaliado isoladamente na tentativa de escolher o melhor protótipo e prosseguir com os estudos farmacológicos. Os valores do “drug-score” refletem a soma de todas as características dos derivados em relação ao “druglikeness”, solubilidade, peso molecular e cLogP. Segundo a avaliação do programa, pelos critérios estabelecidos, quanto mais próximo o índice de 1 maior será a probabilidade de um determinado composto se tornar um fármaco. Em relação aos resultados relacionados aos derivados hidrazônicos tiofeno os derivados 5a, 5e, 5h e 5i, apresentaram índices semelhantes ao fármaco padrão indometacina.

Essa etapa de avaliação teórica na fase pré-clínica inicial é muito importante, visto que é possível nesse primeiro momento traçar um perfil dos compostos e decidir o delineamento experimental do estudo, visando investimentos em estudos com os protótipos mais promissores, uma vez que uma das principais razões para o fracasso no desenvolvimento de fármacos é a toxicidade (Davis; Riley, 2004). Muitos órgãos reguladores como FDA e comunidade europeia, estão utilizando os dados da avaliação toxicológica *in silico* para confirmar resultados demonstrados pela Indústria Farmacêutica. É importante ressaltar que a toxicidade preditiva não garante que esses compostos são completamente isentos de efeitos tóxicos, sendo necessárias avaliações *in vivo*, dentre elas: estudos de citotoxicidade, dose letal 50% (DL<sub>50</sub>), toxicidade renal, gástrica, hepática e SNC. Contudo, ressalta o perfil promissor desses derivados para estudos experimentais mais aprofundados.

Após o ensaio teórico de toxicidade, realizou-se o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, um ensaio *in vivo*, bastante utilizado na farmacologia experimental em busca de substâncias com potencial antinociceptivo. Nesse ensaio, todos os derivados se mostraram ativos por via oral (v.o.), indicando que eles são absorvidos pelo trato gástrico intestinal. Vale destacar que a  $DI_{50}$  e efeito máximo ( $E_{max}$ ) dos derivados 5a, 5c, 5d e 5h foram semelhantes ao fármaco padrão dipirona demonstrando que eles possuem elevada eficácia e potência. Esses resultados mostram que o grupamento fenil contendo substituintes como bromo, nitro ou carboxila, parece favorecer a indução do efeito antinociceptivo no ensaio de contorção abdominal.

Neste modelo, a dor é gerada por mediadores endógenos como bradicinina, histamina, substância P e prostaglandinas que agem por estimulação de neurônios nociceptivos periféricos. Estas fibras são sensíveis a narcóticos, como morfina e AINES (Collier et al., 1968). A injeção intraperitoneal de ácido acético produz uma inflamação peritoneal (peritonite aguda), que causa a resposta caracterizada pela contração do músculo abdominal. Este modelo foi associado ao aumento de prostaglandinas no fluido peritoneal (Derardt et al., 1980). Contudo o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, um modelo de dor visceral, é um teste sensível e útil para o desenvolvimento de substâncias com efeito analgésico, porém não é seletivo para dor. Podem ocorrer resultados falso-positivos com sedativos, relaxantes musculares e outras atividades farmacológicas (Elisabetsky et al., 1995) e dessa forma são necessários a realização de outros ensaios confirmatórios. Diversos trabalhos no LASSBIO e em outros grupos de pesquisa mostram a porção hidrazona como um dos grupamentos responsáveis pela inibição de COX (Unsal et al., 2010) e inibição do TRPV1 (Tributino, et al., 2010). Assim, avaliando os resultados mostrados nesse ensaio, juntamente com dados da literatura, pode-se sugerir que os derivados podem influenciar nos níveis de prostaglandinas e ativação do TRPV1.

Para avaliar melhor o perfil antinociceptivo sugerido no ensaio de contorção abdominal, os derivados foram submetidos ao ensaio de nocicepção induzido por formalina. Ao realizar esse ensaio pode-se observar que todos derivados reduziram significativamente o tempo de lambida na fase neurogênica e fase inflamatória possuindo um perfil muito semelhante de atividade, com exceção do derivado 5b que na fase neurogênica não reduziu o tempo de lambida, sugerindo desses derivados um grande potencial nociceptivo.

Esse ensaio é constituído por duas fases: a primeira fase que é caracterizada por intensa dor neurogênica, imediatamente após a injeção e parece ser causada pela estimulação de fibras-C subsequente à estimulação periférica (estimulação direta de nociceptores). A segunda fase parece ser causada por mudanças teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e é acompanhada por liberação de mediadores inflamatórios. A segunda fase não pode ser interpretada como consequência da primeira fase. É também originária a partir de mecanismos periféricos e parece ser mediada a partir de neurônios sensitivos centrais devido à inflamação periférica e também tal como a ativação de neurônios primários aferentes (Tjolsen et al., 1992). Por esta razão o teste de formalina é usado para avaliar a potência analgésica de substâncias, e também elucidar os mecanismos de analgesia na primeira (neurogênica) e na segunda (inflamatória) fase (Hunskaar; Hole, 1987; Tjolsen et al., 1992). Os AINES como AAS, indometacina, nimesulida e naproxeno podem inibir as duas fases dependendo da dose utilizada. Foi bem documentado que vários mediadores inflamatórios tais como substância P e bradicinina participam da manifestação da resposta na primeira fase (Shibata et al., 1989), quando prostaglandinas (Hunskaar; Hole 1987; Shibata et al., 1989), serotonina, histamina e cininas estão envolvidas na resposta da segunda fase do teste de formalina (Tjolsen et al., 1992). Pode-se concluir com esses resultados que a troca no anel C por substituintes oxigenados, nitro, bromo, tiofeno e piridina, não influenciou na atividade antinociceptiva observado nas duas fases do modelo, sugerindo que esse efeito no ensaio de

formalina pode ocorrer independente da substituição, sendo essa porção provavelmente necessária para o acoplamento com seu biorreceptor.

Com o intuito de avaliar se os derivados induzem efeito anti-inflamatório, realizamos um modelo clássico de migração celular, a peritonite induzida por carragenina administrando-se diversas doses dos derivados e do fármaco padrão objetivando calcular a  $DI_{50}$  e o efeito máximo. Esta pode ser induzida por diversos agentes flogísticos dentre eles: carragenina, zymosan A e tioglicolato. Os resultados nesse modelo mostram que os derivados inibem a migração celular, destacando-se com acentuada potência e eficácia os derivados 5a e 5d, semelhantes ao fármaco padrão indometacina sugerindo que os substituintes aromáticos fenil e nitrofenil contribuem para esse efeito.

A carragenina é um nome genérico para uma família de polissacarídeos que são obtidos de algas da classe *Rhodophyceae*. O ensaio é bem caracterizado para estudos de inflamação aguda. O mecanismo de ação da carragenina envolve aumento de IL-1, TNF- $\alpha$ , LTB4 e PGs, que promovem a vasodilatação, exsudação de plasma, recrutamento celular, especialmente de neutrófilos (Foster et al., 1986). Assim pode-se sugerir que os derivados atuam modulando os níveis desses mediadores endógenos.

De posse dos resultados dos nocicepção e inflamação aguda, foi possível identificar os protótipos mais ativos e promissores e, portanto, submetê-los a um ensaio de inflamação crônica, o ensaio da síndrome experimental da artrite induzida por adjuvante completo de Freund's (CFA). É possível observar que o tratamento com os derivados 5a e 5d produziu efeitos semelhantes resultando em diminuição do diâmetro da pata com redução do edema a partir do 4º dia de tratamento. O fármaco padrão dexametasona foi também eficaz e reduziu o diâmetro da pata a partir do 3º dia de tratamento. Esses dados corroboram com os estudos realizados no nosso grupo publicado por Cupertino-Silva e colaboradores (2010), no qual outras hidrazonas também foram testadas no modelo de experimental induzida por CFA e

foram capazes de reduzir o diâmetro da pata e os sinais clínicos da inflamação. Em relação a avaliação toxicológica renal, hepática e gástrica não foram observados efeitos significativos com o tratamento por 7 dias com os derivados, grande vantagem exercida sobre os AINEs, em que dependendo da dose no 3º dia de tratamento esses efeitos já podem ser observados.

Um sinal muito importante no tratamento da artrite é a imunossupressão causada por diversos fármacos utilizados no tratamento da AR e os nossos resultados mostraram que o derivado 5d parece não gerar imunossupressão durante esse período de tratamento avaliado através da pesagem do baço. Em relação a estrutura química pode-se sugerir que para esse efeito anti-inflamatório crônico, a troca bioisostérica entre o fenil pelo grupamento nitrofenil não incrementou nessa atividade anti-inflamatória crônica, no entanto exerceu um efeito inibitório na geração da imunossupressão. Estudos de Lacerda e colaboradores (2014) sugerem que hidrazonas podem modular os níveis de TNF- $\alpha$  e, portanto esse ser o mecanismo responsável por essa atividade. Além disso, o grupamento tiofeno parece ser um farmacóforo importante para inibição da enzima MAPK p38 que modula os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Redman et al., 2001). Com os dados apresentados pode-se sugerir que os derivados hidrazonas tiofeno modulam a biossíntese ou liberação de mediadores importantes para a inflamação, no entanto outros estudos serão necessários para elucidação do seu mecanismo de ação, como dosagem de citocinas pró-inflamatórias em fluídos biológicos e/ou culturas de células e avaliação sobre a MAPK p38.

A série 2 faz parte das aminoquinolinas, grupamento extensivamente estudado para atividade antimalárica e anti-inflamatória. Os fármacos aminoquinolínicos utilizados na clínica como DMARD são: cloroquina e hidroxicloroquina, usadas para o tratamento de LES e AR e agem inibindo a biossíntese de IL-1 (Salmeron; Lipiski, 1983; Wollhcim; Hanson; Luurell, 1978), TNF- $\alpha$  (Picot, 1991) e metabólitos do ácido araquidônico por inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Matsuzawa; Hostetler, 1980) e mais recentemente foi detectado que

eles diminuem os níveis de imunocomplexos circulantes (Wallace, et al., 2012). Assim, os derivados da série aminoquinolinas foram submetidos ao ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, nocicepção induzida por formalina, peritonite induzida por zymosan A e síndrome experimental da artrite induzida por CFA.

No ensaio de contorção abdominal realizou-se a  $DI_{50}$ . Nesse ensaio os derivados foram administrados por via i.p., ativos por essa via e suas eficácias e potências foram similares ao fármaco padrão dipirona. Os derivados BAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ apresentaram a menores  $DI_{50}$  e efeitos acima de 95%. A substituição do átomo de Cl pelo CF<sub>3</sub> na posição 7 gerando o derivado 7-CF<sub>3</sub>-MAQ e inserção de outra porção quinolínica gerando o derivado BAQ aparentemente promoveu um incremento da atividade antinociceptiva em relação aos demais compostos. Esses dados sugerem que os novos derivados aminoquinolínicos possuem potencial antinociceptivo e podem modular os níveis de mediadores inflamatórios.

No intuito de confirmar o efeito antinociceptivo, realizamos o ensaio de formalina e os resultados mostraram que os derivados reduziram o tempo de lambida na fase neurogênica e fase inflamatória, confirmando o efeito antinociceptivo demonstrado no ensaio de contorção abdominal e sugerindo um efeito anti-inflamatório semelhante ao fármaco padrão indometacina. Não houve aparentemente aumento da atividade entre os derivados com diferentes substituintes.

Para confirmar o efeito anti-inflamatório sugerido pelo ensaio de formalina, realizou-se o ensaio de peritonite induzida por zymosan A. O zymosan A é um componente insolúvel de polissacarídeo da parede de célula do fermento *Sacharomyces cerevisiae*. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo o Zymosan A, induz o extravasamento de plasma e proteínas para a região peritoneal. Isto é um passo chave na formação inflamatória de exsudato e é seguido por um recrutamento tempo-dependente de células migratórias, especialmente neutrófilos. Há muitos mediadores que coordenam os eventos

iniciais da inflamação aguda, tais como aminas vasoativas, prostanoídes, leucotrienos, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, NO e citocinas. O edema gerado pelo zymosan A é resultante do extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por aminas vasoativas e eicosanóides. A vasodilatação é mediada primariamente pelo NO e prostanoídes vasodilatadores. Citocinas pró-inflamatórias também participam do recrutamento celular como, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ativam a via de sinalização em células endoteliais, a qual regula a expressão de moléculas de adesão para iniciar o recrutamento de leucócitos circulantes e células migratórias parcialmente ativadas (Leite et al., 2007). Vários fármacos podem reduzir a migração celular no ensaio de zymosan, dentre eles: os glicocorticóides, antagonistas de leucotrienos (Griffiths et al., 1991) e AINES (Rao, et al, 1994). De acordo com os resultados pode-se confirmar o perfil anti-inflamatório dos derivados BAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ, em que a inserção de uma quinolínica e substituição do Cl pelo CF<sub>3</sub> foram importantes para o efeito anti-inflamatório nesse modelo. Esse efeito pode ocorrer pela diminuição da produção e biossíntese de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  atribuída ao grupamento aminoquinolínico (Salmeron; Lipiski, 1983; Wollhchim; Hanson; Luurell, 1978), TNF- $\alpha$  (Picot, 1991). Apesar disso, a possibilidade de ação em outros alvos não deverá ser descartada.

Esses 3 ensaios foram realizados com o intuito de triar os derivados que tivessem melhor perfil antinociceptivo e anti-inflamatório agudo, deste modo identificou-se os compostos mais ativos para realizar o ensaio de inflamação crônica induzida por CFA. Nesse ensaio os derivados BAQ e 7-CF<sub>3</sub>-MAQ reduziram o diâmetro da pata a partir do 4º dia de tratamento sugerindo a modulação da inflamação crônica que pode ser mediada por inibição de mediadores do ácido araquidônico, TNF ou IL-1 $\beta$ . O sangue dos animais foi coletado para a realização de dosagens bioquímicas a fim de avaliar função hepática e renal. Como resultados pode-se observar que os derivados não alteram os níveis de enzimas hepáticas,

sugerindo não promoverem hepatotoxicidade nas condições testadas. Quanto a avaliação da função renal o derivado BAQ aumentou os níveis de creatinina no soro dos animais, indicando um potencial nefrotóxico que não foi observado no composto 7-CF<sub>3</sub>-MAQ. O tratamento com derivados não gerou toxicidade macroscópica durante o tratamento por 7 dias, fato que normalmente é observado no tratamento com cloroquina. Baseando-se nos dados dos 4 experimentos *in vivo* realizados, pode-se afirmar que os derivados aminoquinolínicos possuem efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, no entanto estudos necessitam ser realizados buscando os seus mecanismos de ação.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Baseado nos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que as duas séries testadas 3-amino-2-acilidrazonas-tiofeno, 4-aminoquinolínicos induzem efeito antinociceptivo e anti-inflamatório agudo e crônico.

Os derivados da série hidrazonas tiofeno foram capazes de reduzir a nocicepção com elevada potência e eficácia no modelo de contorção abdominal, reduzir o tempo de lambida no ensaio de formalina e reduzir a migração celular. Após a realização desses experimentos foi possível identificar os protótipos mais ativos: 5a e 5d que foram submetidos ao ensaio de síndrome de artrite por CFA. Quanto aos efeitos no ensaio de inflamação crônica, os derivados 5a e 5d foram capazes de reduzir o diâmetro da pata no 4º dia de tratamento, sem causar nefro, hepato e gastrotoxicidade.

Os derivados da série das aminoquinolinas como evidenciado nos modelos utilizados foram também capazes de modular o efeito nociceptivo e anti-inflamatório agudo e crônico, destacando-se o derivado 7-CF3-MAQ, no qual não gerou efeitos tóxicos nos parâmetros analisados.

Os resultados deste trabalho dão suporte a pesquisa com substâncias de origem sintética na busca por novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Novos estudos são necessários para elucidação dos mecanismos de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos derivados hidrazonas-tiofeno e aminoquinolínicos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertini, R.; Aimbire, F.S.C.; Correa, F.I.; Ribeiro, W.; Cogo, J.C.; Antunes, E.; Teixeira, A.S.; De Nucci, G.; Castro-Faria-Neto, H.C., Zângaro, R.A.; Lopes-Martins, R.A.B. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum- arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 74: 101- 107, 2004.

Almasirad, A.; Tajik, M.; Bakhtiari, D. Synthesis and analgesic activity of N-arylhydrazone derivatives of mefenamic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 8: 419–425, 2005.

Ayoub, S.S.; Botting, R.M.; Goorha, S.; Colville-Nash, P.R.; Willoughby, D.A.; Ballou, L.R. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 101, 11165-11169, 2004.

Badger, A.M.; Bradbeer, J.N.; Votta, B.; Lee, J.C.; Adams, J.L.; Griswold, D.E. Pharmacological profile of SB203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 279: 1453–1461, 1996.

Badger, A.M.; Cook, M.N.; Lark, M.W.; Newman-Tarr, T.M.; Swift, B.A.; Nelson, A.H.; Barone, F.C.; Kumar, S. SB203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. **Journal of Immunology**, 161: 467–473, 1998.

Bavaresco, L.; Bernardi, A.; Battastini, A.M.O. Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, 17: p. 58-60, 2005.

Besson, J.M.; Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiology Review**. 67: 67-186, 1987.

Bingham, B.; Ajit, S. K.; Blake, D. R.; Samad, T. A. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Reviews Rheumatology**, 5: 28-37, 2009.

Bosquesi, P.L.; Almeida, A.E.; Blau, L.; Menegon, R.F.; Santos, J.L.; Chung, M.C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos, **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, 29: 231-238, 2008.

Botting, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, 31: 208-219, 2006.

Boura, A.L.; Svolmanis, A.P. Converting enzyme inhibition in the rat by captopril is accompanied by potentiation of carrageenin-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology** 82: 3-8, 1984.

Carr, D.B.; Goudas, L.C. Acute pain. **Lancet**, 353: 2051 -2058, 1999.

Cervero, F. Mechanisms of visceral pain – An updated review. **IASP**. Press, Seattle, 2002.

Chandrasekharan, N.V.; Dai, H.; Roos, K.L.; Evanson, N.K.; Tomsik, J.; Elton, T.S.; Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 99:13926-31, 2002.

Cobb, M. H. MAP kinase pathways. **Progress and Biophysics and Molecular Biology**, 71, 479–500, 1999.

Coolier, H. O. J.; Dinnen, L. C.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, 32, 285-310, 1968.

Cupertino-Silva, Y.K.; Augusto, C.V.; Barbosa, M. L. C.; Melo, G. M. A.; Queiroz, A.C.; Dias, T. L. M. F.; Junior, W. B.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Alexandre-Moreira, M. S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 18: 5007-5015, 2010.

Davis, A.M.; Riley, R.J. Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities. **Current Opinion in Chemical Biology**, 8: 378–386. 2004.

Derardt, R.; Jougney, S.; Benzoni, J.; Peterfalvi, M. Release of prostaglandins e and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, 61, 17–24, 1980.

Djoughri, L.; Lawson, S. N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to the other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research Review**, 46: 131-145, 2004.

Dray, A; Perkins, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 54: 469-87, 2003.

Dubin, A.E.; Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. Review series. **The Journal of Clinical Investigation**, 120: 3760-3772, 2010.

Edwards, J.W.C.; Sedgewick, A.D.; Willoughby, D.A. The formation of a structure with features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue cultures system. **Journal of Pathology**, 134: 147-153, 1981.

Elisabetsky, E.; Amador, T.A.; Albuquerque, R.R.; Nunes, D.S.; Carvalho, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild ex R. & S.) Muell Arg. alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 48: 77–83, 1995.

Esposito, E.; Cuzzocrea, S. TNF-Alpha as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases, Ischemia-Reperfusion Injury and Trauma. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3152-3167, 2009.

Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review Immunology**, 14: 397-440, 1996.

Fernandes, C. M. **Estudos da inflamação e da dor articulares em ratos e dos mecanismos de produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos isolados, induzidos pela BaP1, uma metaloproteinase isolada do veneno de serpente Bothrops asper**. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

Ferreira, S.H.; Moncada, S.; Vane, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **British Journal of Pharmacology**, 49, 86–97, 1973.

FitzGerald, G. A. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2: 879-890, 2003.

Foster, S.J.; McCormick, M.E.; Howarth, A.; Aked, D. Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by leukotriene B4. **Biochemical Pharmacology**, 35, 1709–1717, 1986.

Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, 294: 1871–1875, 2001.

Gallucci, R.M.; Simeonova, P.P.; Matheson, J.M.; Kommineni, C.; Guriel, J.L, Sugawara, T.; Luster, M.I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **FASEB Journal**, 14: 2525-2531, 2000.

Griffiths, R. J.; Li, S. W.; Wood, B. E.; Blackham, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. **Agents and Actions**, 32: 312-320, 1991.

Grosser, T.; Fries, S.; Fitzgerald, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **Journal of Clinical Investigation**, 116: 4-15, 2006.

Gureje, O.; Von-Korff, M.; Simon, G.E; Gater, R. Persistent pain and well-being: a World Health Organization in premium care. **JAMA**, 280: 147-151, 1998.

Guzik, T. J; Korbut, R.; Adamek-Guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 54: 469-87, 2003.

Hawkey, C. J.; Jackson, L.; Harper, S. E.; Simon, T. J.; Mortensen, E.; Lines, C. R. Review article: the gastrointestinal safety profile of rofecoxib, a highly selective inhibitor of cyclooxygenase-2 in humans. **Aliment Pharmacology and Therapy**, 15: 1-9, 2001.

Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.

Iadarola, M.J.; Claude, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, 278: 239-240, 1997.

Julius, D.; Basbaum A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413: 203–210, 2001.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. In: Robbins e Cotran, **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7ª ed. São Paulo: Elsevier; 2005.

Kummer, C.L.; Coelho, T.C.R.B. Anti-inflamatórios Não-Esteroides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 52: 498-512, 2002.

Lacerda, R. B.; Sales, N. M.; Da Silva, L. L.; Tesch, R.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fernandes, P. D.; Fraga, C. A. M. Novel Potent Imidazo[1,2-a]pyridine-N-Glyciny-Hydrazone Inhibitors of TNF- $\alpha$  Production: In Vitro and In Vivo Studies. **Plos One**, 9, p. e91660, 2014.

Legler, D.F.; Bruckne, M.; Uetz-von, A. E.; Krause, P. Prostaglandin E<sub>2</sub> at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. **International Journal of Biochemical and Cell Biology**, 42: 198 –201, 2010.

Lapa, A. J. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Gráfica Metropole, 2003.

Lawrence, T.; Willoughby, D.A.; Gilroy, D.W. Anti-Inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 2: 787-795, 2002.

Leite, D. F. P.; Echevarria-Lima, J.; Ferreira, S. C.; Calixto, J. B.; Rumjanek, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leucocyte Biology**, 82: 630-637, 2007.

Loeser, J.D.; Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353: 1607-1609, 1999.

Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137: 473-7, 2008.

Maggi, C.A. **Pharmacology of the efferent function of primary sensory neurons**. In: GEPPETI, P.; HOLZER, P. (eds) Neuro. Inflammation. London: CRC Press, 1996.

Matsuzawa, Y.; Hostetler, K. Y. Studies on drug-induced lipidosis: Subcellular localization of phospholipid and cholesterol in the liver of rats treated with chloroquine or 4,4'-bis(2-diethylaminoethoxy) (1,1'-bis(2-diethylaminoethoxy)ethane). **Journal Lipid Research**, 21: 202, 1980.

McAdam, B.F.; Mardini, I.A.; Habib, A.; Burke, A.; Lawson, J.A.; Kapoor, S.; FitzGerald G.A. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. **Journal of Clinical Investigation**; 105:1473-1482, 2000.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454: 428-35, 2008.

Molvi, K. I.; Sudarsanam, V.; Patel, M.; Haque, M. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel tetrasubstituted thiophene analogues as anti-inflammatory agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 6: 819: 828, 2008.

Moore, K.W.; De Waal-Malefyt, R; Coffman, R. L. O.; Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, 19: 683-765, 2001.

Muralidharan, A.; Smith, M.T. Pain, analgesia and genetics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 63: 1387-1400, 2011.

Mustaskim, M.; Vasudevan, S.; Madhubhai, M. P.; Andrabi, S. M. A.; Haque, N. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of some tetrasubstituted thiophenes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23: 829-838, 2008.

Nathan, C. Points of control in inflammation. **Nature**, 420: 846-885, 2002.

Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, 6: 173–182, 2006.

Neto, M.S. Avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética do extrato hidroalcoólico bruto de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Católica de Goiás, 2009.

Oliveira, E.R. A dor e controle do sofrimento. **Revista de Psicofisiologia**, 1: 2. 1997.

Ong, C.K.S.; Lirk, P.; Tan, C.H.; Seymour, R.A. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Clinical Medical & Research**, 5: p. 19-34, 2007.

Picot, S. Chloroquine inhibits tumor necrosis factor production by human macrophages in vitro. **Journal of Infection Disease**, 164: 830-831, 1991.

Pillai, A. D.; Rathod, P.D.; Xavier, F.P.; Padh, H.; Sudarsanam, V.; Vasu, K. Tetra substituted thiophenes as anti-inflammatory agents: Exploitation of analogue-based drug design. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13: 6685–6692, 2005.

Ramadabran, K.; Bansinath, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmacology Research**, 3: 263-269, 1996.

Rang, H.P.; Dale, M.M; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. **Farmacologia**, 7<sup>a</sup> ed. Rio de Elsevier, 2012.

Rankin, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, 7, 41-53, 2008.

Rao, T. S.; Currie, J.L.; Shaffer, A.F.; Isakson, P.C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 269: 917- 925, 1994.

Ready, L.B.; Edwards, W.T. In: **Management of Acute Pain: a Practical Guide. Taskforce on Acute Pain**. IASP Publications, 1992.

Redman, A. M.; Johnson, J. S.; Dally, Robert.; Swartz, S., Wild, Hanno p38 Kinase Inhibitors for the Treatment of Arthritis and Osteoporosis: Thienyl, Furyl, and Pyrrolyl Ureas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 11: 9-12, 2001.

Revannasiddaiah, N.; Gondi, S. Kumar.; Muruganathan, G.; Ankaiah, R. S.; Pyati, M. Pharmacological evaluation of 2-chloro substituted thiophene compound for antiinflammatory activity in rats. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, 2: 01-05, 2014.

Ricciotti, E; FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, 31, 986-1000, 2012.

Roy, M.; Piché, M.; Chen, J.; Peretz, I.; Rainville, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106: 1-6, 2009.

Salmeron, G.; Lipsky, P. E. Immunosuppressive potential of antimalarials. **American Journal of Medicine**, 75:19-24, 1983.

Sato, M.; Sawamura, D.; Ina, S.; Yaguchi, T.; Hanada, K.; Hashimoto, I. In vivo introduction of interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Archive Dermatology Research**, 291:400-404, 1999.

Schafers, M.; Sorkin, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neuroscience Letters**, 437, 188–193, 2008.

Schimmer, B.P.; Parker, K.L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteroides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Ed. McGraw-Hill, cap. 60, 2007.

Scott, D.L; Wolfe, F.; Huizinga, T.W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, 376: 1094–1108. 2010.

Serhan, C.N.; Hong, S.; Gronert, K.; Colgan, Sp.; Devchand, Pr.; Miricki, G; Moussignac, R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. **Journal of Experimental Medicine**, 196:1025-37, 2002.

Singh, J. A.; Cameron, D. R. Summary of AHRQ's Comparative Effectiveness Review of Drug Therapy for Rheumatoid Arthritis (RA) in Adults – An Update. **Journal of managed care Pharmacy**, 18: 4-20, 2012.

Soehnlein, O.; Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 10, 427-439, 2010.

Tedgui, A.; Mallat, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, 11: 877-887, 2001.

Tjolsen, A.; Berge, O.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51, 5–17, 1992.

Thurmond, R. L.; Gelfand, E. W.; Dunford, P. J. The role of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Trends Neuroscience**, 16: 99-104. 1993.

Toby, L.; Willoughby, D. A.; Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, 2, 787-792, 2002.

Tracey, D.J.; Walker, J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflammation Research**, 44: 407-411, 1995.

Tracey, I.; Dickenson, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, 148: 1308-1308e2, 2012.

Tributino, J. M. L. et al. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1125-1131, 2009.

Tributino, J. L.; Santos, M. L.; Mesquita, C. M.; Lima, C. K.; Silva, L. L.; Maia, R. C.; Duarte, C.D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A.; Castro, N. G.; Miranda, A. L.; Guimaraes, M. Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **British Journal of Pharmacology**, 159:1716-23, 2010.

Unsal-Tan, O.; Ozden, K.; Rauk, A.; Balkan, A. Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activities of some N-acylhydrazone derivatives of isoxazolo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45: 2345-52, 2010.

Vane, J.R.; Bakhle, Y.S.; Botting, R.M. COX-2 inhibitors: background knowledge for clinical use. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 38, 97–120, 1998.

Vergnolle, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, 20: 73–80, 2008.

Wallace, D.J.; Gudsoorkar, V.S.; Weisman, M.H.; Venuturupalli, S.R. New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, 8: 522-533, 2012.

Whelan, C.J. Will non-steroid approaches to the treatment of inflammation replace our need for glucocorticoids? **Current Opinion in Investigational Drugs**, 4: 536-543, 2003.

Wollhcim, F. A, Hanson, A.; Luurell, C. Chloroquine treatment in rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, 7:171-176,1978.

Woolf, C.J.; Ma, Q. Nociceptors–noxious stimulus detectors. **Neuron**, 55: 353–64. 2007.

## **8. ANEXOS**

## **7.1 Anexo A- Folha de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**PROJETO Nº 014/2013**

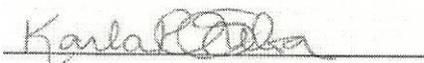
**TÍTULO:** Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos derivados 3-amino-2-acilidrazonas-tiofeno

**RESPONSÁVEL:** Magna Suzana Alexandre Moreira

**OBJETIVO:** Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de uma série de compostos planejados e sintetizados no LASSBio (Faculdade de Farmácia, UFRJ)

**SITUAÇÃO:** Aprovado

Maceió, 22 de janeiro de 2014.



Profª Karla Patrícia Chaves da Silva  
Coordenadora do CEUA, em exercício

## **7.2 Anexo B- Artigos publicados durante o período de Doutoramento**