



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

**YOLANDA KARLA CUPERTINO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E  
ANTIINFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS  
N-ACILIDRAZÔNICOS (NAH) PIRAZÍNICOS**

**MACEIÓ - AL**

**2009**



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

**YOLANDA KARLA CUPERTINO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E  
ANTIINFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS  
N-ACILIDRAZÔNICOS (NAH) PIRAZÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre em Ciências da Saúde

**ORIENTADORA: Dra. MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA  
CO-ORIENTADORA: Dra. LÍDIA MOREIRA LIMA**

**MACEIÓ - AL**

**2009**

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586a Silva, Yolanda Karla Cupertino da.  
Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de novos derivados  
N-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos / Yolanda Karla Cupertino da Silva, 2009.  
xvii, 81 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Co-Orientadora: Lídia Moreira Lima.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal  
de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 65-81.

1. Atividade antinociceptiva. 2. Atividade antiinflamatória. 3. N-acilidrazônicos  
(NAH) pirazínicos. I. Título.

CDU: 615.1



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

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Yolanda Karla Cupertino da Silva, intitulado: "Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de novos derivados n-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos", orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 25 de março de 2009.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata aprovada

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (ICBS/UFAL)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Éurica Adélia Nogueira Ribeiro - titular (ESENFAR/UFAL)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior - titular (ESENFAR/UFAL)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Akemi Kanashiro – titular (UNCISAL)

*Dedico este trabalho,  
aos meus amores, Bellynha,  
Léo e Mamis.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por ter permitido que eu realizasse mais um sonho em minha vida;*

*À minha mãe Maria Deusa por toda a dedicação e amor inigualável sempre;*

*A meu pai José Ferreira que mesmo sem ter momentos de convivência, tenho certeza de que estava a me amar e a orar por mim todas as horas;*

*Ao meu noivo Leandro Nunes que me ama com todas as suas forças;*

*À minha afilhada e bebezinha da Bradrinha, Bellynha por todo amor a mim dedicado;*

*À professora Magna Suzana por tudo que fizera por mim todo esse tempo, pela sua dedicação ao meu crescimento científico, pelo apoio sempre em todos os momentos, por sua amizade;*

*Á toda equipe do LASSBio®, especialmente à minha co-orientadora Professora Lídia Moreira, Professor Eliezer Barreiro, e Cristina Villarinho;*

*À minha família que sempre acreditara e me apoiara em todas as etapas da minha vida, em especial minhas tias: Maria Yolanda, Maria Eliete, Josefa Neuza, Maria Élide, Josefa Dalva, Rejane Maria, aos meus tios João Cupertino e Moisés Cupertino, e em in memoriam José Erisberto, Josefa Nalva e José Cupertino Filho que mesmo distantes se encontram perto de mim, em meu coração, na minha memória;.*

*Aos meus avós in memoriam: Maria Cecília, José Cupertino, Pertunílio Ferreira e Eudócia  
Maria que sem eles nada disso teria sido possível;*

*A todos os primos e em especial Márcio Costa 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;*

*À minha cunhada Lívia por todo o apoio sempre;*

*À minha amiga querida Eliane Campesatto que em pouco tempo tornou-se tão fundamental;*

*Aos meus queridos amigos da turma de mestrado: Acácia, Adalberto, Anderson, Ângela,  
Aryanna, Benísio, Charles, Círia, Daniela, Juliane, Luciano, Paula e Socorro por todo o  
tempo que ficamos juntos e pela amizade que floresceu em cada um de nós;*

*Aos meus queridos e inesquecíveis amigos da turma de Farmácia UFAL-2006. Ah como foi  
bom aquele tempo;*

*Aos meus amigos do LaFI muito amados por mim: Aline Cavalcanti, Anne Priscila, Carolina  
da Matta, Luiz Agra, Mariana Santos, Walfrido Bispo, por tudo que nos fizeram unir. A  
presença de vocês no LaFI é essencial;*

*Aos meus amados amigos desde os tempos de faculdade: Anansa Aquino, Diogo Costa, Éverton Tenório, Gabriela Muniz, Thays de Lima, por tudo que nós já vivemos e o que nós iremos viver com certeza. Amo muito vocês;*

*Ao Tommy, Heid (in memorian), Shakira, Bethovinho e Negão por todos os momentos felizes que me proporcionaram;*

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

*A CAPES, FAPEAL e Instituto do Milênio pelo apoio financeiro;*

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

*“É melhor tentar e falhar,  
que se preocupar e ver a vida passar; é  
melhor tentar, ainda que em vão, que se  
sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro  
na chuva caminhar, que em dias tristes em  
casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora  
louco, que em conformidade viver ...”*

**Martin Luther King**

## RESUMO

Uma nova série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos foi racionalmente planejada aplicando-se a estratégia de simplificação molecular sobre a unidade quinoxalínica do protótipo LASSBio-1018, identificado como potente antiinflamatório e analgésico no LASSBio® desenhado por aplicação do bioisosterismo de anéis sobre o protótipo LASSBio-319. A nova série de 21 derivados foi sintetizada e submetida a experiências para determinação de atividade antinociceptiva e antiinflamatória. Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, de ambos os sexos (20 a 35 g) e ratos Wistar de ambos os sexos (100-220 g). As substâncias foram administradas por v.o (100 µmol/kg), com exceção da morfina que foi administrada por via i.p. (15 µmol/kg). O celecoxib, indometacina, morfina e talidomida foram utilizados como padrões de referência. Para avaliação antinociceptiva foram realizados os ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, nocicepção induzida por formalina e modelo de placa quente. A ação antiinflamatória foi investigada pelo método de edema de orelha induzido por capsaicina, pelo ensaio de peritonite induzida por Zymosan A e pelo método de indução da síndrome de artrite experimental. No ensaio de contorção abdominal, todos os compostos inibiram as contorções de forma significativa, destacando-se os protótipos LASSBio-1181 e LASSBio-1188 com inibição de 97% e 86% ( $p < 0,001$ ), respectivamente. No ensaio de formalina o LASSBio-1186 foi capaz de modular significativamente a resposta antinociceptiva na fase neurogênica (80,79%). Na fase inflamatória treze protótipos inibiram a resposta sendo o LASSBio-1181 (86,05%) e LASSBio-1256 (86,50%) os mais ativos. No ensaio de edema de orelha seis protótipos apresentaram inibição estatisticamente significativa, destacando-se o LASSBio-1181 (69%) e LASSBio-1182 (63%) entre os mais ativos. No ensaio de peritonite o LASSBio-1180 induziu inibição de 56,95% da resposta. No ensaio de indução de artrite o LASSBio-1181 e a talidomida foram capazes de diminuir o edema da pata em vários dias do tratamento. No ensaio de placa quente nenhum dos protótipos foi ativo. Diante destes dados pode-se concluir que os protótipos foram capazes de modular a resposta antinociceptiva nos dois modelos de nocicepção (contorção e formalina), demonstrando um grande potencial antinociceptivo e que possivelmente não envolve componentes centrais, haja vista, todos os derivados não apresentaram inibição no ensaio de placa quente. A segunda fase do modelo de formalina permitiu identificar vários protótipos com ação antiinflamatória, que pode ser confirmada pelo ensaio de edema de orelha. Esses resultados permitem inferir que os protótipos são capazes de modular a resposta antinociceptiva periférica e resposta antiinflamatória.

**Palavras-chave:** Atividade Antinociceptiva, Atividade Antiinflamatória, *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos.

## ABSTRACT

A new series of derivatives *N*-acihidrazone (NAH) pirazinic was rationally planned be applied the strategy of simplification molecular on the unit quinoxalinic of prototype LASSBio-1018, identified as a potent anti-inflammatory and analgesic in LASSBio® designed by application the biososterism of rings on LASSBio-319. The new series of 21 derivatives were synthesized and subjected to experiments to determine the antinociceptive and anti-inflammatory activity. Were used mice of swiss line, of both sexes (20 to 35 g) and rats Wistar of both sexes (100-220 g). The substances were administered by p.o. (100 µmol/kg), except morphine which was administered pathway i.p. (15 µmol/kg). The indomethacin, celecoxib, thalidomide and morphine were used as standart drugs. For evaluation antinociceptive were performed the constriction abdominal assay, hyperalgesia induced-formalin and hot plate test. The anti-inflammatory action were investigated by the assay capsaicin-induced ear edema, peritonitis zymosan A-induced and assay of induction of syndrome arthritis experimental. On the constriction abdominal assay all compounds inhibited the constriction significantly standing out the prototypes LASSBio-1181 e LASSBio-1188 (97% and 86%) ( $p < 0,01$ ), respectively. On the formalin assay the LASSBio-1186 was able to significantly modulate the antinociceptive response in the neurogenic phase (average latency of 12 s). In first phase thirteen prototypes inhibited the inflammatory response and the LASSBio-1181 LASSBio-1256 and the most active time. On the Capsaicin-induced ear edema of six prototypes showed statistically significant inhibition, highlighting the LASSBio-1181 (69%) and LASSBio-1182 (63%) among the most active. On the assay of zymosan A-induced peritonitis of the LASSBio-1180 inhibition of 56.95% of the response. On the assay of arthritis the LASSBio-1181 and thalidomide were capable reduce of swelling in the paw several days of treatment. On the hot plate test of any of the prototypes was active. Considering these data we can conclude that the prototypes were able to modulate the antinociceptive response in both models of nociception (formalin and constriction abdominal), demonstrating a great potential antinociceptive and that may not involve core components, is seen, all the derivatives present no inhibition in hot plate test. The second phase of the formalin model were identified several prototypes with anti-inflammatory action that can be confirmed by testing of ear edema. These results infer that the prototypes are capable of modulating the response peripheral antinociceptive and anti-inflammatory.

**Key words:** Activity Antinociceptive, Activity Anti-inflammatory, *N*-acihidrazone pirazinic.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico.....	9
<b>Figura 2-</b> Relação bioisostérica clássica (fenila x tiofenila) entre Piroxicam e Tenoxicam.....	33
<b>Figura 3-</b> Relação bioisostérica clássica (pirazol x pirazolo-pirimidina e NH <sub>2</sub> x CH <sub>3</sub> ) entre Celecoxibe e seu análogo Pirazolo [1,5-a] pirimidina.....	33
<b>Figura 4-</b> Gênese do desenho molecular da nova série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, a partir de modificações na estrutura do protótipo LASSBio-1018.....	37
<b>Figura 5-</b> Efeito da série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg em ensaio de nocicepção induzido por ácido acético.....	48
<b>Figura 6A-</b> Efeito da série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg em ensaio de nocicepção induzido por formalina (1ª fase).....	50
<b>Figura 6B-</b> Efeito da série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg em ensaio de nocicepção induzido por formalina (2ª fase).....	50
<b>Figura 7 -</b> Efeito da série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxib e da indometacina, administrados por via oral, na dose de 100 µmol/kg em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.....	52
<b>Figura 8 -</b> Efeito da série de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100 µmol/kg em ensaio peritonite induzida por zymosan A.....	54

<b>Figura 9-</b> Pata do animal normal e animal artrítico após 14 dias de indução da síndrome.....	55
<b>Figura 10-</b> Efeito do LASSBio-1181 e da talidomida administrados por via oral no ensaio de indução de síndrome de artrite experimental administrados na dose de 100 µmol/kg, por via oral.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Efeito da série <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, talidomida, celecoxibe e do protótipo LASSBio-1018 na dose de 100 µmol/Kg administrados por via oral, no ensaio no ensaio de quente.....	57
--	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Estrutura química de fármacos de origem sintética.....	29
<b>Quadro 2-</b> Estrutura de protótipos obtidos simplificação molecular.....	35
<b>Quadro 3-</b> Estrutura dos compostos da série dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos desenhados e sintetizados e alvo dos estudos farmacológicos realizados em âmbito da presente dissertação.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5-LO</b>	5-Lipoxigenase
<b>AAS</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>ACF</b>	Adjuvante completo de Freund's
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>AINES</b>	Antiinflamatórios não-esteroidais
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>AP-1</b>	Proteína ativadora-1
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio bivalente
<b>rCB</b>	Receptor canabinóide
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>EDRF</b>	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
<b>ERG</b>	Elemento de resposta de glicocorticóide
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>HAc</b>	Ácido acético
<b>IgE</b>	Imunglobulina E
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$

<b>iNOS</b>	Óxido nítrico-sintase induzível
<b>LASSBio</b>	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LX</b>	Lipoxina
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatraente para macrófagos
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear de transcrição kappa B
<b>NGF</b>	Fator de Crescimento do Nervo
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PAF</b>	Fator ativador de plaquetas
<b>PG</b>	Prostaglandina
<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>PKC</b>	Proteína Kinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>RG</b>	Receptor de glicocorticóide
<b>SP</b>	Substância P
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral α
<b>TVRP1</b>	Receptor vanilóide 1
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>μ</b>	Mu

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>viii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de quadros.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1- Resposta inflamatória.....	2
1.1.1-Aspectos gerais da resposta inflamatória.....	2
1.1.2-Mediadores envolvidos na inflamação.....	5
1.2-Dor.....	13
1.2.1-Generalidades da dor.....	13
1.2.2-Tipos de dor.....	13
1.2.3-Transdução da informação nociceptiva.....	15
1.2.4-Transmissão da informação nociceptiva.....	16
1.2.5-Modulação da informação nociceptiva.....	16
1.2.6-Mediadores da algesia.....	17
1.2.7-Vias neuronais envolvidas na percepção da dor.....	19
1.3-Terapia farmacológica da dor e inflamação.....	21
1.4-Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos sintéticos.....	28
<b>2-Planejamento estrutural.....</b>	<b>30</b>
2.1- O bioisosterismo como estratégia de planejamento, desenho e modificação molecular de protótipos de fármacos.....	31
2.2- A simplificação molecular.....	34
2.3- Planejamento dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos (NAH) pirazínicos.....	36
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
3.1-Objetivo geral.....	40
3.2-Objetivos específicos.....	40

<b>4-Metodologia.....</b>	<b>41</b>
4.1-Animais.....	42
4.2-Substâncias.....	42
4.3- Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	43
4.4-Ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	43
4.5- Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina.....	43
4.6- Ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.....	44
4.7-Ensaio de indução da síndrome de artrite experimental com adjuvante completo Freund's.....	44
4.8- Ensaio de Placa Quente.....	44
4.9-Análise Estatística.....	45
<b>5-Resultados e Discussão .....</b>	<b>46</b>
<b>6-Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>7-Perspectivas.....</b>	<b>63</b>
<b>8-Referências Bibliográficas.....</b>	<b>65</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Resposta Inflamatória**

### **1.1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória**

A reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico em resposta à invasão por um agente infeccioso ou apenas uma reação a uma lesão de natureza variada (térmica, química e/ou mecânica), sendo representada por um conjunto de reações locais e sistêmicas do organismo. Este mecanismo é composto por vários fenômenos que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata, que envolve uma complexa interação de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos) e das células vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa) (TEDGUI & MALLAT, 2001). A resposta inflamatória visa destruir ou neutralizar o agente agressivo, sendo, portanto uma reação de defesa e reparação do dano tecidual (CHANDRASSOMA & TAYLOR, 1993).

A inflamação é caracterizada, em sua forma aguda, pelos sinais cardinais de dor, calor, rubor, edema e perda de função, envolvendo uma série de eventos como: aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, exsudação de fluídos, migração de leucócitos, liberação de agentes algésicos e dos efeitos induzidos pelos mediadores químicos no foco inflamatório (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005).

A inflamação aguda tem duração relativamente curta, durando alguns minutos, horas ou dias e é independente da natureza do agente agressor, sendo a resposta muito similar aos diferentes estímulos (SIQUEIRA-JÚNIOR & DANTAS, 2000). A resposta fisiológica que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo é referida como uma fase precoce (0-1 hora) ao contrário do que ocorre na fase tardia da inflamação aguda (5-6 horas após a lesão), onde as células inflamatórias se acumulam no local lesado (ALBERTINI *et al.*, 2004). A inflamação aguda se caracteriza pelo predomínio de fenômenos exsudativos, que é consequência das alterações na permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo de líquido na região inflamada, fibrina, leucócitos, especialmente neutrófilos e hemácias. Evidências

demonstram que vários fatores desempenham importantes papéis na modulação da resposta inflamatória de cada uma das fases da inflamação aguda. Na fase precoce, mediadores como a histamina e bradicinina modulam a resposta inflamatória aumentando o calibre e o fluxo vascular, responsável pelo calor e rubor presente no foco de inflamação (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2004).

Durante a fase tardia da inflamação aguda, há predominância de eventos celulares que se caracterizam pela marginação, aderência endotelial, diapedese e migração dos leucócitos para o foco da lesão, decorrentes dos estímulos quimiotáticos. Todos os granulócitos, monócitos e, em menor grau, os linfócitos respondem aos estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005).

A inflamação crônica tem duração prolongada (semanas a meses), na qual há inflamação ativa, destruição tecidual e as tentativas de reparo estão ocorrendo simultaneamente. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica começa com frequência de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes pela ausência dos sinais cardinais da inflamação. A inflamação crônica origina-se de infecções persistentes por certos microrganismos, como os bacilos da tuberculose, *Treponema pallidum* e alguns fungos, por exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos (inalação de sílica) e de distúrbios de auto-imunidade (Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico) (CONTRAN, KUNAR & COLLINS, 2000).

Diferentemente da inflamação aguda que se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração principalmente de neutrófilos, a inflamação crônica se caracteriza por:

- ✚ Infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos, reflexo de uma lesão persistente a lesão;
- ✚ Destruição tecidual, induzida, sobretudo pelas células inflamatórias;

- ✚ Tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada por proliferação de pequenos vasos e em particular fibrose (CONTRAN, KUNAR & COLLINS, 2000).

Durante a evolução do processo de reparo, os eventos que ocorrem são: a infiltração de neutrófilos, infiltração de macrófagos, fibroplasia e deposição de matriz extracelular, angiogênese, cicatrização e reepitelização. A transmigração dos neutrófilos para tecidos lesados é um fenômeno precoce do processo de reparo. Ocorre quase que de imediato após sinalização dos neutrófilos retidos no coágulo, macrófagos residentes e células estromais (GERSZTEN *et al.*, 1999).

### 1.1.2. Mediadores envolvidos na inflamação

Os mediadores do processo inflamatório originam-se do plasma ou das células. Os mediadores oriundos do plasma (p.ex. complemento) estão presentes no plasma em formas precursoras que devem ser ativadas, em geral por uma série de clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas. Os mediadores oriundos de células estão contidos em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (p.ex. histamina nos mastócitos) ou são sintetizados originalmente (p.ex. prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo. As principais fontes celulares são plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos, mas as células mesenquimais (endotélio, músculo liso fibroblastos e maioria dos epitélios também podem ser induzidos a elaborar alguns mediadores) (ROBBINS, 2000; COLLINS, 1999).

A inflamação é desencadeada, conduzida, controlada e extinta pela presença de mediadores químicos, cada um com um papel específico, atuando em estágios definidos da reação inflamatória. Os mediadores podem originar-se do plasma, das células ou do tecido agredido, sendo divididos nos seguintes grupos: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina - bradicinina, sistema complemento, sistema de coagulação-fibrinolítico); metabólitos do ácido araquidônico (via ciclooxigenase e via lipoxigenase); proteases lisossômicas; radicais livres derivados do oxigênio; fatores ativadores das plaquetas (PAF); quimiocinas, citocinas e óxido nítrico (NO) (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2004).

A histamina encontra-se distribuída nos tecidos, sendo a fonte mais rica os mastócitos que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. Também é encontrada nos basófilos e plaquetas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por desgranulação dessas células. Em humanos a histamina causa dilatação das arteríolas e aumenta a permeabilidade vascular. A

histamina atua sobre a microcirculação principalmente através dos receptores H<sub>1</sub> (COLLINS, 1999).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é o segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e células enterocromafins. A liberação da serotonina das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexos antígeno-anticorpo. A agregação e liberação plaquetária também é estimulada pelo PAF, proveniente dos mastócitos durante reações mediadas pela imunoglobulina E (IgE). Desse modo, a reação de liberação plaquetária resulta em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COLLINS, 1999).

A bradicinina (BK) é um cininogênio vasoativo (nonapeptídeo) de alto peso molecular que apresenta potente efeito sobre a permeabilidade vascular. Seus efeitos são similares ao da histamina. A BK é um importante mediador da resposta inflamatória tecidual a estímulos irritantes, porém sua ação é de curta duração, pois ela sofre uma rápida inativação enzimática. A degradação enzimática pode ser feita por várias peptidases, incluindo o dipetidil carboxipeptidase cininase II (BOURA & SVOLMANIS, 1984).

O NO é também um mediador do processo inflamatório. Em 1980 foi demonstrado que a integridade do endotélio é necessária para que ocorra a vasodilatação via estimulação de receptores colinérgicos. Como resposta, as células endoteliais produziam um Fator de Relaxamento Derivado de Endotélio (EDRF), que levava a um relaxamento da musculatura lisa. Posteriormente, foi demonstrado que o endotélio vascular produzia NO, que apresentava propriedades físicas e biológicas do EDRF. O NO aumenta a concentração de GMPc intracelular, que medeia o relaxamento produzindo vasodilatação. A produção de NO é ativada pela entrada de Ca<sup>2+</sup> no interior da célula. Além de promover o relaxamento da musculatura lisa, o NO desempenha papéis importantes na inflamação tais como: reduz a

agregação plaquetária produzida pelos macrófagos, atua como radical livre causando citotoxicidade e aumenta a produção de prostaglandinas inflamatórias. A produção descontrolada de NO pelos macrófagos no choque séptico pode levar a uma vasodilatação sistêmica e a choque cardiogênico. (ROBBINS, 2000).

Os neuropeptídios liberados de neurônios sensitivos contribuem para as reações inflamatórias – constituindo a inflamação neurogênica. Os principais peptídios envolvidos são: a substância P, a neurocinina A e CGRP (peptídio relacionado ao gen da calcitonina). A substância P e a neurocinina A atuam sobre mastócitos, liberando histamina e outros mediadores e produzem contração da musculatura lisa e aumento da secreção de muco. O CGRP é um potente vasodilatador. A inflamação neurogênica está implicada na patogenia de várias condições inflamatórias, incluindo a fase tardia da asma, rinite alérgica, doença intestinal crônica e alguns tipos de artrite (MAGGI, 1996).

A família das quimiocinas é composta de aproximadamente 50 membros que se dividem em quatro famílias. Apesar da ação das quimiocinas ser mais evidente na quimiotaxia de macrófagos e linfócitos, alguns membros desta família de moléculas como a proteína quimioatraente de macrófagos (MCP-1) exerce esta função também sobre neutrófilos (CHRISTOPHERSON & HROMAS, 2001).

A interleucina-6 (IL-6) é considerada como 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).

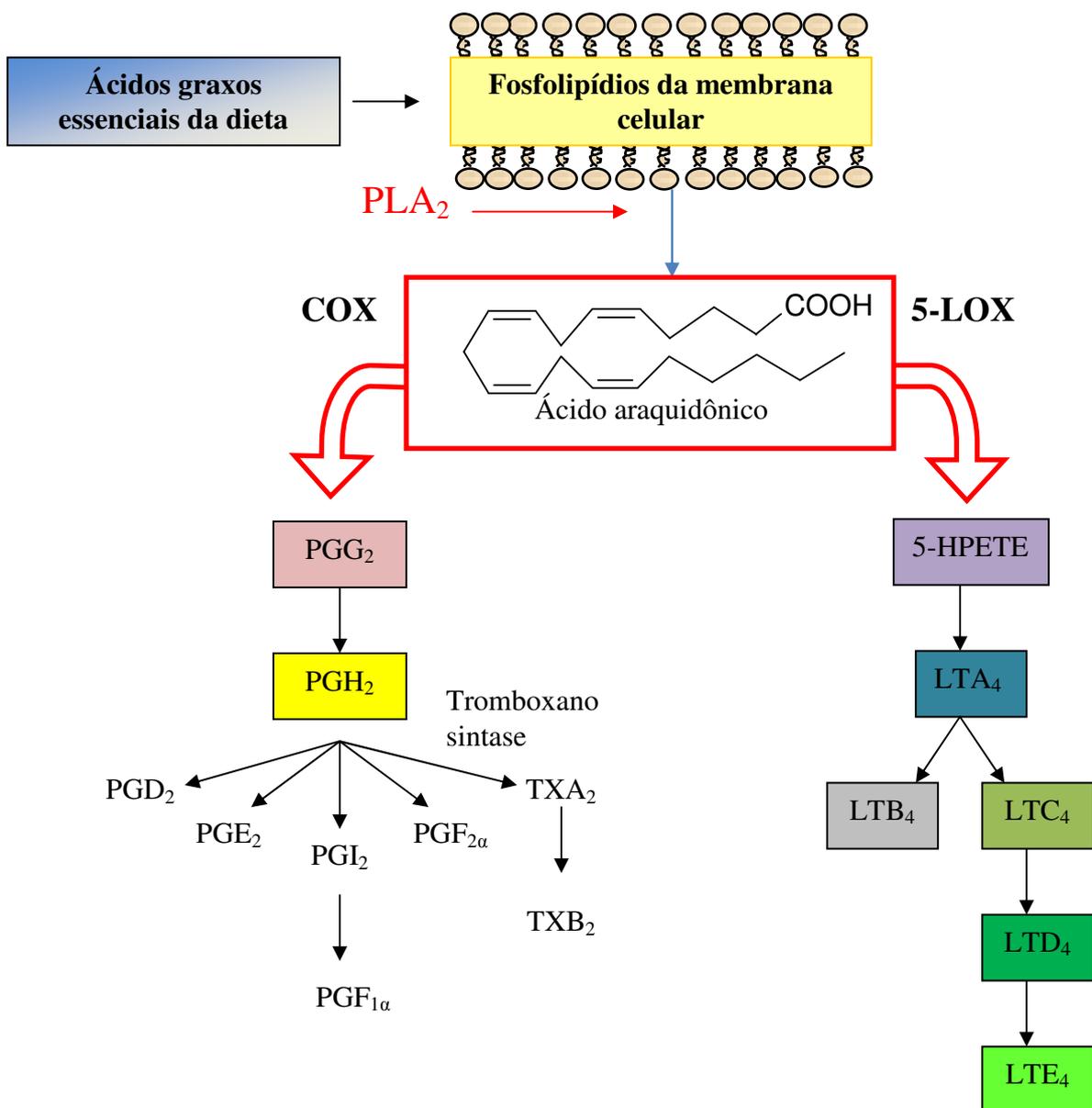
A interleucina-10 (IL-10) é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação. Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Adicionalmente, ela não só regula o crescimento ou

diferenciação de várias células do sistema imune, mas também de queratinócitos e células endoteliais (MOORE *et al.*, 2001).

Quando as células inflamatórias são estimuladas ou lesadas, outro tipo de sistema importante passa atuar, os eicosanóides. Muitos dos agentes inflamatórios importantes atuam, pelo menos em parte ao interferir na síntese de eicosanóides. Ao contrário, por exemplo, da histamina, os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos e sim produzidos a partir de fosfolipídios. Os eicosanóides estão envolvidos em vários processos fisiológicos e estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória (RANG, *et al.*, 2007).

O interesse pelos eicosanóides surgiu na década de 1930, após relatos que o sêmen continha uma substância que provocava a contração do músculo liso uterino. Acreditou-se que a substância tivesse origem na próstata e, assim, recebeu a designação de prostaglandinas. Posteriormente, ficou claro que a prostaglandina não era apenas uma substância, mas toda uma família de compostos, que eram produzidos em muitos, se não na maioria, dos tecidos e que derivam do ácido araquidônico. A principal fonte dos eicosanóides é o ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro ligações duplas. O ácido araquidônico é encontrado esterificado nos fosfolipídios de membrana, geralmente na posição dois. Os principais eicosanóides são as prostaglandinas, os tromboxanos, e os leucotrienos, embora sejam também produzidos outros derivados do araquidonato, como por exemplo, as lipoxinas (LX). Numerosos estímulos podem liberar o ácido araquidônico. Estes estímulos variam de acordo com o tipo celular, como por exemplo, a trombina das plaquetas, o fragmento do sistema complemento C5a nos neutrófilos, a bradicinina nos fibroblastos e as reações antígeno-anticorpo nos mastócitos. A lesão celular geralmente também inicia o processo (RANG, *et al.*, 2007).

O ácido araquidônico livre é metabolizado por diversas vias: pela via das ciclooxigenases, que iniciam a biossíntese das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e por várias lipoxigenases, que iniciam a síntese dos leucotrienos (LTs), as LXs e outros compostos (**Figura 1**) (RANG *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico. Adaptado de RANG, *et al.*, 2007; MORROW & ROBERTS II, 2007.

Anteriormente achava-se que a ciclooxigenase (COX) existia apenas em duas isoformas: COX-1 e COX-2. Pesquisas recentes demonstraram a existência de uma terceira isoforma, COX-3 (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A COX-3 compartilha de todas as

características estruturais e catalíticas importantes da COX-1 e COX-2 (KENNEDY *et al.*, 1994). A COX-1 ocorre na maioria das células como enzima constitutiva, e acredita-se que os prostanóides por ela produzidos estão envolvidos na homeostasia como, por exemplo, na regulação das respostas vasculares e coordenação das ações de hormônios circulantes. A COX-2 é induzida por diferentes células após um estímulo inflamatório. As etapas de metabolismo do ácido araquidônico diferem em diferentes células. Nas plaquetas, a via leva à síntese de tromboxano  $A_2$ , ao passo que, no endotélio vascular conduz a síntese de prostaciclina e, nos macrófagos, resulta principalmente na síntese de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Os prostanóides afetam a maioria dos tecidos, exibindo uma notável variedade de efeitos. A ação da  $PGD_2$  provoca vasodilatação, inibição plaquetária, relaxamento do músculo gastrointestinal, relaxamento uterino, modificação da liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários. A ação de  $PGF_2\alpha$  promove contração do miométrio em humanos. A ação da prostaciclina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) causa inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese através de efeitos sobre a reabsorção tubular de  $Na^+$ . A ação do  $TXA_2$  causa vasoconstrição, agregação plaquetária e broncoconstrição.

As prostaglandinas na maior parte  $PGE_2$  e prostaciclinas são mediadores importantes em processos inflamatórios, de dor e de febre. São sintetizadas nos tecidos pela enzima COX-1 constitutiva e pela sua isoforma COX-2 que pode ser induzida com citocinas, fatores do crescimento ou outros estímulos inflamatórios (VANE, BAKHLE & BOTTING, 1998). As prostaglandinas são hiperalgésicas e realçam a nocicepção causada por outros mediadores tais como: bradicinina (FERREIRA, MONCADA & VANE *et al.*, 1973). As ações da  $PGE_2$  são: quando se liga a receptor  $EP_1$  provoca contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal. Quando esta se liga aos receptores  $EP_2$  causa broncodilatação, vasodilatação, estimulação da secreção de músculo liso intestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal. Quando se liga a receptores  $EP_3$  provoca contração do músculo liso

intestinal, inibição da secreção de ácido gástrico, aumento da secreção gástrica de muco, inibição da lipólise, inibição da liberação dos neurotransmissores autônomos e estimulação de contração em útero gravídico humano (RANG, *et al.*, 2007). A COX-3 está provavelmente envolvida na biossíntese de mediadores antiinflamatórios endógenos (SERHAN *et al.*, 2002).

A resposta inflamatória é sempre acompanhada da liberação de prostanóides, cujo produto predominante é a PGE<sub>2</sub>, embora a PGI<sub>2</sub> também possa ser encontrada. Em áreas de inflamação aguda, a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> são produzidas pelos vasos sanguíneos locais, enquanto os mastócitos liberam PGD<sub>2</sub>. Na inflamação crônica, as células da série monócitos-macrófagos também liberam PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub>, a PGI<sub>2</sub> e a PGD<sub>2</sub> são poderosos vasodilatadores “*per si*” próprias e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. É esta ação dilatadora combinada sobre as arteríolas pré-capilares que contribuem para o eritema e aumento do fluxo sanguíneo nas áreas de inflamação aguda. Esses prostanóides não aumentam diretamente a permeabilidade das vênulas pós-capilares, mas potencializam esse efeito da histamina e da bradicinina. De forma semelhante, eles em si não produzem dor, mas potencializam o efeito da bradicinina ao sensibilizar as fibras aferentes.

As lipoxigenases, que são enzimas solúveis localizadas no citossol, são encontradas nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos. A principal enzima desse grupo é a 5-lipoxigenase, a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos. O Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) pode ser encontrado em exsudatos inflamatórios e ocorre nos tecidos em muitas condições inflamatórias, incluindo artrite reumatóide, psoríase e colite ulcerativa. Há evidência de que estes contribuem para a hiper-reatividade brônquica subjacente em asmáticos, e acredita-se que estejam envolvidos entre os principais mediadores tanto na fase inicial quanto na tardia da asma. O fator de ativação de plaquetas (PAF) é outro mediador inflamatório que é liberado pela maioria das células inflamatórias quando estas são

estimuladas. Por conseguinte, é liberado por neutrófilos polimorfonucleares na fagocitose de partículas opsonizadas, por macrófagos e eosinófilos ativados, por mastócitos e basófilos em decorrência da interação com antígeno e por plaquetas após estimulação com trombina. O PAF é importante mediador espasmogênico na musculatura lisa brônquica e ileal. Sua atividade espasmogênica sobre músculo liso brônquico humano pode ser devida à ativação da PLA<sub>2</sub> com conseqüente produção de cisteinil-leucotrienos. Nas plaquetas, provoca mudança da forma e liberação de grânulos densos (RANG *et al.*, 2007).

## **1.2. Dor**

### **1.2.1. Generalidades da dor**

Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tissular ou real ou mesmo sem nenhuma lesão, embora descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. 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; RANG, *et al.*, 2007).

A dor apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial e o componente afetivo/emocional. 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 percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo, que é seguido pela tomada de consciência e pela reação a dor. É uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN & BANSINATH, 1996).

### **1.2.2. Tipos de dor**

A dor pode ser denominada de acordo com o tipo de lesão e/ou dos mediadores envolvidos, sendo 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, somando-se a isso ocorrer manifestações dolorosas decorrentes de algumas desordens comumente apresentadas em paciente que a experimentam como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta um estímulo não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON & CHAOUCH, 1987; DRAY, URBAN & DICKENSON, 1994; BESSON; 1999; CARR & GOUDAS, 1999)

O processo doloroso é classificado de várias formas, mas o critério temporal é mais utilizado por levar em consideração o tempo de sua atividade. 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 geralmente está associada com 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 acarretar conseqüências 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; BESSON, 1999). A dor é uma sensação que compreende três mecanismos básicos: 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 ao nível de nociceptor, seja conduzido para o SNC e modulação, vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004)

### **1.2.3. Transdução da informação nociceptiva**

Os receptores sensoriais para dor são representados por terminações nervosas livres de fibras mielínicas delgadas A $\delta$  (tipo III) e fibras nervosas amielínicas (tipo IV) sendo denominadas como um todo de nociceptores polimodais por apresentar sensibilidade a estímulos mecânicos (espasmo e distensão tecidual), isquêmicos e químicos (bradicinina, íons potássio, prótons, etc) (NESS & GERBHART, 1990). Os nociceptores 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 (DJOUHRI & 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 (SENGUPTA & GEBHART, 1994).

Mais recentemente foram identificadas estruturas denominadas nociceptores “silenciosos” presentes nas terminações nervosas periféricas de fibras C de nervos articulares, vísceras, mas não de músculos. Em condições normais encontram-se em repouso, porém na vigência de processos inflamatórios, estímulos químicos ou térmicos tornam-se responsivos até mesmo àqueles inócuos (PORTO, 2004). Acredita-se que este grupo contribua na sinalização da dor crônica, alterações prolongadas nos reflexos espinhais e regulação autonômica anormal de órgãos internos (CERVERO, 2002).

#### **1.2.4. Transmissão da informação nociceptiva**

As fibras mielínicas A $\delta$  são responsáveis pela rápida transmissão da informação nociceptiva, ou sinais de dor aguda, e as fibras amielínicas C responsáveis pela transmissão lenta de sinais, que representa a dor em queimação resultante da ativação destas fibras. Periféricamente, as vias aferentes viscerais primárias transmitem para a medula o impulso gerado ao nível do nociceptor através de um neurônio pseudo-unipolar, fibras A $\delta$  e C, compreendido por um nervo espinhal ou craniano em um gânglio sensitivo anexo a este nervo. Quando provenientes das vísceras, cursam por nervos autonômicos simpáticos (cardíaco médio e inferior, esplânicos maior, menor e médio e esplânicos lombares) e parassimpáticos (trigêmio, facial, glossofaríngeo, vagos e sacrais). Centralmente os axônios pseudounipolares viscerais projetam suas terminações para a medula espinhal ao nível da raiz dorsal (AL-CHAER & TRAUB, 2002).

#### **1.2.5. Modulação da informação nociceptiva**

Sabe-se que muitas classes de neurônios do corno dorsal, os próprios neurônios aferentes primários e fibras descendentes do cérebro exercem um grande potencial modulatório sobre a transferência da informação nociceptiva. Após entrar no corno dorsal da medula espinhal, a informação nociceptiva proveniente das vísceras está sujeito ao processamento por uma diversidade de mecanismos, alguns dos quais potencializando (facilitação), outros inibindo sua transferência para centros supra-espinhais (MILLAN, 2002).

Há muitos anos se conhece a possibilidade de controle do ingresso de estímulos nociceptivos desde estruturas cerebrais. A estimulação elétrica da zona periaquedutal e do núcleo da rafe bulbar, rico em receptores opióides, provoca analgesia, sem alteração motora, através de uma via inibitória descendente, o fascículo dorso-lateral. Vias descendentes opióides atuam de forma inibitória, revelando um importante papel no alívio da dor. Além de

sistemas opióides, também existem sistemas inibitórios descendentes mediados por norepinefrina e serotonina (TORREGROSA, 1994).

### **1.2.6. Mediadores da algisia**

Substâncias químicas, denominadas genericamente de substâncias algogênicas, surgem em grandes quantidades nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos, ou isquêmicos. Algumas são de produção local, como a serotonina, bradicinina, histamina, citocinas, produtos derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, por atuação da ciclooxygenase e lipoxigenase. Outras são produzidas no sentido inverso da transmissão dos nervos sensitivos, isto é, do corpo neuronal para a periferia, sendo as mais importantes, a Substância P e o CGRP. Esse processo de sensibilização local é denominado de hiperalgisia primária. Essa grande quantidade de mediadores químicos leva a redução do limiar de sensibilidade e aumento da sensibilidade das terminações nervosas vizinhas. É criado um processo de hiperalgisia que se estende progressivamente às regiões não envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial. (MARQUES, 2004).

Os mastócitos são derivados de precursores presentes na medula óssea. Participam de processos alérgicos e hipersensibilidade do tipo I (GALLI, 1993). Os mastócitos também estão associados a muitas condições patológicas em que a dor é o sintoma predominante. A cistite intersticial e a síndrome do intestino irritável são exemplos. Em ambas as condições, um aumento do número de mastócitos tem sido descrito na bexiga e no intestino, respectivamente (BÁRBARA *et al.*, 2004; THEOHARIDES *et al.*, 1998).

A extrema proximidade entre mastócitos e as terminações periféricas dos neurônios sensoriais resulta em uma amplificação bi-direcional em que a SP liberada da terminação nervosa ativa a degranulação mastocitária, liberando histamina. Esta induz uma maior liberação de SP das terminações sensoriais, além de ativar a liberação de NGF (Fator de

Crescimento do Nervo), que exacerba a situação por promover o desenvolvimento e aumento da função dos neurônios sensoriais (TRACEY & WALKER, 1995).

Em geral demonstra-se que a liberação central e periférica de SP e CGRP ocorrem predominantemente de fibras nociceptivas de condução lenta (fibras C), mas a presença destes peptídeos em alguns nociceptores de fibras A $\delta$  demonstra que tais neurônios contribuem para sua liberação. No soma das fibras secundárias, localizadas no corno dorsal da medula espinhal, receptores NK1 são ativados pela substância P e com isso atuam como facilitadores no processo de transmissão nervosa (MORRIS *et al.*, 2004).

Os receptores NK1 revelam um papel essencial na mediação da resposta nociceptiva central e inflamatória periférica a estímulos nóxios, predispondo a uma inflamação neurogênica e modulando respostas aos estímulos mecânicos (LAIRD *et al.*, 2000). A atividade inflamatória periférica induzida por SP, que atuando em receptores NK1 medeia uma complexa resposta que consiste em aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, secreção glandular e influxo de células pró-inflamatórias (CATERINA *et al.*, 1997).

A biossíntese e a liberação de substância P podem ser em parte mediadas pela ativação do receptor da capsaicina TVRP1 (receptor vanilóide tipo 1, inicialmente chamado VR1) conhecido por ser um receptor polimodal (estimulado pelo calor, prótons e derivados lipídicos, como a anadamida, leucotrieno B<sub>4</sub>, B<sub>12</sub>). Este induz influxo de Ca<sup>2+</sup> nos neurônios nociceptivos, resultando na despolarização de liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios dos terminais de neurônios aferentes (SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* usando diferentes mediadores inflamatórios, como a bradicinina, atuando em receptores B<sub>2</sub> (FERREIRA, DA SILVA & CALIXTO *et al.*, 2004); ATP extracelular, atuando em receptores P2Y<sub>2</sub> (MORIYAMA *et al.*, 2003), indiretamente são capazes de sensibilizar e estimular o receptor TRPV1. Essa habilidade de

integrar muitos estímulos faz do TRPV1 um alvo adequado para modular a sensibilidade dos nociceptores após lesão tecidual. Camundongos “knock-out” para o receptor TRPV1 apresentam analgesia para uma variedade de estímulos de dor relacionados a estados inflamatórios, sugerindo que antagonistas destes receptores possam ser efetivos no tratamento de dores associadas com lesão tecidual e exposição a agentes químicos (CATERINA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 2000). Uma prolongada ou uma repetida ativação dos receptores TRPV1 resulta em dessensibilização e insensibilidade a estímulos subseqüentes, tendo este processo um papel importante na regulação da percepção da dor (KOPLAS *et al.*, 1997).

Aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, atuam como neuromediadores nos neurônios aferentes primários, atuando em diferentes receptores glutamatérgicos ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico (AMPA) e kainato, além dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, todos com ampla distribuição no SNC. A ativação desses receptores precipita a produção de segundos mensageiros (AMPc, PKC, fosfatidilinositol, fosfolipase C) para abertura de canais de cálcio e, conseqüentemente influxo de  $Ca^{2+}$  nas células neuronais. Ocorre então a produção de outros mediadores (NO, metabólitos do ácido araquidônico) e ativação de oncogenes (c-fos, muito utilizados como marcadores no estresse neuronal, que provavelmente alteram a transmissão do potencial de ação e a ultra-estrutura dos neurônios, suas sinapses e sensibilização medular) (KRAYCHETE & GUIMARÃES, 2005).

### **1.2.7. Vias neuronais envolvidas na percepção da dor**

Normalmente a sensação dolorosa é iniciada com a detecção de um estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, de natureza mecânica, térmica ou química por sensores específicos chamados nociceptores. Apesar de o termo sugerir uma estrutura especializada, os nociceptores são terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias finas não

mielinizadas, denominadas fibras C, com baixa capacidade de condutância (0.5-2 m/s) ou mielinizadas, as fibras A $\delta$ , que conduzem o impulso nervoso com maior facilidade (10-30 m/s), havendo ainda as fibras A $\beta$  que também são mielinizadas de grande diâmetro sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso, respondendo a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, fazem sinapses com neurônios do corno medular dorsal, onde os neurotransmissores são sintetizados e liberados (BESSON, 1999; MILLAN, 2002). Por sua vez estes últimos dão origem as vias ascendentes da dor, que são responsáveis pela transmissão do impulso nervoso as estruturas centrais supra-espinhais.

A dor pode originar-se de fibras mielinizadas como também de fibras desmielinizadas. As fibras aferentes dos músculos e vísceras também conduzem informações nociceptivas. Os nervos desses tecidos apresentam terminações sensoriais finas que se ramificam nos tecidos periféricos e são ativados por vários estímulos (mecânico, térmico e químico). As fibras C e as fibras A $\delta$  são responsáveis por enviar esses estímulos nocivos a partir dos tecidos lesados, transportando informações nociceptivas (MILLAN, 2002).

Muitos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central já foram estabelecidos, mas os mecanismos de sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. O conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e substâncias envolvidas na modulação central e periférica da nocicepção. O mecanismo de transdução neuroquímica da dor envolve, geralmente, a interação de mediadores inflamatórios com um canal iônico da membrana tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio, cálcio), com canais iônicos operados por receptor (NMDA [N-Metil-D-Aspartato], receptor colinérgico nicotínico), com receptores associados tirosina quinase ou ainda com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados à

proteína G, como é o caso das prostaglandinas e bradicinina (LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000). Esses mecanismos de transdução nociceptiva normalmente envolvem a ação de mediadores inflamatórios em receptores específicos que se encontram acoplados a sistemas efetores que, quando devidamente ativados, promovem a liberação de uma série de mediadores álgicos formados em cascata, além de segundos mensageiros, como o AMPc (adenosina 3'5'-monofosfato cíclico) e GMPc (guanosina 3'5'-monofosfato cíclico), responsáveis pela ativação de proteínas quinases intracelulares, ou de terceiros mensageiros como o  $Ca^{2+}$ . Os terceiros mensageiros irão interferir na atividade de outras proteínas celulares e na regulação de canais iônicos. Os principais sistemas efetores dos receptores ativados pelos mediadores inflamatórios são representados pela adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C (PLC), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tirosina quinase, proteínas quinase A, C e G e canais iônicos (MILLAN, 2002).

### **1.3 Terapia farmacológica da dor e inflamação**

O tratamento da dor tem como objetivo a prevenção da incapacidade, o conforto e a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Os analgésicos podem ser classificados por agirem centralmente, sendo denominados narcóticos, ou por desempenharem sua ação na periferia. Os analgésicos centrais são muito efetivos em uma variedade de situações clínicas, porém podem ser responsáveis por uma série de efeitos que limitam sua utilização clínica (CAPETOLA, SHRIVER & ROSENTHALE, 1980).

Opióide é o termo genérico utilizado para definir toda substância, natural ou sintética, cuja ação analgésica é originária da interação com os receptores opióides ( $M\mu$ , Delta e Kappa), podendo ser antagonizadas pela naloxona. Essas substâncias são amplamente utilizadas no tratamento da dor durante o câncer e na dor aguda. Os receptores opióides estão localizados principalmente no sistema nervoso central, embora na presença de inflamação os

mesmos possam ser se expressos no sistema nervoso periférico, o que gera uma nova perspectiva para o uso tópico destes medicamentos. Os opióides são classificados como agonistas plenos, como por exemplo, a morfina e a metadona, ou agonistas parciais, como é caso da buprenorfina e nalbufina. A morfina, um agonista Mu ( $\mu$ ), é a referência entre os opióides, sendo um agente padrão para o tratamento das dores agudas e crônicas. No entanto, o limite do uso dos agonistas de receptores opióides puros são os efeitos colaterais incontroláveis. Além disso, alguns pacientes podem desenvolver tolerância com o uso prolongado ou redução da eficácia com a mesma dose (RIBEIRO *et al.*, 2002)

Os canabinóides têm sido utilizados no tratamento da dor por muitos séculos. Apesar de estudos pré-clínicos revelarem que eles são analgésicos nos modelos testados, sua utilização não é propagada, por motivos legais e farmacológicos, como por exemplo, o efeito psicotrópico. Tais substâncias exercem sua ação ao interagirem com os receptores canabinóide rCB<sub>1</sub> e/ou rCB<sub>2</sub>. Os receptores rCB<sub>1</sub> estão localizados no sistema nervoso central, em áreas que podem mediar a maioria dos efeitos que afetam as funções cognitivas, dor e memória de curto prazo (córtex cerebral e hipocampo), controle e coordenação motora (gânglios da base e cerebelo), hipotermia e hiperfagia (hipotálamo). São também encontrados na medula espinhal, gânglios da medula dorsal, sistema nervoso entérico, adipócitos, células endoteliais, hepatócitos, tecido muscular e trato gastrointestinal. Os receptores rCB<sub>2</sub> estão presentes no sistema periférico, e se relacionam com o sistema imunológico, linfócitos T, linfócitos B, baço, amígdalas e células microgлияis ativadas. A ativação dos receptores rCB<sub>1</sub> está associada às propriedades anti-hiperalgésicas e antialodínicas dos canabinóides. Estudos sugerem que também os receptores rCB<sub>2</sub>, classicamente relacionados com a resposta imunológica, estão implicados com a antinocicepção. O delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), princípio ativo da *Cannabis sativa*, liga-se igualmente em ambos receptores, já os

outros canabinóides apresentam maior ou menor afinidade por um ou outro receptor (BONFÁ *et al.*, 2008).

Vários analgésicos periféricos também podem apresentar, além da atividade analgésica, propriedades antiinflamatória, antipirética e antiagregante plaquetária, sendo denominados como agentes antiinflamatórios, pois agem no processo de redução da reação inflamatória por inibirem a liberação de prostaglandinas, atuando em etapas pré-estabelecidas na via do ácido araquidônico (RANG *et al.*, 2007; MORROW & ROBERTS II, 2007). Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e glicocorticóides (CAPETOLA, SHRIVER & ROSENTHALE, 1980; RANG *et al.*, 2007).

Os AINEs destacam-se entre os grupos farmacêuticos mais utilizados na prática médica 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. 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; BRUM-JÚNIOR, 2006; 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: antiinflamatório, analgésico e antipirético (RANG, *et al.*, 2007). O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição do sistema enzimático denominado COX, responsável pela síntese dos diferentes tipos de eicosanóides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), que são mediadores do processo inflamatório (BRUM-JÚNIOR, 2006).

O ácido acetilsalicílico (AAS) (Aspirina®) foi sintetizado por Hoffmann em 1898. Inicialmente, este composto químico foi usado como um agente antipirético e

antiinflamatório. Na década de 60 o AAS emergiu como um potente agente que prolongava o tempo de sangramento e inibia a agregação plaquetária. A aspirina reduz a ativação plaquetária por meio da acetilação irreversível da COX-1, e, portanto, reduz a produção de TXA<sub>2</sub> pelas plaquetas. A inibição da COX-1 é rápida, saturável em baixas doses, irreversível e permanente por toda a vida da plaqueta (TURNBULL *et al.*, 2006; UNDAS *et al.*, 2007).

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 clássicos, os quais inibem não seletivamente ambas as isoenzimas COX-1 e COX-2, e inibidores seletivos de COX-2 (BRUM-JÚNIOR, 2006; ONG *et al.*, 2007).

Embora os AINEs tradicionais 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).

Os inibidores seletivos para COX-2 foram desenvolvidos para amenizar as complicações gastrointestinais dos AINEs tradicionais. A descoberta de inibidores da isoforma COX-2 levou a obtenção da segunda geração de AINEs, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe, entre outros. Entretanto, o rofecoxibe foi retirado do mercado em 2004 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; SANTOS *et al.*, 2007).

Há ainda os analgésicos da classe da acetanilidas, cujo representante principal é o paracetamol, que apesar de serem classificados como AINEs, não reduzem inflamação, apresentando apenas efeitos analgésicos e antipiréticos. O mecanismo de ação do paracetamol está correlacionado com a inibição da COX-3 (AYOUB *et al.*, 2004).

Os glicocorticóides são hormônios esteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (SCHIMMER & PARKER, 2007). A sua síntese e liberação ocorrem naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A estrutura química desses compostos possui o núcleo básico ciclopentanoperidrofenantreno. Os glicocorticóides sintéticos, desenvolvidos pela indústria farmacêutica, são muito semelhantes aos naturais, caso considerada a sua estrutura química (DAMIANI *et al.*, 2001; BAVARESCO *et al.*, 2005).

O emprego dos glicocorticóides na terapêutica deve-se principalmente ao fato destes apresentarem poderosos efeitos antiinflamatórios e imunossupressores. Os glicocorticóides apresentam a capacidade de atravessarem a membrana lipoprotéica das células, ligando-se a receptores citosólicos e exercendo sua ação no interior do núcleo, onde interagem com o DNA ou com outras proteínas implicadas no processo de transcrição (ação genômica, específica ou inespecífica) (DAMIANI *et al.*, 2001; BAVARESCO *et al.*, 2005). Os corticóides têm sido considerados como agentes inibidores da produção de prostaglandinas, pela ação inibitória que exercem sobre a PLA<sub>2</sub>, por meio da liberação de lipocortina-1, que é um mediador protéico antiinflamatório. O resultado final da ação destes antiinflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos mediadores pró-inflamatórios. A lipocortina-1 atua seqüestrando o substrato fosfolipídico, além de inibir diretamente a PLA<sub>2</sub>. Os glicocorticóides exógenos inibem também a expressão da COX-2, reduzindo a geração de prostanóides nas células inflamatórias, porém exercem pouco ou nenhum efeito sobre a enzima constitutiva COX-1 (ONG *et al.*, 2007).

No mecanismo clássico de ação, os glicocorticóides se ligam a um receptor localizado no citoplasma das células-alvo, através de sua porção carboxi-terminal. O receptor de glicocorticóide (RG) inativado está ligado a um complexo protéico que inclui duas

proteínas termolábeis de 90 kDa (hsp 90), uma imunofilina de 59 kDa e várias outras proteínas. Após a ligação entre o RG e o glicocorticóide, ocorre a dissociação das hsp90, expondo dois sinais de localização nuclear, e permitindo que o complexo ativado se mova rapidamente para dentro do núcleo e se liga ao DNA. Dentro do núcleo, o complexo RG-glicocorticóide interage com sítios de ligação no DNA chamados elementos de resposta de glicocorticóides (ERG). A ligação do glicocorticóide ao ERG costuma gerar, mais freqüentemente, a uma indução na transcrição de vários genes, dentre eles, os que codificam lipocortina, vasocortina, endonuclease, ribonucleases, endopeptidases, somatostatina, fator inibidor de migração, receptores para hormônios e citocinas (IL-1, IL-2). No entanto, pode ocorrer também uma inibição da transcrição gênica, visto que a maioria das interleucinas e citocinas, que são induzidas no processo inflamatório e que são bloqueadas pelos glicocorticóides, não apresentam, nas regiões promotoras de seus genes, os ERGs (DAMIANI *et al.*, 2001).

Em um segundo mecanismo de ação dos glicocorticóides, verificou-se que não há interação com o DNA. Neste mecanismo de ação, os glicocorticóides ativam a proteína ativadora-1 (AP-1), no entanto pode haver interação com outros fatores nucleares, como por exemplo, com NF- $\kappa$ B. Normalmente, esse mecanismo de ação ocasiona a inibição da transcrição de vários genes envolvidos nas respostas inflamatória e/ou imune como citocinas, iNOS, COX, PLA<sub>2</sub>, elastase, collagenase, fator ativador de plasminogênio (DAMIANI *et al.*, 2001).

Como os glicocorticóides são responsáveis pela síntese de macromoléculas, seus efeitos podem demorar algumas horas a dias para ser fazerem presentes. Por outro lado, a duração das ações dos glicocorticóides pode prolongar-se após a diminuição de seus níveis. No entanto, alguns efeitos dos glicocorticóides são rápidos demais para serem explicados pela alteração da transcrição celular. Estes seriam mediados por receptores de membrana ou pela

interação direta com membranas celulares. Este mecanismo foi observado através dos efeitos *in vitro* na respiração, na síntese de proteínas e na ação da (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase e (Ca<sup>+2</sup>)-ATPase em timócitos (DAMIANI *et al.*, 2001; CARDOZO-PEREIRA *et al.*, 2007).

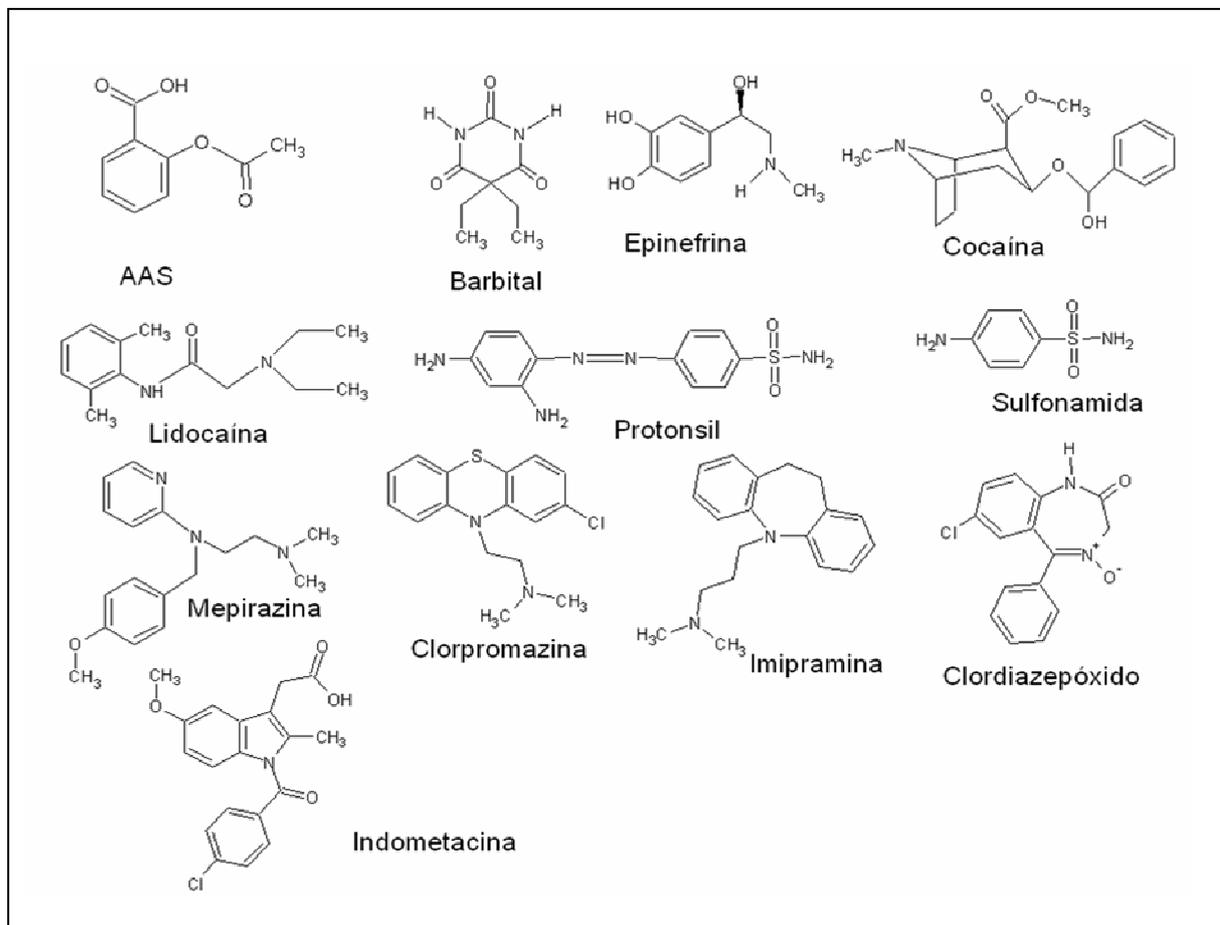
Os fármacos glicocorticóides, de uma maneira geral, apresentam vários efeitos adversos, uma vez que eles interferem no metabolismo geral do organismo. Estas substâncias são capazes de reduzir a captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando glicemia de rebote, com conseqüente glicosúria, além de aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo protéico. Outros efeitos adversos da terapia com glicocorticóides são: a redução da absorção de cálcio no trato gastrointestinal e o aumento da excreção deste cátion pelos rins, podendo resultar, assim, em osteoporose. Estes fármacos, também, alteram o metabolismo e a redistribuição das gorduras, característica da Síndrome de Cushing, um freqüente efeito adverso da terapia com glicocorticóides (RANG *et al.*, 2007; BAVARESCO *et al.*, 2005).

## 1.4 Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos sintéticos

O ácido acetilsalicílico (AAS) (**Quadro 1**) foi o pioneiro dos fármacos sintéticos. Há mais de 100 anos da sua síntese, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório (atuando no controle da febre, na dor e na inflamação), além de inibir a agregação plaquetária (YUNES & CECHINEL, 2001). Um dos primeiros marcos do desenvolvimento de fármacos sintéticos foi a síntese do barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico) em 1903, indicado como agente hipnótico. Em 1904 foi sintetizada a epinefrina (broncodilatador e descongestionante nasal), seguida da procaína e da benzocaína, dois anestésicos locais pertencentes à classe dos ésteres do ácido *para*-aminobenzóico, sintetizados a partir da estrutura da cocaína. Em seguida, Dale (1910) estabeleceu a relação estrutura-atividade das aminas relacionadas à epinefrina e denominou os compostos análogos de adrenérgicos. Atualmente, a lidocaína é um dos representantes da classe dos anestésicos locais mais utilizados (**Quadro 1**) (YUNES & CECHINEL, 2001; DEWICK, 1997)

Os primeiros estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica para o planejamento racional de moléculas bioativas ganharam destaque durante a Segunda Grande Guerra. A pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na química sintética, motivada pela necessidade de tratamento de infecções, da dor, de processos alérgicos e da depressão. Em 1932, descobriu-se que o prontossil, que era utilizado como corante, ao se reduzir a sulfonamida passava a apresentar propriedade antiinfeciosa. Era a origem da sulfaterapia, que teve importância vital na Segunda Guerra Mundial (YUNES & CECHINEL, 2001). O período pós-guerra foi de prosperidade para o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, como os anti-histamínicos (*e.g.* mepirazina), antipsicóticos (*e.g.* clorpromazina), antidepressivos (*e.g.* imipramina) e os ansiolíticos benzodiazepínicos (*e.g.* clordiazepóxido). A indometacina é um importante fármaco antiinflamatório não-esteróide de natureza indólica,

que surgiu nesta época (1962), dando início ao desenvolvimento dos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (**Quadro 1**) (NSAIDs).



**Quadro 1** - Estrutura química de fármacos de origem sintética.

## **2. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL**

## **2.1 O bioisosterismo como estratégia de planejamento, desenho e modificação molecular de protótipos de fármacos**

Dentre as estratégias de planejamento, desenho e modificação molecular para a descoberta de novos compostos, candidatos a fármacos, o bioisosterismo ocupa lugar de destaque por sua enorme versatilidade (LIMA & BARREIRO, 2005).

O conceito de bioisosterismo refere-se a compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes e propriedades biológicas similares. Além disso, pode ser definida como uma estratégia de modificação molecular de um composto-protótipo, baseada na troca de determinado(s) fragmento(s) molecular(s), por exemplo, um grupamento funcional por outro que apresente propriedades físico-químicas similares, como a acidez. As motivações para aplicação do bioisosterismo podem estar relacionadas tanto às fases farmacocinéticas, modulando as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, quanto à farmacodinâmica de ação de um composto bioativo visando sua otimização (BARREIRO & MANSOUR, 2008).

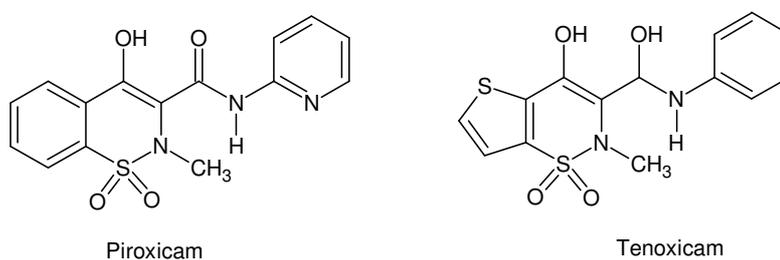
O bioisosterismo resultou da aplicação do princípio de isosterismo, desenvolvido por Langmuir, em moléculas de substâncias bioativas. Em 1919, esse pesquisador estudava o comportamento químico e a reatividade de determinadas substâncias que possuíam átomos com mesmo número de elétrons de valência, portanto isoeletrônicos ( $N_2$  e CO) (LANGMUIR, 1919). Em 1951, Friedman introduziu o termo bioisosterismo para descrever o fenômeno observado entre substâncias estruturalmente relacionadas que apresentaram propriedades similares ou antagônicas em um mesmo sítio receptor (FRIEDMAN, 1951). O bioisosterismo, em suas primeiras aplicações como estratégia de modificação molecular de um protótipo beneficiou-se da regra do hidreto, uma regra empírica formulada por Grimm, em 1925 (GRIMM, 1925), que estabelecia que a adição de um átomo de hidrogênio com um par de

elétrons (e.g. hidreto) a um átomo fornece um pseudo-átomo apresentando as mesmas propriedades físicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da Tabela Periódica do átomo inicial.

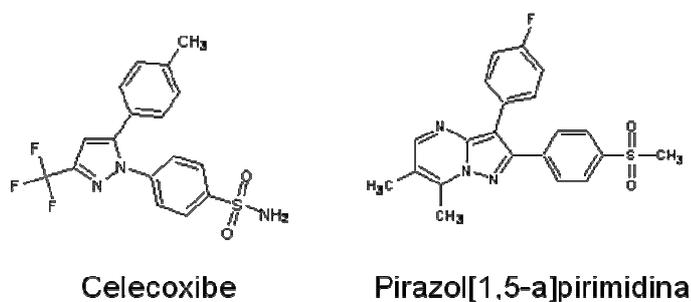
Em 1970, Alfred Burguer classificou e subdividiu o bioisosterismo em duas categorias: clássico e não-clássico. O bioisosterismo clássico foi agrupado dessa forma, em função da valência de átomos, grupamentos ou radicais, incluindo nessa categoria os anéis aromáticos ou não, equivalentes. As demais possibilidades foram classificadas genericamente como bioisosterismo não-clássico (BURGUER, 1970). Com a evolução deste conceito, incorporam-se a esta segunda classe o bioisosterismo envolvendo grupos funcionais com propriedades estruturais equivalentes, incluindo o retroisosterismo, subunidades estruturais com sítios de interação equivalentes com biorreceptores, isto é, bióforos ou pontos estruturais além da introdução ou abertura de anéis. Os principais fatores a serem considerados quando de uma proposta de substituição bioisostérica compreendem:

- ✚ Tamanho e volume molecular, distribuição eletrônica dos átomos ou as considerações sobre o grau de hibridização, polarizabilidade, ângulos de ligação;
- ✚ Grau de solubilidade lipídica e aquosa dos compostos bioisostéricos em estudo, de maneira a permitir a previsão da alteração das propriedades físico-químicas, por exemplo, pKa;
- ✚ Reatividade química dos grupos funcionais ou subunidades estruturais bioisostéricas, objetivando principalmente antecipar as principais alterações nos processos de biotransformação, inclusive quanto à eventual alteração do perfil de toxicidade seletiva dos principais metabólitos;
- ✚ Fatores conformacionais, incluindo a capacidade diferencial de formação de ligações-H inter ou intramoleculares dos bioisósteros em estudo (BARREIRO & MANSOUR, 2008).

Aplicando-se a estratégia do bioisosterismo de anéis, Binder propôs o tenoxicam, como bioisótero do piroxicam, através da troca do núcleo benzotiazínico pelo sistema tienotiazínico (**Figura 2**). Este exemplo representa a relação bioisostérica existente entre anéis aromáticos heterocíclicos e o grupo fenila (BINDER *et al.*, 1987). A semelhança entre as propriedades físico-químicas dos anéis fenila e tiofeno está bem fundamentada e foi utilizada na criação do conceito de bioisosterismo de anéis ou anéis equivalentes (BARREIRO & MANSOUR, 2008). Almansa e cols. em 2001 descreveram a relação bioisostérica entre os anéis pirazolo e pirazolo-piridina. A troca do anel pirazólico, presente no celecoxibe, pelo anel pirazolo-pirimidina (**Figura 3**) resultou na otimização das propriedades farmacodinâmicas do celecoxibe, embora tendo comprometido sua biodisponibilidade oral (ALMANSA *et al.*, 2001).



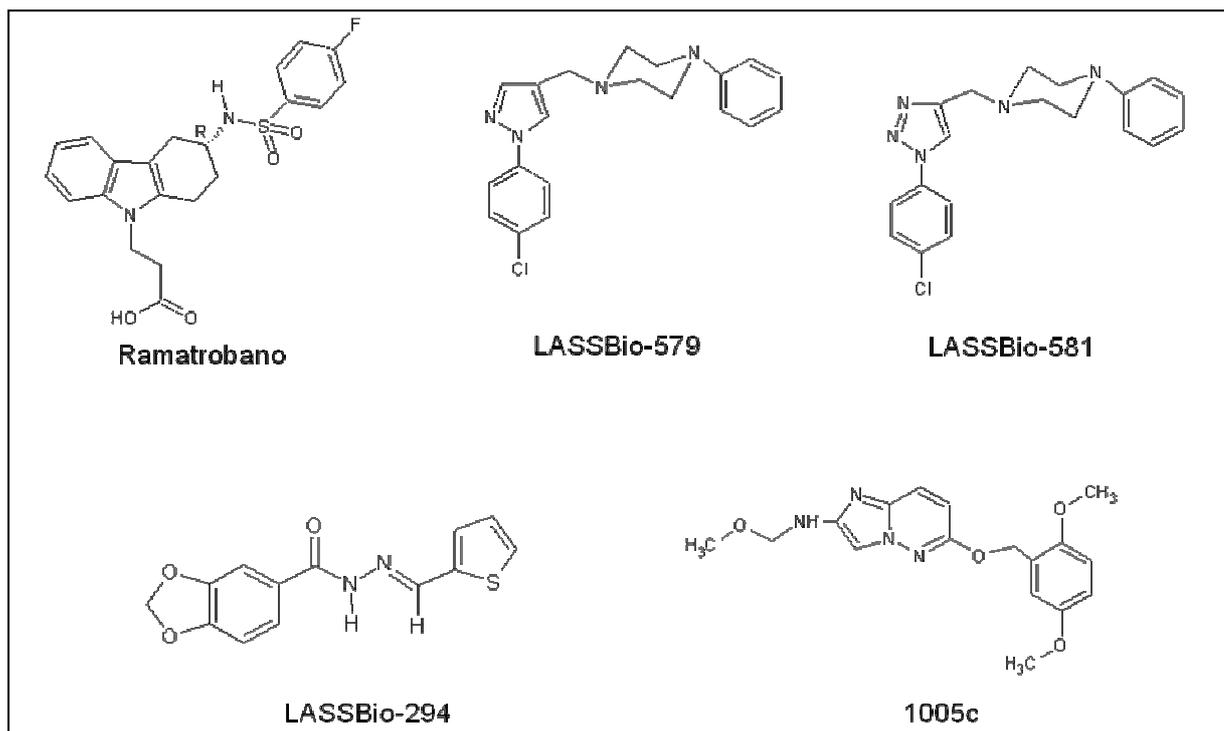
**Figura 2-** Relação bioisostérica clássica (fenila x tiofenila) entre Piroxicam e Tenoxicam.



**Figura 3-** Relação bioisostérica clássica (pirazolo x pirazolo-pirimidina e NH<sub>2</sub> x CH<sub>3</sub>) entre Celecoxibe e seu análogo Pirazolo [1,5-a] pirimidina.

## 2.2 A simplificação molecular

A estratégia de simplificação molecular (SM), útil para o desenho ou modificação de compostos de interesse terapêutico, refere-se à introdução de mudanças estruturais planejadas, em um determinado composto-protótipo, capazes de resultar em uma nova molécula estruturalmente mais simples, compreendendo a redução de peso molecular, a diminuição do número de grupos funcionais e de centros esterogênicos, entre outros. Inúmeros fármacos pertencentes a diferentes classes terapêuticas foram descobertos pela aplicação dessa estratégia em substâncias de origem natural diversas, produzindo estruturas mais simples, que preservavam os efeitos terapêuticos do protótipo natural e apresentavam perfil de atividade mais adequado ao emprego, por possuírem melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. A SM ou “striptease” molecular encontrou larga aplicação na “domesticação” terapêutica de moléculas naturais selvagens. A simplificação molecular foi empregada no desenvolvimento de novos protótipos de fármacos tais como: antiasmáticos (e.g. ramatrobano), antipsicóticos (e.g. LASSBio-579 e LASSBio-581), cardiotônicos (e.g. LASSBio-294) e antitumoral (e.g. 1005c) (**Quadro 2**) (BARREIRO & MANSOUR, 2008).



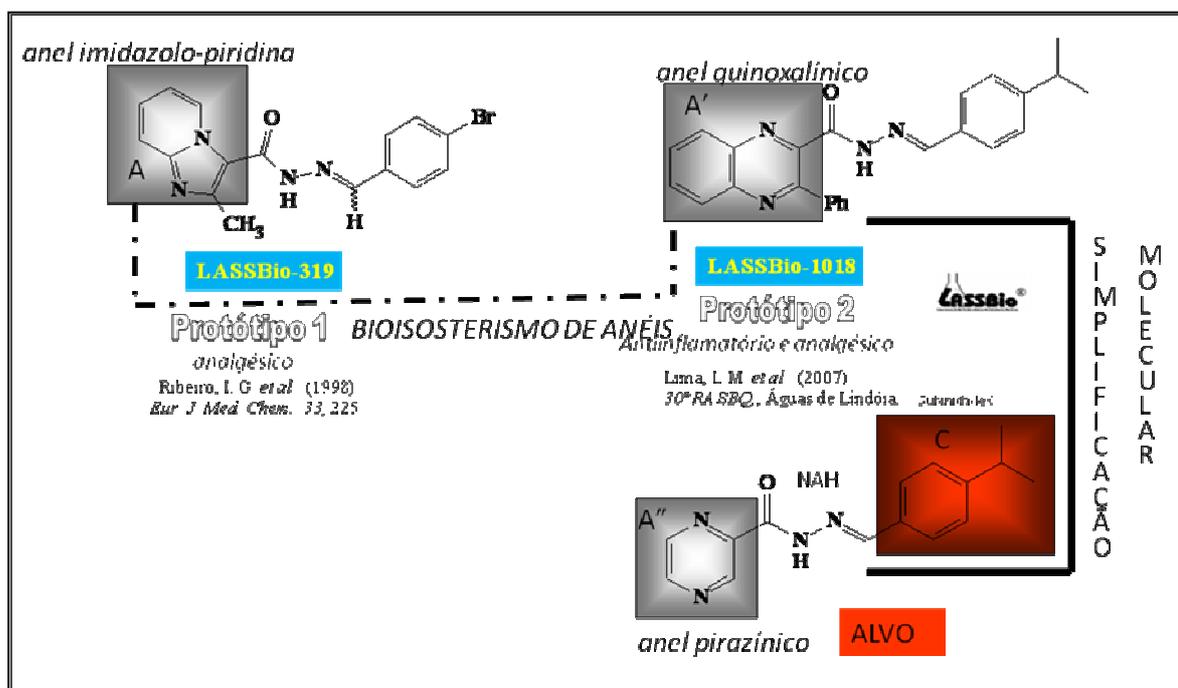
**Quadro 2-** Estrutura de protótipos obtidos por simplificação molecular

### 2. 3. Planejamento dos derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos

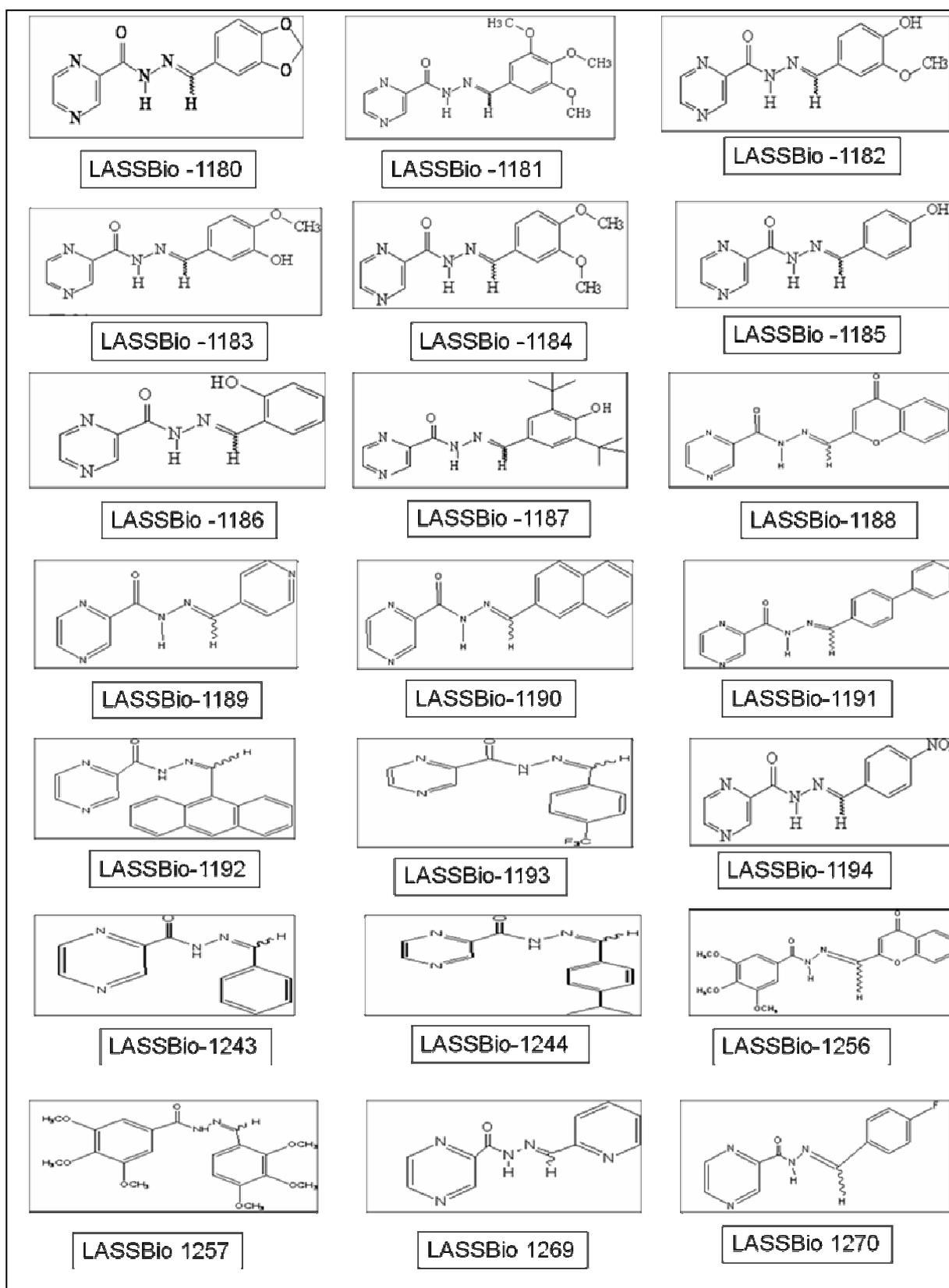
As atividades de pesquisa realizadas no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro caracterizam-se por sua multidisciplinaridade e concentração na área da Química Medicinal, tendo como meta principal a descoberta de novos protótipos de fármacos para o tratamento de enfermidades crônico-degenerativas de cunho inflamatório. Recentemente, uma série de derivados *N*-acilidrazônicos quinoxalínicos foi desenhada, a partir do protótipo LASSBio-319, sintetizada e avaliada quanto suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas. Destes estudos destacou-se o composto LASSBio-1018 como promissor protótipo de fármaco antiinflamatório não esteroideal (AINEs) (LIMA *et al.*, 2007). Considerando a necessidade de otimizar as propriedades farmacoterapêuticas de LASSBio-1018, foi planejada uma nova série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH), planejada a partir de modificações estruturais introduzidas no protótipo LASSBio-1018. Estas modificações foram baseadas na aplicação da estratégia de simplificação molecular – representada pela exclusão do grupo fenila em C3 de LASSBio-1018 – e bioisosterismo de anéis, representado pela troca do núcleo quinoxalínico pelo anel pirazina na estrutura dos novos derivados NAH desenhados (**Figura 4**). Posteriormente, outras modificações foram introduzidas em nível da subunidade imínica (N=CH) da função NAH (CONHN=CH), visando introduzir grupamentos com propriedades elétron-doadoras e/ou elétron-retiradoras distintas, de modo a favorecer o estudo da contribuição dos fatores eletrônicos e conformacionais na otimização das atividades antiinflamatória e analgésica da nova série, denominada NAH-pirazínica (**Figura 4**).

As *N*-acilidrazonas (NAH) têm sido amplamente descritas como grupamento farmacofórico para a atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antiplaquetária. Postula-se que estas atividades são decorrentes da capacidade deste grupamento mimetizar a fração bi-

alífica de ácidos graxos insaturados e amidas, por exemplo, ácido araquidônico e anandamida (DUARTE *et al.*, 2007).



**Figura 4** - Gênese do desenho molecular da nova série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, a partir de modificações na estrutura do protótipo LASSBio-1018.



**Quadro 3** - Estrutura dos compostos da série dos derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos desenhados e sintetizados e alvo dos estudos farmacológicos realizados em âmbito da presente dissertação.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial antinociceptivo e antiinflamatório de uma nova série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos racionalmente planejados a partir de modificações no protótipo LASSBio-1018 – desenhados e sintetizados no LASSBio® (Faculdade de Farmácia, UFRJ) como candidatos a protótipo de fármacos analgésicos e antiinflamatórios.

### 3.2. Objetivos específicos:

- ✚ Determinar as propriedades antinociceptivas dos compostos planejados e sintetizados, em modelos de nociceção periférica aguda e central;
- ✚ Determinar as propriedades antiinflamatórias em modelos animais de inflamação aguda dos compostos;
- ✚ Caracterizar o efeito do derivado mais ativo em modelo de inflamação crônica.

## **4. METODOLOGIA**

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-35 g) de ambos os gêneros, com 6 a 8 semanas de idade e ratos Wistar com 6 a 8 semanas (100-220 g), de ambos os gêneros, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizados 6 camundongos da linhagem Swiss para os ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, ensaio de nocicepção induzida por formalina, ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina, ensaio de peritonite induzida por Zymosan A e ensaio de placa quente. Foram utilizados 8 ratos Wistar no ensaio de indução da síndrome experimental de artrite. No dia de cada experimento os animais eram pesados. Os animais foram deixados em jejum por oito horas antes do início da experiência com livre acesso à água. Os animais foram eutanasiados por inalação em câmara com CO<sub>2</sub>. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Alagoas para manuseio de animais em modelos de dor e inflamação (ZIMMERMAN, 1983).

#### **4.2. Substâncias**

Foram utilizados: ácido acético e formalina (Merck, São Paulo, Brasil), capsaicina (Merck A.G., Darmstadt, Alemanha), indometacina, celecoxibe, Tween 80, Zymosan A, adjuvante completo de Freund's (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), morfina (Cristália-Brasil, São Paulo, Brasil). Foram utilizados como padrões de referência: celecoxibe, indometacina, talidomida e morfina. Os padrões e as substâncias-teste foram administrados na dose de 100 µmol/kg, com exceção da morfina que foi administrada na dose de 15 µmol/kg. Os padrões e as substâncias-teste foram diluídos em 20 µL de Tween 80 com goma arábica e administrados por via oral, com exceção da morfina que foi administrada por via i.p e não foi diluída.

#### **4.3. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COLLIER *et al.*, 1968)**

Neste ensaio o estímulo nociceptivo foi induzido por ácido acético 0,1 M (0,1 ml/10g de peso animal) injetado intraperitonealmente. Cinco minutos após a injeção do ácido as contorções foram contadas durante 20 minutos. As substâncias foram administradas 40 minutos antes do estímulo nociceptivo. O número de contorções apresentado pelos animais tratados com as substâncias foi comparado ao número de contorções do controle positivo.

#### **4.4. Ensaio de nociceção induzida por formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1987)**

O ensaio consistiu da injeção de uma solução de formalina 2,5% (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira do animal. O tempo (segundos) em que o animal permaneceu lambendo a pata foi registrado com um cronômetro. Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: primeira fase, primeiros cinco minutos e segunda fase, quinze a trinta minutos após a injeção, que estavam respectivamente relacionadas à fase neurogênica e fase inflamatória.

#### **4.5. Ensaio de dema de orelha de camundongo induzido por capsaicina (SANCHEZ & MORENO, 1999)**

Este ensaio consistiu na administração local (orelha direita) de 20 µL de uma solução de capsaicina diluída em acetona (12.5 mg/ml). As substâncias foram administradas 40 minutos antes do estímulo flogístico. O ensaio foi caracterizado por uma resposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Os animais foram sacrificados e suas orelhas pesadas para obtenção do índice de inflamação.

#### **4.6. Ensaio de peritonite induzida por Zymosan A (DOHERTY *et al.*, 1985)**

Os camundongos foram tratados ou não com as substâncias em análise e em seguida foram submetidos simultaneamente ao ensaio de peritonite, por administração i.p. de 0,5 mL de uma solução estéril de Zymosan A (Sigma) (2 mg/mL). Após 6 hs da injeção com Zymosan A (Sigma), a cavidade peritoneal foi lavada com dois mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). Em seguida foi analisado o lavado peritoneal e foi feita a contagem total do número de células em câmara de Neubauer, diluindo as células em 1:20 em tripan blue. A contagem foi feita em microscópio ótico em objetiva de 10x.

#### **4.7. Ensaio de indução da síndrome de artrite experimental com adjuvante completo de Freund's (OMOTO, 2005)**

Este ensaio consistiu da administração de 100  $\mu\text{L}$  de adjuvante completo de Freund's (1 mg/ml) por via intradérmica na face dorsal da pata do animal. O tempo total de experimento foi de 21 dias. No dia 0 os animais foram pesados, as patas medidas e feita a indução de artrite. A partir do 14º dia os animais foram tratados ou não com as substâncias e o tratamento mantido até o 21º dia. As substâncias foram administradas por via oral na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ . A medida das patas foi realizada com um paquímetro digital (Mitutoyo). No 22º os animais foram eutanasiados.

#### **4.8. Ensaio de Placa Quente (KURAIISHI *et al.*, 1983)**

A atividade analgésica central foi avaliada através do teste da placa quente ( $54 \pm 1,0$  °C). Os animais foram colocados sobre a placa aquecida e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida das patas traseiras ou dianteiras) foram cronometrados. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-

off” de 20 segundos. Feito isso, as substâncias foram administradas por via oral na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$  registrou-se os segundos que o animal permaneceu com a pata sobre a placa aquecida. As medidas eram feitas em intervalos de 30 minutos.

#### **4.9. Análise Estatística**

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se ANOVA no tutorial Prisma® seguido do teste Dunnet. Os valores foram considerados significativos quando  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado nas legendas nas figuras.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

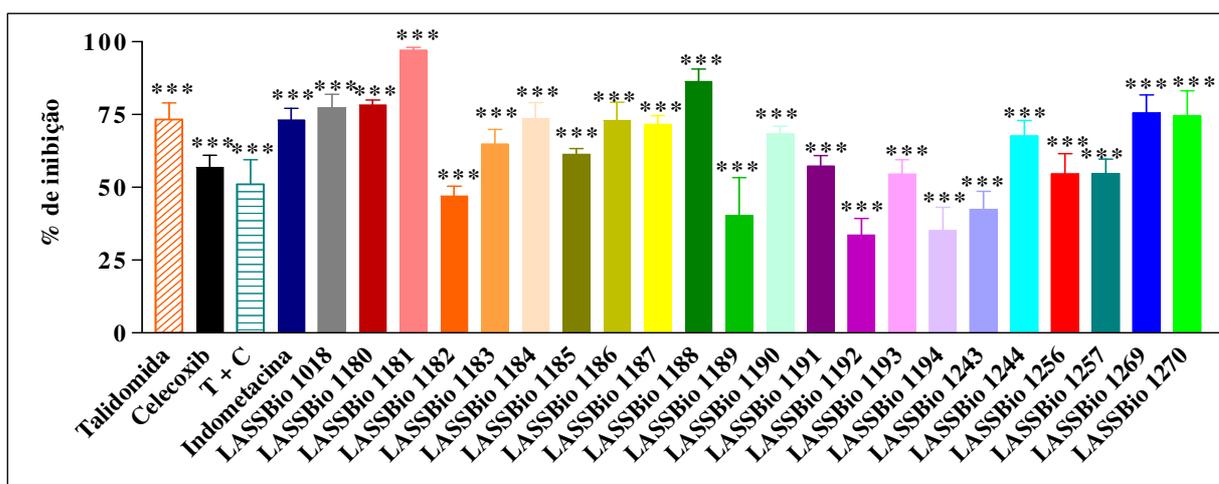
## 5. Resultados e discussão

Para a avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória realizou-se ensaios clássicos tais como: ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,1M, ensaio de nocicepção induzida por formalina ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina, ensaio de peritonite induzida por Zymosan A, ensaio de indução da síndrome de artrite experimental induzida por adjuvante completo de Freud's e ensaio da placa quente.

No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, é possível observar na **Figura 5** que todas as substâncias, administradas por via oral, apresentaram uma diferença estatisticamente significativa da resposta com  $p < 0,001$  quando comparadas com o controle positivo. Neste resultado, destaca-se o efeito de dois integrantes da série: o LASSBio-1181 e do LASSBio-1188 que apresentaram porcentagem de inibição maior que 80 %. O LASSBio-1018 induziu inibição estatisticamente significativa de 75 % da resposta. A talidomida, o celecoxibe e a indometacina apresentaram % de inibição maior que 60 % da resposta. Não houve aumento do efeito quando se administrou a talidomida concomitante com o celecoxibe.

O ensaio de contorção abdominal envolve diferentes mecanismos nociceptivos tais como: sistema simpático através da liberação de aminas biogênicas e a atuação das ciclooxigenases (DUARTE *et al.*, 1996; COLLIER *et al.*, 1968). Neste modelo, a dor é gerada via mediadores endógenos como bradicinina, histamina, substância P e prostaglandinas, que este agem por estimulação de neurônios nociceptivos periféricos. Estas fibras são sensíveis a narcóticos, como morfina e antiinflamatórios não-esteroidais (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). Estes resultados sugerem que as substâncias possuem um grande potencial antinociceptivo, uma vez que todas foram capazes de inibir a resposta nociceptiva no modelo de contorção.

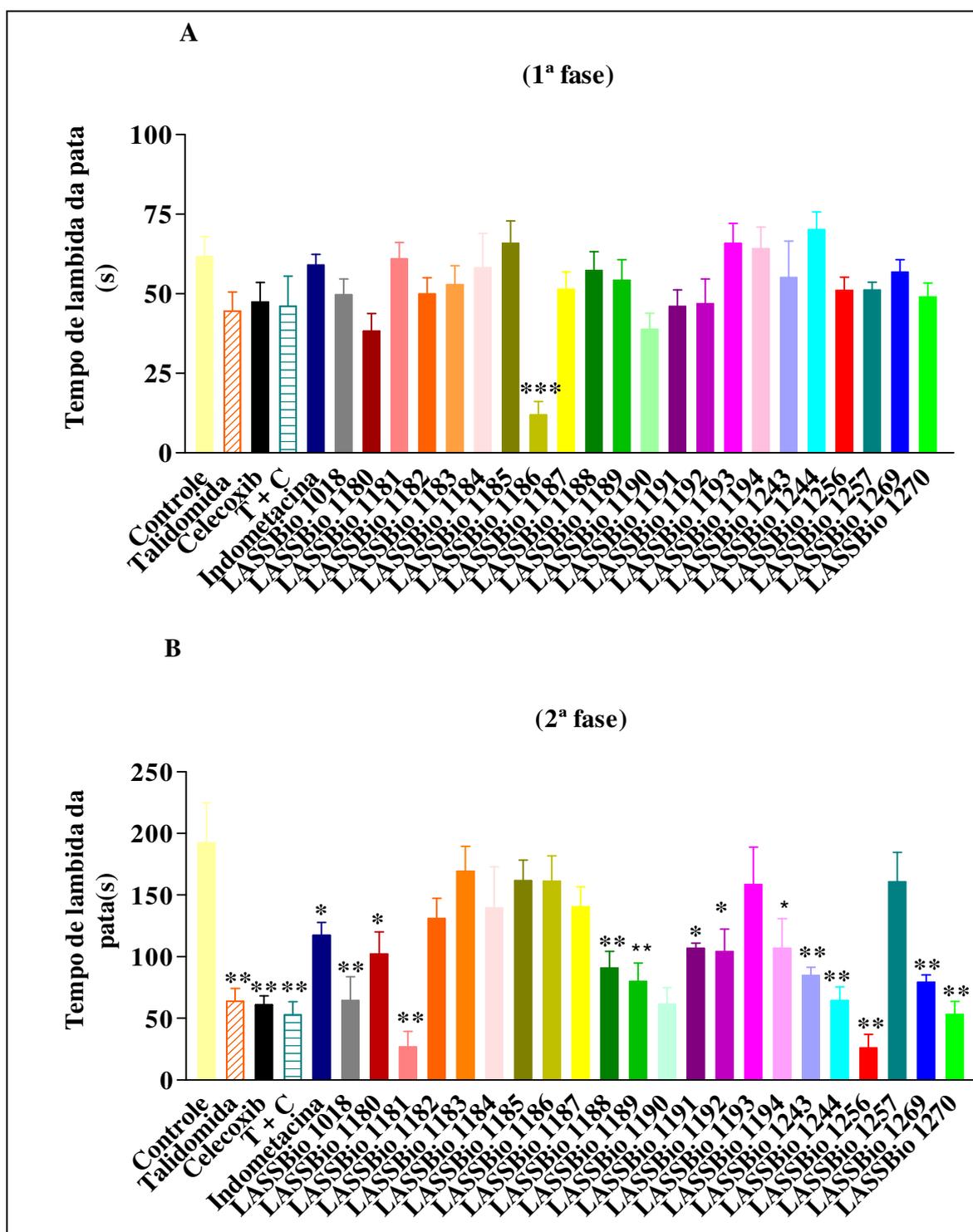


**Figura 5** - Efeito da série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100  $\mu$ mol/kg em ensaio de nocicepção induzido por ácido acético (HAc) (6 animais). (T + C = Talidomida + Celecoxibe administrados concomitante na dose de 50  $\mu$ mol/kg, por via oral). Os dados representam a média e o erro padrão da média (\*\*\*) $P < 0,001$  no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Para avaliar melhor o perfil antinociceptivo as substâncias foram submetidas ao ensaio de nocicepção induzida por formalina. Como mostrado nas Figuras **6A** e **6B** na 1ª fase do modelo apenas o LASSBio-1186 apresentou diminuição estatisticamente significativa do tempo de latência quando comparado com o controle apenas com formalina, porém na 2ª fase quinze substâncias apresentaram significativa diminuição do tempo de lambda, destacando-se com a maior inibição, LASSBio-1181 e LASSBio-1256. Esse ensaio é constituído por duas fases: a primeira fase que é caracterizada por intensa dor neurogênica, imediatamente após a

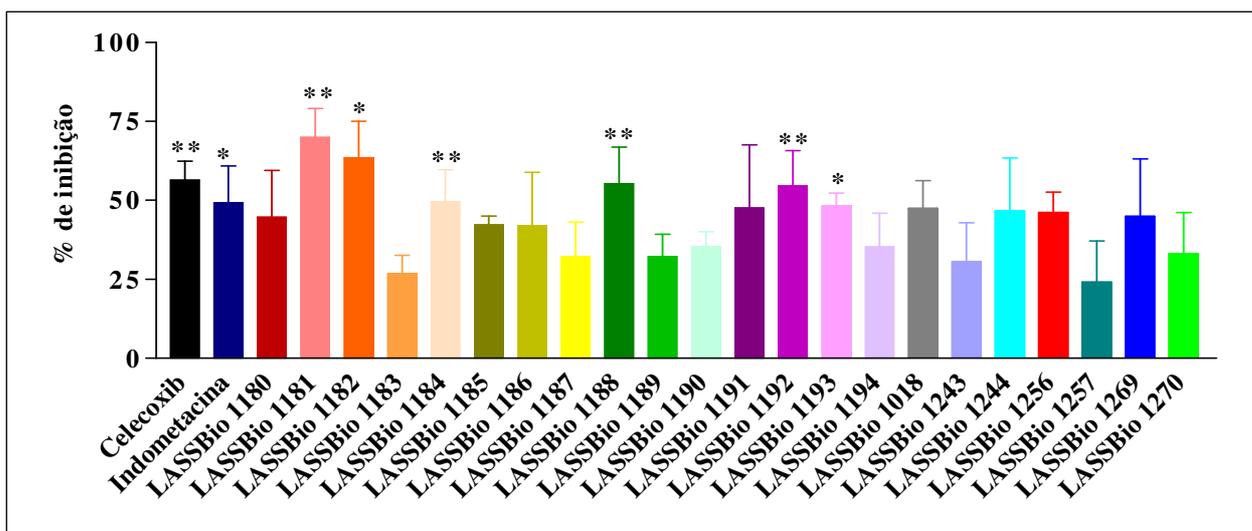
injeção e parece ser causada pela estimulação de fibras-C subsequente à estimulação periférica (estimulação direta de nociceptores). Por um período ocorre uma redução da atividade nociceptiva. A segunda fase parece ser causada por mudanças teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e é 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. A vantagem de usar o modelo de formalina, é que se pode discriminar entre componentes de dor central e periférica (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 (revisado por HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992). A morfina, um analgésico narcótico, pode inibir ambas as fases (SHIBATA *et al.*, 1989) e AINES por ação supra-espinhal podem reduzir a dor em ambas as fases (MARTINDALE, BLAND-WARD & CHESSELL, 2001). 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).

Estes dados sugerem que o LASSBio-1186 tem um perfil antinociceptivo, uma vez que foi capaz de inibir 80,79 % a primeira fase da formalina e o LASSBio-1181 e LASSBio-1256, com perfil antiinflamatório, induzindo uma inibição 86,05 % e 86,5 %, respectivamente, superior ao LASSBio-1018 com inibição de 66,66 %, a indometacina padrão de inibidor de COX não seletivo com inibição de 39,08 %, e do celecoxibe padrão de inibidor seletivo COX-2 com 68,30 % de inibição.



**Figura 6A e 6B** - Efeito da série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100  $\mu$ mol/kg em ensaio de nociceção induzido por formalina (6 animais). (T + C = Talidomida + Celecoxibe administrados concomitante na dose de 50  $\mu$ mol/kg, por via oral). (1ª e 2ª fase). Os dados representam a média e o erro padrão da média (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

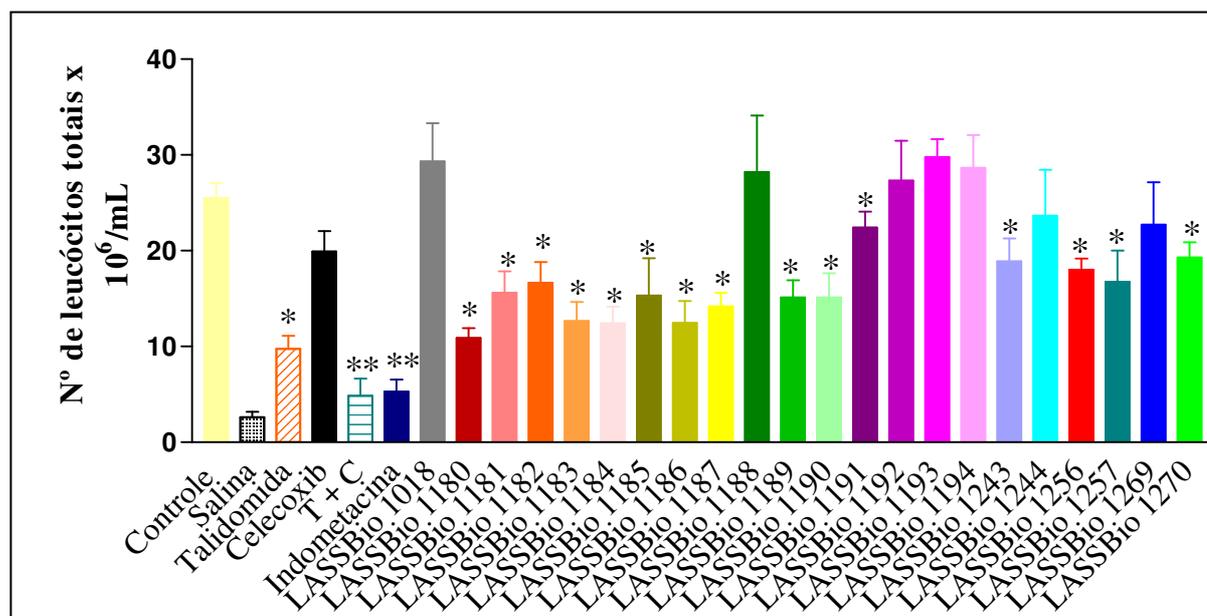
Para avaliar o efeito antiinflamatório, as substâncias foram submetidas ao ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. Como evidenciado na Figura 5 todas as substâncias apresentaram inibição no modelo de inflamação neurogênica, porém apenas o LASSBio-1181, LASSBio-1182, LASSBio-1184, LASSBio-1188, LASSBio-1192 e LASSBio-1193 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle apenas com capsaicina (**Figura 7**). A capsaicina é isolada das pimentas vermelhas, e provoca uma intensa sensação de ardência via ativação de neurônios sensoriais envolvidos com a nocicepção térmica. Esta, ativa prótons do receptor VR-1 que é localizado em pequenos diâmetros de neurônios sensoriais (CATERINA *et al.*, 1997, TOMINAGA *et al.*, 1998). Esta ativação resulta da ativação de canais de cálcio não seletivos, aumentando cálcio intracelular que se dá a partir da despolarização induzida pelo sódio (SZAALAZI & BLUMBERG, 1999). Este estímulo aumenta a liberação de mediadores: substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gen da calcitonina A (CGRP) a partir de neurônios sensoriais isolados, a partir de tecidos periféricos, e a partir da espinha do corno dorsal (BEVAN & GEPETTI, 1994; KESSLER *et al.*, 1999; VASKO, CAMPBELL & WAITE, 1994), e esta liberação é dependente da entrada de cálcio na célula. Prótons também ativam canais iônicos sensíveis a ácido e um número desses canais fica localizado em vários tipos de neurônios sensoriais (LINGUEGLIA *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1995). O papel que esses canais têm na inflamação neurogênica não foi ainda estabelecido apesar de a evidência mostrar que estes são importantes na liberação de transmissores. Estes dados sugerem uma possível ação sobre a liberação de mediadores neurogênicos e/ou inflamatórios.



**Figura 7** - Efeito da série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina administrados por via oral, na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$  em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina (6 animais). Os dados representam a média e o erro padrão da média (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  no teste de ANOVA “One Way” seguido do teste de Dunnet).

Para avaliar se as substâncias interferem na migração celular foi realizado o ensaio de peritonite induzida por Zymozan A. Neste ensaio apenas sete substâncias não inibiram a migração celular. O fármaco padrão indometacina apresentou 79,37% de inibição, e o LASSBio-1180 induziu o maior percentual de inibição dentre todas as substância testadas (56,90%) e o protótipo LASSBio-1018 mostrou-se inativo nestas condições experimentais (**Figura 8**). A peritonite induzida por Zymosan A em camundongos é bem caracterizada e largamente utilizada como modelo de inflamação (DOHERTY *et. al.*, 1985) O Zymosan A é um componente insolúvel de polissacarídeo da parede de célula do fermento *Sacharomyces cerevisiae*. Entre outras ações, o Zymosan A induz degranulação de célula do Sistema Mononuclear Fagocitário e ativa macrófagos. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo o Zymosan A, induz um extravasamento vascular aumentado, um dos sinais primários de inflamação. Isto é um passo chave na formação inflamatória de exsudato e é seguido por um recrutamento tempo-dependente de células migratórias, especialmente

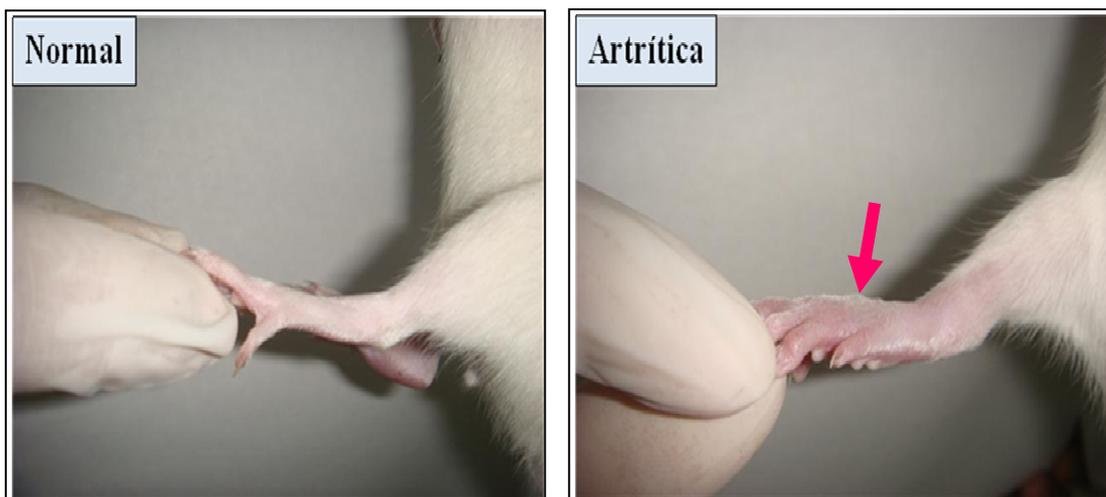
neutrófilos. Há muitos mediadores que coordenam os eventos iniciais da inflamação aguda, tais como aminas vasoativas, prostanóides, leucotrienos, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, NO e citocinas. O edema é resultante do extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por aminas vasoativas e eicosanóides. A vasodilatação é mediada primariamente pelo NO e prostanóides vasodilatadores. Citocinas pró-inflamatórias, 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). Os resultados observados neste ensaio permitem inferir que os derivados exercem efeitos inibitórios sobre a migração celular, entretanto, estudos posteriores são necessários para determinar o alvo para estas substâncias.



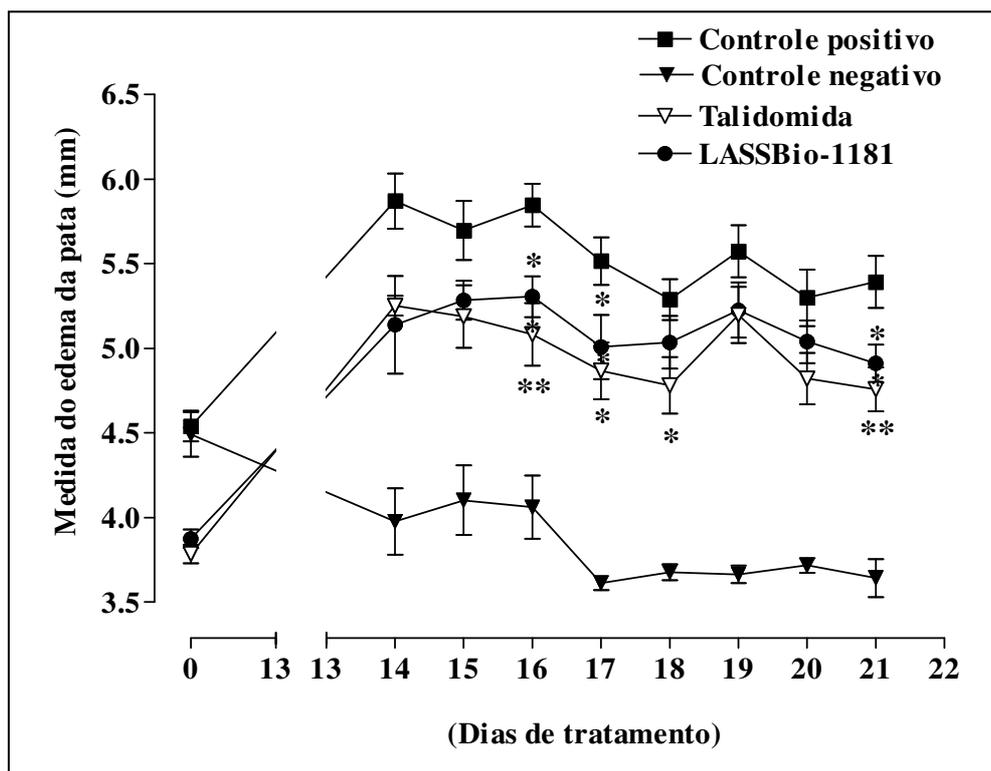
**Figura 8** - Efeito da série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, do celecoxibe, da indometacina, da talidomida e do protótipo LASSBio-1018, administrados por via oral na dose de 100  $\mu$ mol/kg em ensaio peritonite induzida por zymosan A (6 animais). (T + C = Talidomida + Celecoxibe administrados concomitante na dose de 50  $\mu$ mol/kg, por via oral). Os dados representam a média e o erro padrão da média (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  no teste de ANOVA “One Way” seguido do teste de Dunnet).

De posse dos resultados nos ensaios farmacológicos de nociceção e inflamação aguda foi possível identificar o protótipo mais ativo da série de *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, o LASSBio-1181. Para confirmar o potencial antiinflamatório de LASSBio-1181, identificado em modelos de inflamação aguda, o mesmo foi selecionado para estudo em modelo de inflamação crônica, a exemplo do modelo de síndrome da artrite experimental em ratos. É possível observar na **Figura 9** que os animais controle não apresentaram nenhuma alteração na pata, no entanto os animais que receberam o adjuvante completo tiveram a instalação da síndrome com intenso edema e eritema. Os resultados apresentados na **Figura 10** mostram que o LASSBio-1181 induziu inibição estatisticamente significativa do edema da pata em vários dias de tratamento, bem como o fármaco padrão, a talidomida.

A Artrite Reumatóide é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, de natureza auto-imune, com etiologia desconhecida, caracterizada por intensa inflamação com concomitante destruição da cartilagem e do osso (SWELL & TRENTHAM, 1993). Sabe-se que muitas citocinas tais como  $IFN\gamma$ , IL-2,  $TNF\alpha$ , e IL-1 são mediadores da imunidade e atividade pró-inflamatória que assumem papel importante no desenvolvimento da Artrite Reumatóide (FELDMANN, BRENNAN & MAINI, 1996). Mediadores inflamatórios como os derivados do ácido araquidônico também participam do desenvolvimento desta patologia (RANG *et al.*, 2007). Neste trabalho, foi possível identificar o LASSBio-1181, como sendo ativo no modelo de artrite experimental, o que representa uma importante descoberta para esta nova série.



**Figura 9** - Pata do animal normal e animal artrítico após 14 dias de indução da síndrome, → eritema e edema na pata direita do animal artrítico causados pela administração do adjuvante completo de Freud's.



**Figura 10-** Efeito do LASSBio-1181 e da talidomida administrados por via oral no ensaio de indução de síndrome de artrite experimental (100  $\mu\text{mol/kg}$ ,) (8 animais). Os dados representam a média e o erro padrão da média (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Por fim, para avaliar o possível efeito central dos novos derivados NAH-pirazínicos os compostos foram estudados no ensaio de placa quente. O ensaio de placa quente é usado para avaliação de dor central (MARCHIORO *et al.*, 2005) no nível supra-espinal (WONG *et al.*, 1994). Nesse modelo nenhuma das substâncias apresentou aumento do tempo de latência, com exceção da morfina, o fármaco padrão utilizado neste ensaio. Neste sentido, como evidenciado nos resultados ilustrados na Tabela 1, os derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos não apresentaram efeitos inibitórios ao contrário do fármaco de referência morfina.

A morfina é um potente analgésico de ação central que produz um efeito inibitório da resposta antinociceptiva no ensaio de placa quente. Nesse ensaio, o calor induz um efeito

termonociceptivo cutâneo originário da estimulação de fibras do tipo C não-mielinizadas (FONTENELE *et al.*, 1996). Embora o ensaio de placa quente seja comumente utilizado para avaliar analgésicos narcóticos, outras drogas incluindo relaxantes musculares, sedativo e psicomiméticos também mostram atividade neste ensaio (ABBOU & MELZACK, 1982; FRANZOTTI *et al.*, 2000). Em contraste com os efeitos inibitórios de nocicepção central da morfina, AINEs de modo geral não demonstram efeitos inibitórios significantes na nocicepção térmica (**Tabela 1**). A ausência de atividade antinociceptiva central encontrada para os derivados NAH pirazínicos e seu protótipo LASSBio-1018, sugerem um perfil de ação mais próximo aos AINEs.

**Tabela 1** – Efeito da série *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos, talidomida, celecoxibe e do protótipo LASSBio-1018 na dose de 100 µmol/Kg administrados por via oral, no ensaio de placa quente (6 animais). A morfina foi administrada na dose de 15 µmol/kg, por via i.p. Tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa.

Substância	Pré-tratamento	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150
Controle	6,1 ± 0,55	4,91 ± 0,45	5,88 ± 0,83	5,6 ± 0,53	5,05 ± 0,4
Morfina	6,95 ± 0,40	12,8 ± 0,40*	10,3 ± 0,80*	9,70 ± 0,70*	9,70 ± 0,95*
Talidomida	4,4 ± 0,47	4,83 ± 0,68	7,54 ± 1,07*	6,8 ± 0,93	5,87 ± 0,64
Celecoxibe	4,05 ± 0,30	5,47 ± 0,55	5,66 ± 0,86	4,44 ± 0,70	3,76 ± 0,80
T + C #	3,12 ± 0,36	4,08 ± 0,27	6,87 ± 0,7	5,42 ± 1,34	2,93 ± 0,41
LASSBio-1018	3,33 ± 0,97	4,60 ± 0,76	4,97 ± 1,07	5,42 ± 0,81	4,29 ± 0,44
LASSBio-1180	3,29 ± 0,51	2,36 ± 0,54	3,01 ± 0,61	4,40 ± 0,72	3,17 ± 0,69
LASSBio-1181	3,88 ± 0,56	4,05 ± 0,93	4,81 ± 0,93	4,27 ± 0,63	5,33 ± 1,02
LASSBio-1182	6,17 ± 0,80	2,65 ± 0,66	3,17 ± 0,66	3,45 ± 0,91	4,38 ± 0,72
LASSBio-1183	3,08 ± 0,44	1,96 ± 0,97	4,04 ± 1,20	1,96 ± 0,37	4,71 ± 0,60
LASSBio-1184	3,75 ± 0,77	4,81 ± 1,02	4,19 ± 0,95	6,28 ± 1,12	3,84 ± 0,80
LASSBio-1185	2,96 ± 0,64	3,12 ± 0,46	3,39 ± 0,66	5,32 ± 0,94	3,99 ± 0,68
LASSBio-1186	4,73 ± 0,63	3,99 ± 1,14	5,21 ± 0,43	6,41 ± 1,34	5,21 ± 1,24
LASSBio-1187	3,11 ± 0,48	2,76 ± 0,678	3,36 ± 0,90	3,41 ± 0,38	5,43 ± 1,54
LASSBio-1188	3,01 ± 0,31	2,49 ± 0,88	3,48 ± 0,64	6,23 ± 1,23	4,23 ± 1,17
LASSBio-1189	4,07 ± 0,29	3,48 ± 0,33	3,23 ± 0,63	5,42 ± 0,72	4,47 ± 0,85
LASSBio-1190	3,39 ± 0,67	2,84 ± 0,94	3,48 ± 0,84	4,37 ± 0,69	4,54 ± 1,13
LASSBio-1191	2,78 ± 0,49	2,75 ± 0,476	3,48 ± 0,84	4,04 ± 0,66	4,54 ± 1,13
LASSBio-1192	4,43 ± 0,80	3,73 ± 0,99	6,24 ± 0,76	5,62 ± 1,32	6,58 ± 1,76
LASSBio-1193	3,94 ± 0,64	3,15 ± 0,92	3,87 ± 0,53	2,45 ± 0,69	3,99 ± 0,54
LASSBio-1194	2,95 ± 0,78	3,16 ± 0,56	5,44 ± 1,11	4,95 ± 1,13	4,90 ± 1,20
LASSBio-1243	6,75 ± 1,36	4,37 ± 1,14	4,23 ± 1,31	3,99 ± 0,63	5,15 ± 0,68
LASSBio-1244	5,31 ± 0,84	3,35 ± 0,64	4,67 ± 0,76	5,19 ± 0,82	4,65 ± 1,17
LASSBio-1256	3,95 ± 0,67	4,38 ± 1,61	4,90 ± 1,05	6,00 ± 0,98	3,52 ± 1,13
LASSBio-1257	5,53 ± 1,05	4,70 ± 1,33	4,70 ± 1,16	5,27 ± 1,27	6,51 ± 1,32
LASSBio-1269	3,34 ± 0,69	2,44 ± 1,00	4,35 ± 1,08	4,50 ± 0,81	2,97 ± 0,65
LASSBio-1270	6,09 ± 0,73	4,65 ± 0,95	5,39 ± 0,84	4,83 ± 0,81	3,08 ± 0,70

\*p<0.05 (ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

#(T + C = Talidomida + Celecoxibe administrados concomitante na dose de 50 µmol/kg, por via oral)

De um modo geral, a série de derivados NAH-pirazínicos estudados podem ser agrupados em 6 grupos de acordo com a natureza do grupo ligado a função imina (N=CH), a saber: 1) NAH-pirazínicos com substituintes oxigenados (*e.g.* LASSBio-1180 a LASSBio-1187); 2) NAH contendo o núcleo cromona (*e.g.* LASSBio-1181 e LASSBio-1256); 3) NAH-pirazínicas com substituintes básicos (*e.g.*; LASSBio-1189 e LASSBio-1269); 4) NAH com grupos elétrons-retiradores (*e.g.* LASSBio-1193 e LASSBio-1194); 5) NAH com substituintes elétrons-doadores (*e.g.* LASSBio-1244 e LASSBio-1270); NAH aromática não substituídas (*e.g.* LASSBio-1190, LASSBio-1191 e LASSBio-1192).

Quando comparado o perfil de atividade encontrado para as NAH-hidrazonas do grupo 6, observa-se que o aumento da lipofilicidade, alcançado mediante o aumento do número de elétrons  $\pi$  nos derivados contendo a fenila (6 elétrons  $\pi$ ; LASSBio-1243), bifenila (12 elétrons  $\pi$ ; LASSBio-1191), naftila (10 elétrons  $\pi$ ; LASSBio-1190) resulta num aumento da atividade biológica. Entretanto, este aumento não é linear e a troca do anel fenila por um sistema antraceno (14 elétrons  $\pi$ ; LASSBio-1192), resulta em decréscimo da atividade. Este fato pode ser decorrente de um eventual efeito estérico impossibilitando ou prejudicando o reconhecimento de LASSBio-1192 por seu biorreceptor hipotético, haja vista, que para este derivado observa-se o aumento simultâneo da lipofilicidade e do volume molecular, quando comparado aos demais compostos do grupo 6.

A análise comparativa dos resultados obtidos com as NAH pertencentes aos grupos 4 e 5, indica que para a atividade anti-edematogênica é positivamente influenciada por grupos elétron-retiradores ligados ao anel fenila da função imina (N=CH), sendo a substituição com o grupo trifluorometila (CF<sub>3</sub>) mais favorável que a substituição pelo grupo nitro (NO<sub>2</sub>). Este achado pode ser em parte explicado pela maior contribuição à lipossolubilidade do grupo CF<sub>3</sub> quando comparado ao NO<sub>2</sub>. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o perfil de atividade antinociceptiva periférica dos derivados

NAH dos grupos 4 e 5, sugerindo que para esta atividade em particular haja uma contribuição equivalente para grupos doadores e retiradores de elétrons.

Para os derivados NAH do grupo 3 observa-se que a presença do substituinte de natureza básica ligada a função imina (N=CH), representado pelos anéis 2-piridina e 4-piridina contribuem favoravelmente para a atividade antinociceptiva, sendo prejudiciais a atividade antiedematogênica nas condições de *screening* utilizadas neste trabalho.

Os derivados contendo o núcleo cromona (LASSBio-1188 e LASSBio-1256), pertencente ao grupo 2, apresentaram elevada percentual de inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético e da segunda fase da hipernocicepção induzida pela formalina. Estes resultados revelam a importância da subunidade cromona na ação antinociceptiva de LASSBio-1188 e LASSBio-1256. Esta subunidade contribui, ainda, de forma significativa para a atividade antiedematogênica de LASSBio-1188 e perda de atividade antiinflamatória no modelo de edema para LASSBio-1256 pode ser atribuída a troca do anel pirazina de LASSBio-1188 pela unidade 3,4,5-trimetoxifenila em LASSBio-1256, indicando o caráter farmacofórico da unidade heteroaromática (*i.e.* pirazina).

Finalmente, a análise dos resultados farmacológicos encontrados com os derivados NAH do grupo 1, mais numerosos dentre a série estudada, revelam que dentre os compostos oxigenados – através da presença de grupos hidroxilas e/ou metoxilas – LASSBio-1181, contendo a unidade 3,4,5-trimetoxifenila ligada a função imina (N=CH) do grupo NAH, foi o mais promissor como candidato a protótipo de AINEs. Este resultado, que demonstra a maior atividade do derivado trimetoxilado, quando comparado aos análogos dimetoxilado (LASSBio-1184), metilenodioxila (LASSBio-1180), 4-hidroxi-3-metoxila (LASSBio-1182), 3-hidroxi-4-metoxila (LASSBio-1183) ou hidroxilados nas posições *para* (LASSBio-1185 e LASSBio-1187) ou *orto* (LASSBio-1186), revela que a otimização do perfil de ação analgésica e antiinflamatório não depende da presença do grupamento

hidroxila, e considerando que metoxilas e hidroxilas são ambos grupos doadores de elétrons pode-se inferir que a maior contribuição destes grupamentos para o reconhecimento molecular com o biorreceptor hipotético dependa da capacidade em funcionar como grupo acceptor (*i.e.* metoxilas) ou acceptor/doador (*i.e.* hidroxilas) de ligações de hidrogênio, além de contribuir para o aumento da densidade eletrônica sobre o anel aromático em que encontram-se ligados, favorecendo interações hidrofóbicas com o biorreceptor. Neste contexto, LASSBio-1181 destaca-se por apresentar três grupos metoxilas que potencializam as contribuições hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com o biorreceptor.

Contudo, ressalta-se que a relação estrutura-atividade (SAR) traçada no contexto desta dissertação é preliminar, haja vista que se encontra baseada em resultados de percentual de inibição e não na potência relativa dos compostos testados *in vivo* por via oral. Ademais, ressalta-se que o estabelecimento da SAR com base em dados biológicos gerados a partir de ensaios *in vivo* está sempre sujeito a interferência/influência de efeitos farmacocinéticos e, portanto, deve ser traçado e utilizado com cautela.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. Conclusões

Como evidenciado nos modelos utilizados para a realização deste trabalho, a série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) pirazínicos é capaz de modular a resposta antinociceptiva e antiinflamatória aguda e crônica, podendo servir como protótipos de fármacos antinociceptivos e/ou antiinflamatórios totalmente originais e inéditos. Dos 21 compostos da série, o LASSBio-1181 foi o mais ativo nos modelos aqui apresentados. Este composto também se mostrou bastante promissor em modelo de inflamação crônica de maneira que este derivado pode representar um importante modelo molecular para o desenho de novos candidatos a fármacos antiinflamatórios com padrão molecular original.

## **7. PERSPECTIVAS**

## 7. Perspectivas

- ✚ Dosagem de TNF- $\alpha$  em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimulados com LPS
- ✚ Dosagem de NO em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimulados com LPS
- ✚ Avaliação antitumoral em diferentes linhagens tumorais

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. Referências Bibliográficas

ABBOU, F.V.; MELZACK, R. Brainstem lesions dissociated neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. **Brain Res.**, v. 251, p. 149-155, 1982.

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. **J. Photochem. Photobiol. B.**, 74: 101- 107, 2004.

AL-CHAER, E.D.; TRAUB, R.J. Biological basis of visceral pain: recent developments. **Pain**, v.96, p. 221-225, 2002.

ALMANSÁ, C.; DE ARRIBA, A.F.; CAVALCANTI, F.L.; GÓMEZ, L.A.; MIRALLES, A.; MERLOS, M.; GARCÍA-RAFANELL, J.; FORN, J. Synthesis and SAR of new series of COX-2-selective inhibitors: pyrazolo[1,5- $\alpha$ ]pyrimidines. **J. Med. Chem.**, Feb 1;44(3):350-61, 2001.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 30, p. 11165-11169, 2004.

BÁRBARA, G.; STANGHELLINI, V.; DE GIORGIO, R.; CREMON, C.; COTTRELL, G.S.; SANTINI, D.; PASQUINELLI, G.; MORSELLI-LABATE, A.M.; GRADY, E.F.;

BUNNETT, N.M.; COLLINS, S.M.; CORINALDESI, R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 126, p. 693-702, 2004.

BARREIRO, E.J.; MANSOUR, C.A.F. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2008.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, n. 7/9, p. 58-60, 2005.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.** 67: 67-186, 1987.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.

BEVAN, S. & GEPPETTI, P. Protons stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. **Trends Neurol. Sci.**, 17:509–512, 1994.

BINDER, D.; HROMATKA, O.; GEISLER, F.; SCHIMIED, K.; NOE, C.R.; BURRI, K.; PFISTER, R.; STRUB, K.; ZELLER, P. Analogs and derivatives of tenoxicam: 1. Synthesis and antiinflammatory activities of analogs with different residues on the ring nitrogen and the amide nitrogen. **J. Med. Chem.**, 30:687-682, 1987.

BONFÁ, L.; VINAGRE, R.C.O.; FIGUEIREDO, N.V. Uso de Canabinóides na Dor Crônica e em Cuidados Paliativos. **Rev. Bra. Anesthesiol**, v. 58, n. 3, p. 267-279, mai./jun. 2008.

BOURA, A.L.; SVOLMANIS, A.P. Converting enzyme inhibition in the rat by captopril is accompanied by potentiation of carrageenin-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol**, 82(1): 3-8, 1984.

BRUM-JÚNIOR, L. Metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas. Santa Maria, **Dissertação de Mestrado de Ciências Farmacêuticas** – Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87: 1-5, 2000.

CAPETOLA, R.J.; SHRIVER, D.A.; ROSENTHALE, M.E. Suprofen, a new peripheral analgesic. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 214, n. 1, p. 16-23, 1980.

CARDOZO-PEREIRA, A.L.; BOLZANI, F.C.B.; STEFANI, M.; CHAR, R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Méd. Cut. Ibero-Latino-Americana**, v. 35, n. 1, p. 35-50, 2007.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**. 353. 2051 -2058, 1999.

CATERINA, M.J.; SHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, W.J.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the vanilloid receptor. **Science**, v. 288, p.306, 313, 2000.

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., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 99(21):13926-31, 2002.

CHEN, CC; AKOPIAN, AN; SIVILOTTI, L; COLQUHOUN, D; BURNSTOCK, G; WOOD, JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, 377:428–431, 1995.

COOLIER, H. O. J., DINNEN, L. C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in mice. **Br. J. Pharmacol.** 32: 285 – 310, 1968.

CHANDRASSOMA, P.; TAYLOR, C. **Patologia Básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil: p.31-41, 1993.

CHRISTOPHERSON, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells**, 19:388-396, 2001.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Contran, RS; Kumam, V; Collins, T. **Robbins pathologic disease**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

CONTRAN, R.M; KUNAR, T; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**, 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

DAMIANI, D.; KUPERMAN, H. DICHTCHEKENIAN, V.; MANNA, T.D.; SETIAN, N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo–benefício. **Pediatria**, n. 1, p. 71-82, 2001.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S.A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A.J.; PUGH, P.L; ROGERS, D.C; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183-187, 2000.

DERARDT, R.; JOUGNEY, S.; BENZONI, J.; PETERFALVI, M. Release of prostaglandins e and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Eur. J. Pharmacol.** , 61, 17–24, 1980.

DEWICK, P. M.; **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, John Wiley & Sons: New York, 1997.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S.N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidente and propertiers in relation to the other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res. Rev.**, v.46, p.131-145, 2004.

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 E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-789, 1985.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 15:190-197, 1994.

DUARTE, C.D.; TRIBUTINO, J. L. M.; LACERDA, D.L.; MARTINS, M.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; DUTRA, F.; BECHARA, E.J.H.; DE-PAULA, F.S.; GOULART, M.O. F.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J.B.; NUNES, M.P.; BERTHO, A. L.; MIRANDA, A.L.P.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C. A.M. Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors. **Bioorg. Med. Chem.**, 15, 2421–2433, 2007.

DUARTE, I.D.G; FERREIRA-ALVES, D.L; VELOSO, D.P; NAKAMURA-CRAIG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **J. Ethnopharmacol.**, 55, 13–18, 1996.

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. **J. Ethnopharmacol.** , 48, 77–83, 1995.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.** 14:397–440, 1996.

FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **Br. J. Pharmacol.** 49, 86–97, 1973.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 787-794, 2004.

FONTENELE, J.B.; VIANA, G.S.B.; XAVIER-FILHO, J.; ALENCAR, J.W. Antiinflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 643-646, 1996.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.; RODRIGUES, H.M.; MOURÃO, R.H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **J. Ethnopharmacol.** , v. 72, p. 273-277, 2000.

FRIEDMAN, H.L. Influence of isosteric replacements upon biological activity. **Symposium on chemical-biological correlation.** National Research Council Publication n° 206, Washington, DC, p.295-395, 1951.

GALLI, S.J. New concepts about the mast cell. **N. Engl. J. Med.**, v, 328, p, 257-265, 1993.

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 J.**, 14: 2525-2531, 2000.

GERSZTEN, R.E., GARCIA-ZEPEDA, E.A., LIM, Y.C., YOSHIDA, M., DING, H.A., GIMBRONE, M.A.JR., LUSTER, A.D., LUSCINSKAS, F.W., ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, 398: 718-723, 1999.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 1, p. 4-15, 2006.

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

KENNEDY, T.A.; SMITH, C.J.; MARNETT, L.J. Investigation of the role of cysteines in catalysis by prostaglandin endoperoxide synthase. **J. Biol. Chem.** 269, 27357-27364, 1994.

KESSLER, F; HABELT, C; AVERBECK, B; REEH, PW; KRESS, M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. **Pain**, 83:289-295, 1999.

KOPLAS, P.A.; ROSENBERG, R.L.; OXFORD, G.S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci**, v. 17, p. 3525-3537, 1997.

KRAYCHETE, D.C.; GUIMARÃES, A.C. Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach. *Rev. Bras. Anesthesiol.* v. 53, p. 833-853, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças. 7ª ed. São Paulo: Elsevier; 2005.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios Não-Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KURASHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATO H, M.; TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. **Brain Res.**, 273: 245-252, 1983.

IADAROLA, M.J.; CLAUDE, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, 278; 239-240, 1997.

LAIRD, J.M.A.; OLIVAR, T.; ROZA, C.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.P.; CERVERO, F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. **J. Neurosci.**, v.98, p. 345-352, 2000.

LANGMUIR, I. Isomorphism, isoterism and covalence. **J. Am. Chem. Soc.**, 41:1543-1559, 1919.

LEITE, D. F.P.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **J. L. Biol**, v. 82, p. 630-637, 2007.

LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. **Inflammatory pain**. In: Wall PD, Melzack R- Textbook of pain. 3<sup>rd</sup>. Ed, Edin-burgh, Churchill Livingtone, pp. 45-56, 1994.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: an useful strategy for modification molecular and drug design. **Curr. Med. Chem**, 12:23-49, 2005.

LIMA, L.M. *et al.*, **Resumo da 30<sup>a</sup>RASBQ**, Águas de Lindóia, SP, 2007.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. ; MIRANDA, A.L.P.; ROMEIRO, N.C.; MONGE, A. Uso de compostos quinoxalínicos acilidrazônicos e composições farmacêuticas contendo os mesmos, no tratamento de quadros inflamatórios, dor aguda e crônica. **Patente: Privilégio de Inovação nº PI0705051-8**, 2007.

LINGUEGLIA, E; DE WEILLE, JR; BASSILANA, F; HEURTEAUX, C; SAKAI, H; WALDMANN, R; LAZDUNSKI, MA. Modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglia cells. **J. Biol. Chem.**, 272:29778–29783, 1997.

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

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

MARQUES, J.O. Dor: diagnóstico e tratamento. **Bases da Anatomia e Fisiopatologia**. São Paulo: Âmbito Editora, v.1, n.1, abr/mai/jun, 2004.

MARTINDALE, J.; BLAND-WARD, P.A.; CHESSELL, I.P. Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. **Neuro.**, 316, 33–36, 2001.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57:1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 569: 1-120, 2002.

MARCHIORO, M., BLANK MDE, F., MOURAO, R.H., ANTONIOLLI, A.R., Antinociceptive activity of aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia** 76, 637–642, 2005.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R; COFFMAN, R.L O Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, 19: 683-765, 2001.

MORIYAMA, T.; LIDA, T.; KOBAYASHI, K.; HIGASHI, T.; FUKUOKA, T.; TSUMURA, H. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. **J. Neurosci**, v. 9, p. 6058-6062, 2003.

MORRIS, R.; CHEUNSUANG, O.; STEWART, A.; MAXWELL, D. Spinal dorsal horn neuron target for nociceptive primary afferents: do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level. **Brain Res. Rev**, v. 46, p. 173-190, 2004.

MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Autacóides e fator de ativação das plaquetas. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap. 26, p. 503-516, 2007.

NESS, T.J.; GERBATH, G.F. Visceral pain: a review of experimental studies. **Pain**, v.41, p.167-234, 1990.

OLIVEIRA, E.R. A dor e controle do sofrimento. **Rev. Psicofisiol.**, v.1, n.2. 1997.

ONG, C.K.S.; LIRK, P.; TAN, C.H.; SEYMOUR, R.A. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Clin. Med. & Res.**, v. 5, n. 1, p. 19-34, 1997.

OMOTO, A.; YUTAKA, K.; PRUDOVSKY, I.; TUBOUCHI, Y.; KIMURA, M.; ISHINO, H.; WADA, M.; YOSHIDA, M.; KOHNO, M.; YOSHIMURA, R.; YOSHIKAWA, T.; SANO, H. Copper chelation with tetrathiomolybdate suppresses adjuvant-induced arthritis and inflammation-associated cachexia in rats. **Arthri. Res. Ther.**, 7:R1174-R1182, 2005.

PORTO, C.C. **Exame clínico: Bases para a prática médica**. 5º edição. Rio de Janeiro: Ed Guanabara, 37-40, 2004.

RAMADABRAN , K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmacol. Res.**, 3: 263-269, 1996.

RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**, 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

RIBEIRO, I. G.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C.; MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A.M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-*a*]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, 33: 225, 1998.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A.P.; SCHMIDT, S.R.G. O Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica Não Oncológica: O Papel da Metadona. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, n. 5, p. 644 – 651, 2002.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUNAR, K. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostagl. Other Lip. Med.** 57(2-3):119-31, 1999.

SANTOS, J.L.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; OLIVEIRA, H.P.; BUELONI, R.H.; BOFFO, E.; MACHADO, R.G.P.; LONGO, M.C.; CHUNG, M.C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. **Rev. Cienc. Farm. Básica. Apli.** v.28, n. 2, p. 235-240, 2007.

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. **Arch. Dermatol. Res.**, 291:400-404, 1999.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap. 60, p. 1241-1262, 2007.

SENGUPTA, J.N.; GERBARTH, G.F. Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of rat. **J. neurophysiol.** V.71, p. 2046-2060, 1994.

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. **J. Exp. Med.**, 196(8):1025-37, 2002.

SWELL, K.L; TRENTAM, D.E. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Lancet**, 341, 283–286, 1993.

SHIBATA, M; OHKUBO, T; TAKAHASHI, H; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38, 347–352, 1989.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi p.238; 2000.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, v.51, p. 159-212, 1999.

TRACEY, D.J.; WALKER, J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm. Res.**, v. 44, p.407-411, 1995.

THEOHARIDES, T.C.; PANG, X.; LETOURNEAU, R.; SANT, G.R. Interstitial cystitis: a neuroimmunoendocrine disorders. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 840, p. 619-634, 1998.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ Res.**; 11: 877-887, 2001.

TJOLSEN, A; BERGE, OG; HUNSKAAR, S; ROSLAND, JH; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51, 5–17, 1992.

TOMINAGA, M; CATERINA, MJ; MALMBERG, AB; ROSE, TA; GILBERT, H; SKINNER, K; RAUMANN, BE; BASBAUM, AI; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, 21:531–543, 1998.

TORREGROSA, S. Mecanismos y vias del dolor. **B. Es. Med.**, v23, 1994.

TURNBULL, C.M.; CENA, C.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; ROSSI, A.G.; MEGSON, I.L. Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivatives of aspirin in human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, p. 517-526, 2006.

UNDAS, A.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.E.; MANN, G.K. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2285-2292, 2007.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. COX-2 inhibitors: background knowledge for clinical use. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 38, 97–120, 1998.

VASKO, MR; CAMPBELL, WB; WAITE, KJ. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **J. Neurosci.**, 14:4987–4997, 1994.

ZIMMERMAN, M., Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16, 109-10, 1983.

WONG, C.H., DAY, P., YARMUSH, J., WU, W., ZBUZEK, U.K. Nifedipine-induced analgesia after epidural injections in rats. **Anesth. Analg.**, 79, 303–306, 1994.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; **Quim. Nova**, 24, 147, 2001.