

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

MAX DENISSON MAURÍCIO VIANA

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE DERIVADO SINTÉTICO

MACEIÓ

2019

MAX DENISSON MAURÍCIO VIANA

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE DERIVADO SINTÉTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

MACEIÓ

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

V614a Viana, Max Denisson Maurício.
 Atividade imunomoduladora de derivados sintéticos / Max Denisson
Maurício Viana. – 2019.
 116 f.

 Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.
 Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

 Inclui bibliografias.
 Apêndices: f. 114-115.
 Anexo: f. 116.

 1. Analgésicos. 2. Ensaio de seleção de medicamentos
antitumorais. 3. Imunomodulação. 4. Talidomida. 5. Glioblastoma. I.
 Título.

CDU: 616-006



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, s/n
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Max Denisson Maurício Viana

Atividade imunomoduladora de derivados sintéticos

Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Alagoas e aprovada em 4
de Abril de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eliane Aparecida Campesatto – (UFAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Yolanda Karla Cupertino Silva – (CESMAC - Sertão)

*Aos meus pais: Márcia Duarte e Hegel Viana
por todo apoio, paciência, investimento
e confiança.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela minha vida, por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, e enfim concluir esse mais alto objetivo;

A meus pais, **Hegel Viana e Márcia Duarte**, meus irmãos e a toda minha família, eu os agradeço de modo especial, pois me ensinaram além de valores, a superação e a garra na luta pela vida. Ensinaram-me a não desistir nunca apesar das dificuldades. O incentivo e a compreensão de vocês foram fundamentais para conclusão deste desafio;

A minha noiva **Alyne Almeida**, pela paciência e compreensão nos momentos de estresse ou ausência; por vir em cada momento difícil com a palavra certa de conforto e força. Você transformou a estrada sinuosa num percurso mais fácil de seguir e agradecer a você é imensuravelmente impossível em papel, mas possível pela partilha dia após dia;

A minha orientadora: **Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira**, por me acolher não só como aluno, mas como filho. Agradeço a confiança, todos os ensinamentos profissionais e pessoais que proporcionaram meu crescimento acima de tudo como ser humano;

À **Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto**, que me conferiu a primeira oportunidade e que desde então me firmei neste propósito. Agradeço pelas palavras de coragem e cuidado, e serei eternamente grato pelos ensinamentos profissionais e maternos;

À **Profa Dra. Lídia Moreira Lima**, por acreditar na minha capacidade, propor novos experimentos, pela disposição e contribuições ao trabalho e por me proporcionar trabalhar com a LASSBio-596;

Às **Profas. Dra. Eliane Campesatto e Maria Danielma** e ao **Prof Dr. Ênio Bassi**, pelas considerações na qualificação que ajudaram no aperfeiçoamento deste trabalho;

Agradeço à toda família que compõe o Laboratório de Farmacologia e Imunidade, especialmente àqueles que me ajudaram na execução dos experimentos: **Geraldo, Anderson, Suellen, Pedro, Camila, Raphael, Ingrid, Jerusa, Monike, Iara, Zeca e Morgana**, não conseguiria chegar ao final sem a contribuição de cada um de vocês.

A minha grande família: **Juliete, Artur, Rafael, Carla, Jussara, Izabella, Stefanie, Kwesten Heiner, Hugo e Nilson**, por todos esses longos anos de amizade, e que, embora geograficamente distantes, revelaram-se sempre presentes. compreendendo os momentos de ausência, mas acima de tudo compartilhando bons momentos que tornaram o fardo mais leve;

Faço questão de agradecer de coração a todos que há muito tempo torceram ou intercederam por mim: **André, Natália, Ayron, Renato, Aryel, Danilo, Priscilla, Carol, Luiz, Alice**, pois conhecem cada passo dado e fazem parte dessa trajetória. Parafraseando Vinícius de Moraes: **“Você não faz amigos, você os reconhece”**;

A toda equipe do Biotério Central da UFAL pelo zelo com os animais que foram utilizados nesta pesquisa;

Aos funcionários da Universidade Federal de Alagoas, em especial à técnica da histologia **Fátima**;

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

Muito obrigado!

*“Não é sobre chegar
No topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...”*

(Ana Vilela)

RESUMO

O sistema imunológico consiste numa organização complexa e articulada que mantém a homeostase modulando a resposta imune quando necessário, estimulando ou suprimindo uma resposta. O desenvolvimento de novos imunomoduladores se faz necessário, pois o planejamento racional proporciona novas terapêuticas, visando maior seletividade e menores efeitos adversos, os quais são fatores limitantes de algumas terapias. Dentro dessa perspectiva, o LASSBio-596, híbrido estrutural da talidomida, sildenafil e arilsulfonamida, racionalmente planejado como imunomodulador, é descrito na literatura com atividades antiangiogênica e anti-inflamatória pulmonar. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades anti-inflamatórias aguda e crônica, antinociceptiva e antitumoral do LASSBio-596 visando o desenvolvimento de um derivado potencial candidato a fármaco. **Capítulo I: LASSBio-596, novo híbrido da talidomida, induz efeitos antinociceptivos e antireumáticos em camundongos:** Nos testes de nocicepção, o tratamento com LASSBio-596 inibiu: a resposta às contorções em 39,9%; os tempos de lambida no ensaio de formalina em 25,7% (1ª fase) e 23,9% (2ª fase); bem como na nocicepção induzida por glutamato (31,9%); além de aumentar estatisticamente a latência à dor no ensaio da placa quente. No modelo de inflamação aguda de peritonite induzida por zymosan, o recrutamento leucocitário foi reduzido em 39,9% pós-tratamento com LASSBio-596. Na inflamação crônica no ensaio de artrite induzida por adjuvante de Freund, o tratamento com LASSBio-596 reduziu o volume do edema da pata a partir do primeiro dia de tratamento regredindo até o último. Além disso, reduziu os níveis séricos de IL-17A, IFN- γ e TNF- α em 79,0%, 55,4% e 67,1%, respectivamente. Não foram observados danos hepáticos ou renais, ao passo em que a celularidade e matriz extracelular das patas foram melhores preservadas nos camundongos tratados com LASSBio-596 do que com talidomida. Nenhum comprometimento motor foi observado no teste de performance motora. Os dados demonstraram o efeito antinociceptivo do LASSBio-596 e reforçam sua propriedade anti-inflamatória no modelo de doença crônica autoimune, o qual amplifica o potencial terapêutico desta molécula. **Capítulo II - Potencial terapêutico *in vitro* do híbrido da talidomida, LASSBio-596, no glioblastoma:** No presente estudo, o LASSBio-596, racionalmente projetado como um híbrido da talidomida, foi testado em ensaios *in vitro* para avaliar sua atividade no crescimento tumoral, representando um importante achado sobre os efeitos antitumorais desse análogo em tumores sólidos. No ensaio de viabilidade para MTT, o LASSBio-596 reduziu significativamente a viabilidade celular em todos os tempos testados, cujo efeito máximo foi encontrado na concentração de 100 μ M com maior atividade após 72h de tratamento, reduzindo a atividade metabólica mitocondrial em $52,2 \pm 1,2\%$. Os dados preliminares indicaram uma citotoxicidade importante deste análogo da talidomida em células de glioblastoma, de modo que outros testes são necessários no sentido de otimizar a molécula testada frente ao seu potencial terapêutico. No ensaio de PBMC a viabilidade também foi reduzida com os mesmos tratamentos, no entanto LASSBio-596 induziu uma toxicidade três vezes menor em comparação com a talidomida, e duas vezes menor do que a TMZ. Considerando que o efeito máximo para LASSBio-596 também foi estatisticamente menor que TMZ e talidomida em PBMC, demonstrando de fato que este híbrido exibiu uma maior seletividade na inibição de células tumorais do que PBMC. Apesar destes resultados preliminares, outros estudos *in vitro* são necessários para comprovação do mecanismo de ação deste composto, bem como a avaliação em modelos animais, a fim de confirmar o potencial do LASSBio-596 no tratamento do glioblastoma. Diante dos resultados é possível concluir que o derivado da talidomida LASSBio-596 induziu efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos *in vivo*, bem como reduziu a viabilidade celular de GBM02 em modelos *in vitro* com menor seletividade para leucócitos no mesmo modelo.

Palavras-chave: Analgésicos. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais. Imunomodulação. Talidomida. Glioblastoma.

ABSTRACT

The immune system consists of a complex, articulated organization which maintains homeostasis modulating the immune response when necessary, stimulating or suppressing a response mediated by microorganisms, plants and/ or synthetic derivatives. The development of small immunomodulatory molecules is necessary because rational planning provides new therapeutics, aiming for greater selectivity and lower adverse effects, which are limiting factors of some therapies. From this perspective, LASSBio-596, a structural hybrid of thalidomide, sildenafil, and arylsulfonamide, which was rationally designed as an immunomodulator, is described in the literature with antiangiogenic and anti-inflammatory activities. In this sense, the present study aimed to evaluate in experimental models the antinociceptive, acute and chronic anti-inflammatory and antitumoral activities for glioblastoma, of LASSBio-596 aiming at the development of a potential candidate drug prototype. **Chapter I. LASSBio-596, new thalidomide hybrid, induces antinociceptive and antirheumatic effects on mice:** In the nociception tests, LASSBio-596 treatment inhibited: the response to writhing in 39.9%; the lick times in the formalin test at 25.7% (1st stage) and 23.9% (2nd phase); as well as in glutamate-induced nociception (31.9%); in addition to statistically increasing pain latency in the hot plate assay. In the acute inflammation model of zymosan-induced peritonitis, leukocyte recruitment was reduced by 39.9% post-treatment with LASSBio-596. In chronic inflammation induced by Freund's complete adjuvant, treatment with LASSBio-596 reduced the volume of paw edema from the first day of treatment regrowing until the last. In addition, it reduced serum levels of IL-17A, IFN- γ , and TNF- α by 79.0%, 55.4% and 67.1%, respectively. No hepatic or renal damage was observed, whereas cellularity and extracellular matrix of the paws were better preserved in the mice treated with LASSBio-596 than thalidomide. No motor impairment was observed in the motor performance test. The data demonstrated the antinociceptive effect of LASSBio-596 and reinforces its anti-inflammatory property in a model of chronic autoimmune disease, which amplify the therapeutic potential of this molecule. **Chapter II. *In vitro* therapeutic potential of thalidomide-hybrid, LASSBio-596, in glioblastoma:** In the current study LASSBio-596, rationally designed as a hybrid of thalidomide, was tested *in vitro* assays to assess its activity on tumor growth, representing an important findings about antitumor effects of this analogue on solid tumors. In the viability assay for MTT, LASSBio-596 significantly reduced cell viability at all times tested, whose maximum effect was found at the concentration of 100 μ M with higher activity after 72h of treatment, reducing mitochondrial metabolic activity by $52.2 \pm 1.2\%$. PBMC viability, also was reduced with the same treatments, however LASSBio-596 induced a toxicity three times lower compared to thalidomide, and two times lower than TMZ. Whereas the maximum effect for LASSBio-596 was also statistically lower than TMZ and thalidomide on PBMC demonstrating in fact this hybrid exhibited a greater selectivity in inhibiting tumor cells than PBMC. Although these preliminar promissors results, others *in vitro* studies are necessities for comprovation of mechanism of action of this compound as well the evaluation in animal models in order to confirm the potential of LASSBio-596 in the treatment of glioblastoma. In view of the results it is possible to conclude that the thalidomide derivative LASSBio-596 induced antinociceptive and anti-inflammatory effects in *in vivo* models, as well as reduced the cell viability of GBM02 in *in vitro* models with lower selectivity for leukocytes in the same model.

Keywords: Analgesics. Selection tests of antitumor drugs. Immunomodulation. Thalidomide. Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação dos tipos de dor quanto à duração e origem neurofisiológica.....	18
Figura 2 -	Esquematização fisiológica da condução do estímulo nocivo.....	20
Figura 3 -	Manifestações iniciais locais na inflamação aguda comparadas com o normal.....	23
Figura 4 -	Mecanismo de migração leucocitária para o sítio inflamatório (diapedese).....	24
Figura 5 -	Metabolismo do ácido araquidônico.....	25
Figura 6 -	Esquema representativo da última classificação de tumores gliais segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).....	30
Figura 7 -	Observação microscópica histopatológica de glioblastoma (GBM) em hematoxilina eosina (HE, 20 X).....	31
Figura 8 -	Modelo das alterações moleculares na progressão do glioblastoma (GBM) pela via de novo (primária) e via progressiva (secundária), adaptado com a inclusão do papel das mutações de isocitrato-desidrogenases 1 e 2 IDH 1 e IDH2 no desenvolvimento do tumor.....	33
Figura 9 -	Estrutura e rota de ativação do pró-fármaco temozolomida.....	36
Figura 10 -	Reparo mediado pela O6-metilguanina metiltransferase.....	37
Figura 11 -	Mecanismo de ação e resistência à temozolomida.....	37
Figura 12 -	Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)	39
Figura 13 -	Mecanismos de toxicidade gastrointestinal induzidos pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	40
Figura 14 -	Representação esquemática e simplificada do mecanismo antiangiogênico da talidomida.....	45
Figura 15 -	Enantiômeros da talidomida.....	
Figura 16 -	Modulação do monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) na resposta inflamatória.....	48
Figura 17 -	Estruturas químicas da talidomida, seu metabólito e do LASSBio-596.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
AIC	5-aminoimidazol-4-carboxamida
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
anti-PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i> , do inglês: proteína de morte celular programada tipo 1
anti-TNF	<i>Anti-tumor necrosis factor</i> , do inglês: antifatores de necrose tumoral
APNG	Alquilpurina-DNA-N-glicosilase
AR	Artrite reumatóide
ATP	Trifosfato de inositol
BER	<i>Base excision repair</i> , do inglês: reparo de excisão de base
b-FGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> , do inglês: fator de crescimento fibroblasto básico
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca ⁺²	Cálcio
CBA	<i>Cytometric bead array</i> , do inglês: matriz de esferas citométricas
CD80	<i>Cluster of differentiation</i> 80, do inglês: grupamentos de diferenciação 80
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i> , do inglês: adjuvante completo de Freund
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i> , do inglês: peptídeo relacionado com o gene da calcitonina.
Cm	Centímetro
COX	Cicloxygenase
CXCL	<i>Chemokine ligand</i> , do inglês: ligante de quimiocina
DMCD	Drogas modificadoras do curso da doença
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , do inglês: ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , do inglês: Administração de Alimentos e Fármacos

GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> , do inglês: ácido gama-aminobutírico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , do inglês: receptor do fator de crescimento epidermal
GBM	Glioblastoma
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> , do inglês: Associação Internacional para o Estudo da Dor
IDH	Isocitrato-desidrogenase
IFN- γ	Intérferon <i>gama</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> , do inglês: imunohistoquímica
IKK	Quinase I κ B
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LASSBio-596	Ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzoico
LOH10q	Perda de heterozigose no cromossomo 10q
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	Miligrama
MGMT	Metilguanina metiltransferase
min	Minuto
mL	Mililitro
MMR	<i>Mismatch repair</i> , do inglês: reparo de incompatibilidade de DNA
MTIC	5-(3-metiltriazén-1-il)imidazol-4-carboxamida
Na ⁺	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	Nuclear factor <i>kappa</i> B, do inglês: fator nuclear <i>kappa</i> B
NK	<i>Natural killers cells</i> , do inglês: células matadoras naturais.
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE	Fosfodiesterase

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , do inglês: fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
Pi	Fosfato inorgânico
PK	Proteínas quinases
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PTEN	Homólogos da fosfatase e tensina
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SBED	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
SI	Sistema imunológico
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
Tc	Linfócito T citotóxico
TGF-β	<i>Transforming growth factor</i> , do inglês: fator de crescimento transformador <i>beta</i>
TMZ	{3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-d]-[1,2,3,5]-tetrazina-8 carboxamida} ou Temozolamida
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> , do inglês: fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , do inglês: fator de crescimento endotelial vascular
v.o.	Via oral
WHO	<i>World Health Organization</i> , do inglês: Organização Mundial da Saúde
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
%	Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Dor e nocicepção.....	17
2.2 Inflamação.....	22
2.3 Glioblastoma.....	29
2.4 Imunomodulação e imunomoduladores.....	38
2.5 Talidomida.....	44
2.6 LASSBio-596: um análogo da talidomida.....	48
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 RESULTADOS.....	54
4.1 Artigo I. LASSBio-596, new thalidomide hybrid, induces antinociceptive and antirheumatic effects on mice.....	54
4.2 Artigo II. <i>In vitro</i> therapeutic potential of thalidomide-hybrid, LASSBio-596, in glioblastoma.....	79
5 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE A – Ficha de avaliação do 1º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.....	114
APÊNDICE B – Ficha de avaliação do 2º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.....	115
ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL.....	116

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico consiste numa organização complexa e articulada que mantém a homeostase modulando a resposta imune quando necessário (OGECHUKWU et al., 2011). A imunomodulação é um mecanismo no qual esse sistema pode ter sua resposta estimulada ou suprimida por uma variedade de substâncias com atividades biológicas advindas de animais, microrganismos, plantas e derivados sintéticos (BLECHA, 2001 *apud* BARROSO, 2013).

Neste sentido, estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no controle de microrganismos patogênicos, ou de doenças com outras etiologias, tais como: doenças inflamatórias, câncer e doenças autoimunes (LABRO, 2000; FISCHER et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization*) a dor se faz presente entre as principais doenças letais no mundo como no câncer (WHO, 2017). Embora tenha ocorrido um avanço na medicina para o tratamento de doenças severas, ainda existe uma grande deficiência na terapêutica no gerenciamento da dor decorrente destas doenças. Assim, a dor bem como a inflamação da qual ela pode se originar são consideradas problemas de saúde mundial e acarretam inúmeras consequências individuais, sociais e econômicas (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015).

A forma mais comum de tratamento da dor e inflamação consiste na utilização de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), ou esteroidais (AIEs), analgésicos opioides e não-opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes, entre outros (GUINDON, 2017). Porém, todos possuem alguma limitação, que vão desde uma baixa eficácia terapêutica a uma variedade de efeitos colaterais como, por exemplo: depressão respiratória e dependência causadas pelo uso de opioides; toxicidade gastrointestinal pelos AINEs; ou sonolência e tremores para os anticonvulsivantes (TINSLEY; PIAZZA, 2012; LAAR et al., 2012; HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2017).

A descoberta de novos agentes capazes de exercer modulação do sistema imune, para dor ou inflamação, tem sido bastante promissora, principalmente se o efeito imunomodulador for somado a uma ação protetora antitumoral (COSTA, 2011).

Dentre os tumores com pior prognóstico, aponta-se o glioblastoma (GBM) como o de mais rápida progressão, agressividade e mais comum entre todos os tumores cerebrais malignos primários, cuja média de sobrevida dos pacientes diagnosticados varia entre 12 e 15 meses (CHEN et al., 2012; TANAKA et al., 2013). Geneticamente heterogêneo, é relativamente menos antigênico, com resposta menor à imunoterapia do que outros tipos de câncer (ARRIETA et al., 2018).

Esse tipo de tumor induz um aumento significativo da expressão de citocinas imunossupressoras: interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento transformador *beta* (TGF- β , responsável pela supressão da produção de IL-2, e da atividade de *natural killers cells* – NK, do inglês células matadoras naturais –, além de promover o crescimento e invasão do tumor por estímulo às células-tronco e aumento da angiogênese) (FONTANA et al., 1991; ANNES; MUNGER; RIFKIN, 2003; KIRKBRIDE; BLOBE, 2003; TRITSCHLER et al., 2009; RODRIGUES, et al., 2010; JACKSON et al., 2011).

Nesse tipo de tumor existe alta expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) – pró angiogênico. Logo, a existência de uma vascularização abundante, exibido por GBM, torna-se um possível alvo de tratamento (KAUR et al., 2004).

A eficácia de quimioterápicos (QTs) é sabidamente limitada em razão da barreira hematoencefálica, heterogeneidade da massa tumoral e da ocorrência de resistência e efeitos adversos deletérios, além da baixa eficácia já descrita na literatura científica da temozolomida (TMZ) – tratamento de primeira escolha preconizado para GBM – o que desperta, portanto, a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas-alvo que possam induzir menor resistência, toxicidade seletiva, com maior eficácia e segurança (SCHNEIDER et al., 2010).

Dentre os fármacos imunossupressores, a talidomida exibe atividades anti-inflamatória e antiangiogênica, e tem sido utilizada em esquemas terapêuticos no tratamento de doenças como artrite reumatoide (AR) e GBM (MAZZOCCOLI et al., 2012; COSTA et al., 2015). No entanto, como resultado dos efeitos adversos conhecidos da talidomida (teratogenia, neuropatia periférica, sonolência e hepatotoxicidade), novos compostos derivados da talidomida, similarmente eficazes na modulação de respostas inflamatórias e com um perfil de segurança melhorado, estão sendo investigados (MELCHERT; LIST, 2007; ITO et al., 2010).

O desenvolvimento de pequenas moléculas derivadas da talidomida se configura como uma estratégia alvissareira diante da versatilidade na modulação do sistema imune já observada para o fármaco em questão. Portanto, o planejamento racional pode proporcionar novas alternativas-alvo, visando maior seletividade e menores efeitos adversos, os quais são principais fatores limitantes deste protótipo.

Logo, a procura por análogos da talidomida que apresentem atividades anti-inflamatória e/ou analgésica ou antitumoral com efeitos adversos limitados é fomentada na comunidade científica. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar os potenciais antinociceptivos, anti-inflamatórios e antitumoral do derivado LASSBio-596, híbrido da talidomida, diante da otimização estrutural de seu protótipo com sildenafil e um grupamento arilsulfonamida, como alternativa potencial de candidato a fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dor e nocicepção

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo. Ainda que esse processo normalmente funcione como uma resposta de alerta aos indivíduos, pode se tornar um sintoma debilitante como ocorre, por exemplo, com a dor (WOOLF, 2010). A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desconfortável causada por danos reais ou potenciais aos tecidos, ou descrita em função de tais danos (IASP, 2012). Esse dano tecidual pode acometer terminações nervosas de várias regiões, como em aponeuroses, articulações, órgãos, entre outras (PIRES, 2018).

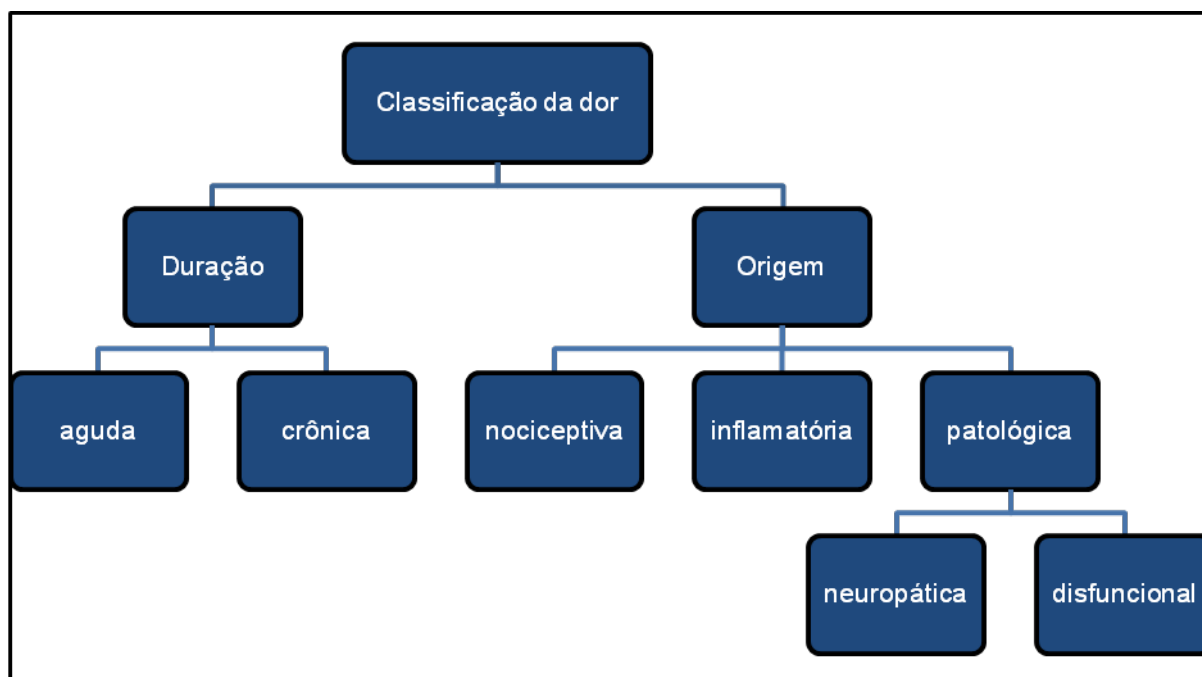
A dor é recorrente em muitas morbidades e debilita grande parcela da população. Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. Não existem dados epidemiológicos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua importância tem aumentado nos últimos anos, visto que está relacionada com elevados custos com tratamento além de promover o afastamento laboral, resultando em graves consequências psicossociais e econômicas (SBED, 2012; LOPES, 2012).

No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre dor são escassos, porém, estima-se que a prevalência de dor crônica seja de 40% na população (MENDEZ et al., 2017). O tratamento da dor crônica moderada e grave ainda representa um grande desafio, pois não existem terapias eficazes em longo prazo, com poucos efeitos colaterais e que sejam acessíveis financeiramente (GUINDON, 2017).

Existem diversas classificações para a dor, cada uma com características e mecanismos próprios. Sendo assim, ressalta-se a importância do conhecimento de cada tipo a fim de se estabelecer um controle adequado (SANTOS, 2013).

Pode-se classificar a dor quanto a sua duração: aguda ou crônica (Figura 1). A dor aguda ocorre em um curto período de tempo e desaparece quando cessa o estímulo nocivo, já a dor crônica tem como característica ser de longa duração, mais de três meses, podendo se prolongar mesmo após a recuperação da lesão inicial, impedindo o restabelecimento das funções, tornando-se, portanto, um problema para saúde do indivíduo (TRACEY; MANTYH, 2007).

Figura 1 – Classificação dos tipos de dor quanto à duração e origem neurofisiológica.



Notas: a dor pode ser dividida quanto à duração (curta, em período menor de tempo e cessa após estímulo nocivo; e longa, podendo durar meses, prolongando-se mesmo após a lesão) e origem: nociceptiva (em razão dos estímulos nociceptivos); inflamatória (desencadeada pela ativação do sistema imune após lesão alterando as propriedades de resposta dos aferentes nociceptivos aos estímulos); e patológica com causa bem estabelecida (neuropática) ou de origem incerta (disfuncional).

Fonte: Adaptado de Santos (2013).

Outra forma de classificar a dor é por sua origem: nociceptiva, inflamatória ou patológica (Figura 1). A dor nociceptiva ocorre devido à detecção de estímulos nocivos pelos nociceptores – que são terminações nervosas livres presentes na pele e diferentes órgãos responsáveis por fornecer informações sobre um possível dano – e age como um sistema de proteção que detecta e diminui o contato com estes estímulos que podem ser químicos, mecânicos ou térmicos. Este tipo de dor é de alto limiar e ocorre somente com estímulos intensos (WOOLF, 2010; GUYTON; HALL, 2011; FEIN, 2011).

Didaticamente, esse processo fisiológico da condução do estímulo doloroso é dividido nas seguintes etapas: transdução, em que um estímulo nocivo externo é convertido em atividade eletrofisiológica; transmissão e modulação, em que a informação é retransmitida por meio da medula espinhal até o tronco cerebral e tálamo; e percepção, em que as conexões entre o tálamo e centros corticais

superiores integram a resposta afetiva e controlam a dor (Figura 2) (BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

Na transdução ocorre a conversão de estímulos nocivos em sinais elétricos nas vias nociceptoras periféricas. Os nociceptores respondem aos estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, provocando despolarização das fibras com a abertura dos canais de sódio (Na^+) voltagem dependentes, gerando potenciais de ação (WALKER, 2014). Esses são conduzidos para o corno dorsal da medula espinhal ou para o tronco cerebral, onde promovem a abertura do canal de cálcio (Ca^{+2}) voltagem dependente do tipo *N*, o que permite o influxo deste íon. Assim, ocorre a liberação de mediadores que podem promover a inibição, excitação ou modificar a sensibilidade do neurônio pós-sináptico, incluindo neuropeptídeos (como o relacionado com o gene da calcitonina, CGRP, e substância P, SP), além de neurotransmissores (como glutamato, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico, GABA) para os neurônios de segunda ordem (GUYTON; HALL, 2011; FORNASARI, 2014).

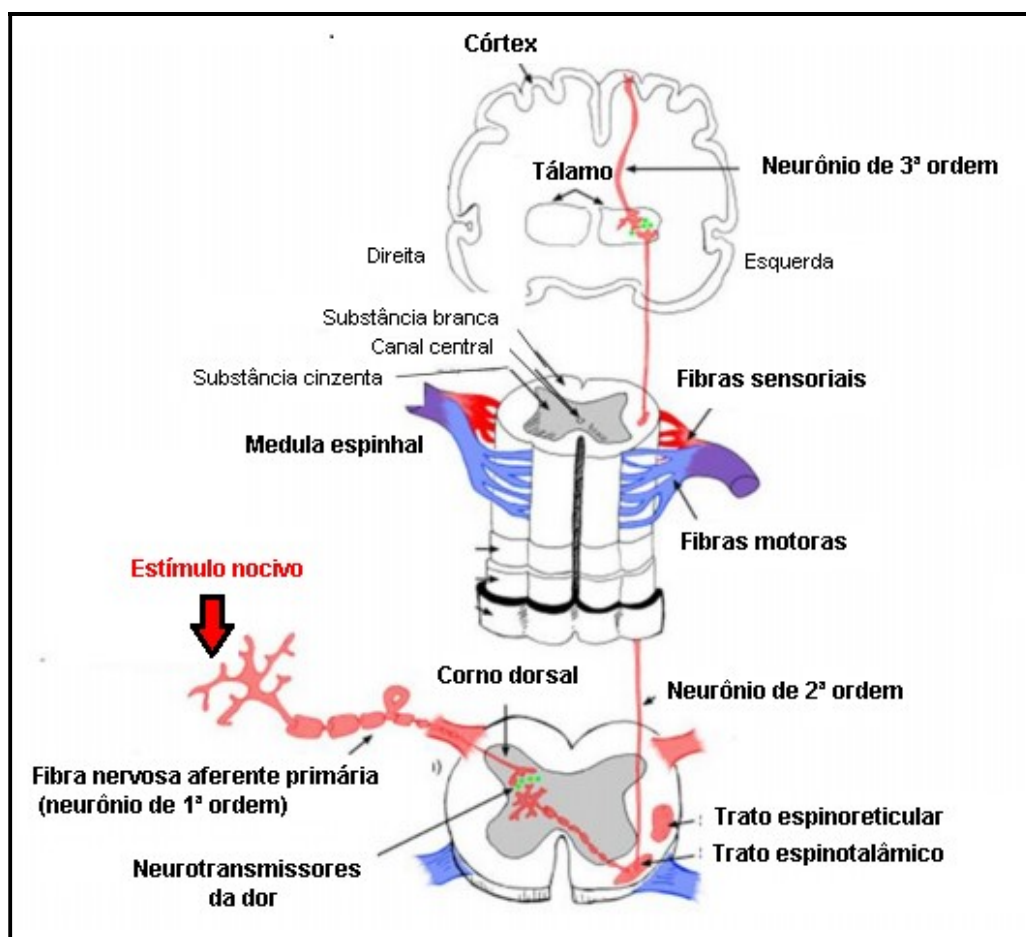
Após a sinapse dos nociceptores com os neurônios de segunda ordem, estas fibras aferentes seguem o trato espinotalâmico e ascendem contralateralmente até o tálamo, onde transmitem o estímulo nocivo. Em seguida, esta informação é transmitida por um neurônio de terceira ordem ao córtex somatossensorial, onde será processada e interpretada como dolorosa, sendo esta via chamada de via ascendente da dor (Figura 2) (BASBAUM et al., 2009; KUNER, 2010; HASUDUNGAN, 2013). Os neurônios ascendentes também podem estimular outras regiões superiores (córtex cingulado e insular) por meio de conexões no núcleo parabraquial, que estão presentes no tronco encefálico e na amígdala (BORROTO-ESCUELA et al., 2013).

Não existe uma única área responsável por interpretar a experiência dolorosa, mas sim um “centro de dor” onde o córtex somatossensorial está relacionado com propriedades sensoriais-discriminatórias, e o córtex cingulado e insular, estão relacionados com os componentes emocionais (BASBAUM et al., 2009).

Diferentemente, a dor patológica não tem caráter protetor e resulta do mau funcionamento do sistema nervoso central (SNC), que se subdivide em dor neuropática e disfuncional (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010). Na dor disfuncional não existe um estímulo nocivo, inflamação ou danos no sistema nervoso e, portanto, na maioria dos casos, não se sabe ao certo o motivo causador

da manifestação ou persistência desta dor (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). A dor neuropática é caracterizada como um déficit sensorial decorrente de lesões ou disfunção do SNC, mais especificamente na região somatossensorial, e está relacionada com sensações de queimação, parestesia (formigamento, picadas) e diastesia (sensação desagradável ao toque) (TREEDE et al., 2008; PHILLIPS, 2009; ZHU; LU, 2010). Dentre essas disfunções, estão incluídas: lesão na coluna vertebral, acidentes vasculares cerebrais, síndrome do túnel do carpo e condições que cursam com constrição nervosa (CHAPLAN et al., 1994; SIDDALL; LOESER, 2001; SIDDALL et al., 2003; IKEDA et al., 2009; FINNERUP et al., 2014; CRAGG et al., 2015; KRAMER et al., 2016).

Figura 2 – Esquematisação fisiológica da condução do estímulo nocivo.



Notas: A condução do estímulo doloroso é dividida em: transdução, em que um estímulo nocivo externo é convertido em atividade eletrofisiológica (neurônio de 1ª ordem); transmissão e modulação, em que a informação é retransmitida através de um neurônio de 2ª ordem por meio da medula espinhal até o tronco cerebral e tálamo; e percepção, em que as conexões entre o tálamo e centros corticais superiores integram a resposta afetiva e controlam a dor por intermédio de um neurônio de 3ª ordem.

Fontes: Adaptado de Hasudungan (2013); Pires (2018).

Assemelhando-se à dor nociceptiva, outra forma de dor, denominada inflamatória, é também adaptativa e tem função de proteger o organismo, sendo considerada um dos sintomas cardinais da inflamação. É desencadeada pela ativação do sistema imunológico (SI) após lesão tecidual ou infecção, a qual ativa ou modifica as propriedades de resposta dos aferentes nociceptivos aos estímulos (ZHU; LU, 2010). Neste caso, a sensibilidade sensorial é aumentada após o dano aos tecidos de maneira a auxiliar a recuperação do local lesado. Dessa forma, os pacientes relatam a sensação de dor a estímulos antes descritos como inócuos (dor a estímulos não nociceptivos denominada alodínia), ou o aparecimento de hiperalgesia que é considerada como a percepção exacerbada da dor a estímulos anteriormente descritos como dolorosos, além da ocorrência de dor espontânea (LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010). Mesmo que esta dor seja adaptativa, ainda deve ser tratada em pacientes com inflamação recorrente, como nos portadores de AR, na qual a dor persiste enquanto houver inflamação ativa (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; CHANDRATRE et al., 2013; LINDSAY et al., 2011; WOOLF, 2010).

É descrita na literatura científica uma semelhança entre homens e outros animais quanto à neuroanatomia das vias nociceptivas, bem como os mecanismos fisiológicos de percepção da dor. Por definição, a dor não pode existir sem um componente emocional ou afetivo, não discriminados em modelos animais (KRAMER et al., 2016). Dessa forma, supõe-se que a diferença entre cada indivíduo não esteja na forma como se sente a dor, mas sim no comportamento reativo diante desse estímulo (TEIXEIRA, 2010). A interpretação do estado doloroso em modelos experimentais de nocicepção pelo observador deve ser reconhecida através de comportamentos, frequentemente direcionados a respostas de retirada de estímulo mecânico ou térmico de tecidos periféricos (geralmente patas ou cauda) (VIERCK; YEZIERSKI, 2015; WHITTAKER; HOWARTHA, 2014; KRAMER et al., 2016).

Assim, pode-se inferir que a percepção da dor em humanos envolve diversos componentes: neurais, fisiológicos, comportamentais e emocionais. Contudo, no caso dos modelos para avaliação da dor em animais apenas os mecanismos neurais e fisiológicos são passíveis de mensuração, o que se denomina nocicepção (WALL; MELZACK, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; NAVRATILOVA et al., 2010).

2.2 Inflamação

A dor corresponde a um dos sinais clássicos do processo inflamatório que compartilha um componente comum, ou seja, a capacidade de sensibilizar ou ativar nociceptores. A inflamação é uma reação tecidual a uma agressão com a ativação do sistema imune e alterações vasculares causada por estímulos químicos, físicos, biológicos ou combinados (XU et al., 2014). Este mecanismo geralmente é regulado por uma cascata de interações moleculares e reações bioquímicas capazes de propagar uma resposta, que envolve extravasamento de líquido, migração celular, produção de mediadores pró-inflamatórios e sensibilização de nociceptores que culminam no quadro característico de calor, rubor, edema, dor e perda de função (KUMARI et al., 2014; SOUZA; SILVA, 2014).

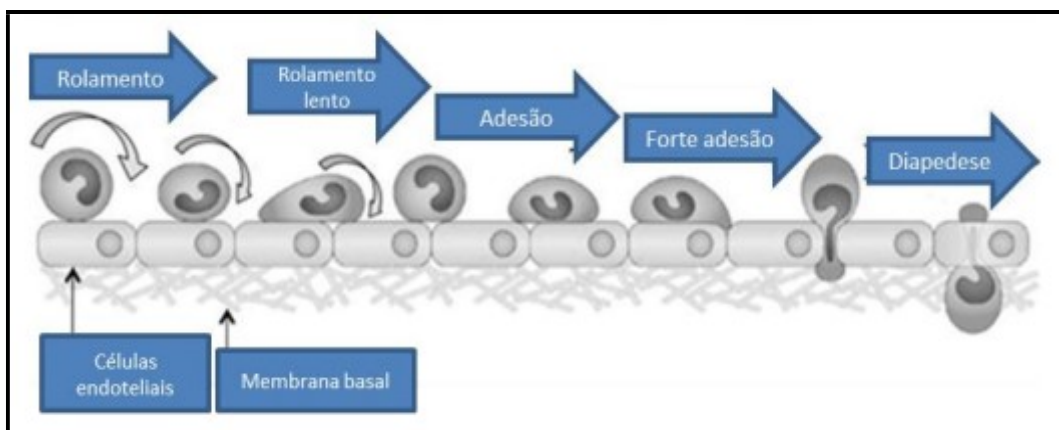
O processo inflamatório é benéfico ao organismo, pois age de forma a limitar o agente agressor promovendo a recuperação do tecido. Em algumas situações, porém, essa resposta pode se tornar excessiva, sem qualquer benefício e com graves consequências (PIRES, 2009; PINHEIRO; WANNMACHER, 2010).

Inúmeras doenças são marcadas pela presença da inflamação com caráter agudo ou crônico. Na inflamação aguda predominam elementos da resposta imune inata cujas principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos. Diferentes infecções bacterianas, virais e fúngicas; e lesões tissulares por causas já mencionadas, estão relacionadas à inflamação aguda. Em condições crônicas, normalmente ocasionadas por persistência do estímulo agressor, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis no tecido. A continuação do agente indutor da lesão conduz à cronificação do processo, resultando em destruição tecidual (CRUVINEL et al., 2010). Dentre as inflamações de curso crônico, destacam-se: aterosclerose, obesidade, asma e câncer. Além disso, configuram-se também as doenças autoimunes como AR (LAVETI et al., 2013; NATHAN; DING, 2010).

A resposta inflamatória compreende três fases: aguda, tardia (ou celular) e crônica (ou proliferativa). A fase aguda é caracterizada por eventos vasculares (vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular) mediados principalmente por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs), responsáveis pelos sinais de calor e rubor. Com o aumento da pressão hidrostática na microcirculação e

celular): os leucócitos são atraídos à parede endotelial e passam por um processo de rolamento sobre as células, reduzindo sua velocidade até parar por completo. Em seguida, estas células se tornam ativas e aderem ao endotélio. Uma vez aderidos, os leucócitos sofrem diapedese e migram até o sítio inflamatório em resposta às substâncias quimioatraentes – Figura 4 (ISAAC et al., 2010; CRUVINEL et al., 2010).

Figura 4 – Mecanismo de migração leucocitária para o sítio inflamatório (diapedese).



Notas: Leucócitos são atraídos à parede endotelial e passam por um processo de rolamento sobre as células, reduzindo sua velocidade até se tornarem ativas e aderirem ao endotélio a partir do qual sofrem diapedese e migram até o sítio inflamatório em resposta às substâncias quimioatraentes.

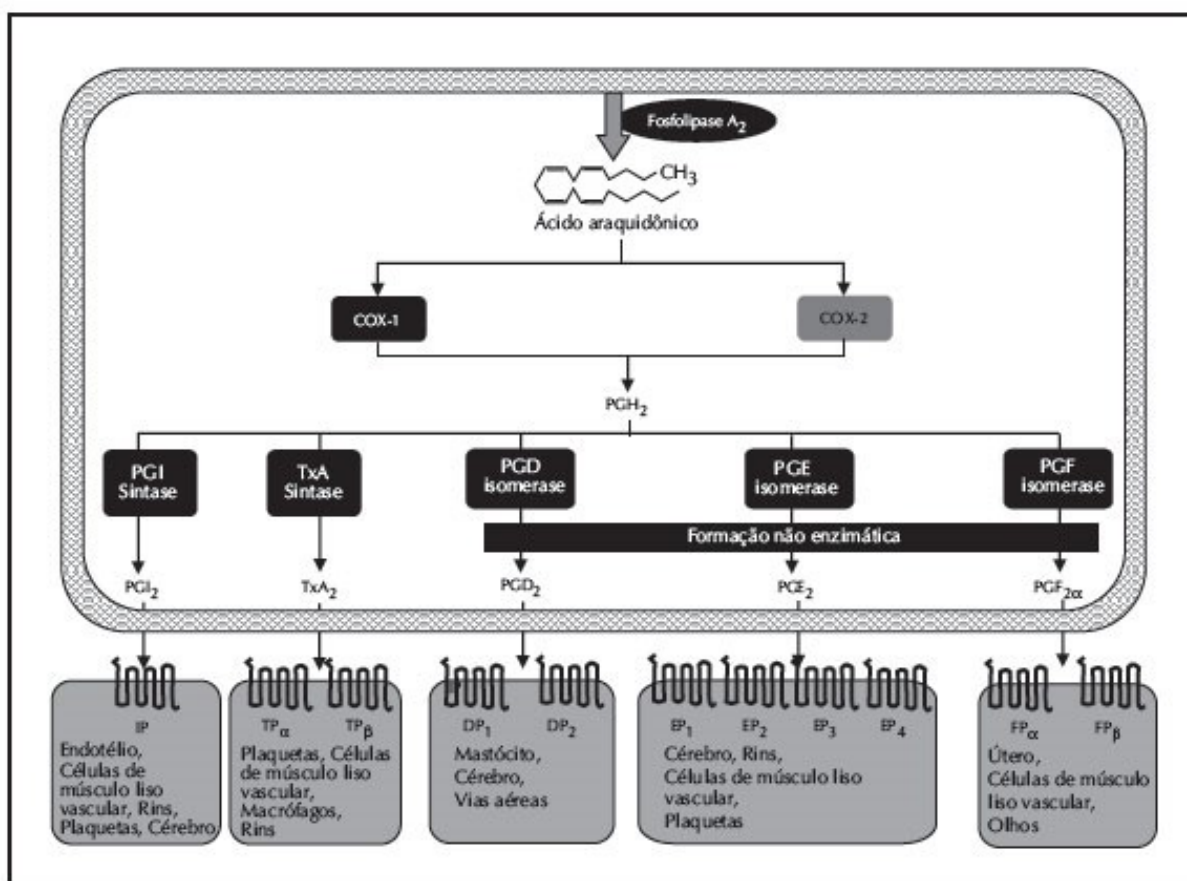
Fontes: Adaptado de Lowell; Mayadas, (2012); Viana (2016).

Quando o organismo não consegue eliminar o agente agressor por meio das respostas inflamatórias agudas e/ou subagudas, evolui para fase proliferativa (crônica), caracterizada por apresentar longa duração, que envolve degeneração e fibrose teciduais, exsudato rico em linfócitos e macrófagos, podendo causar dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (FRANCO et al., 2010; CASTRO, 2011; VIEIRA, 2014).

Em resposta à lesão tecidual, oriunda pelos vários estímulos já citados, uma via metabólica se inicia a partir da ativação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2) que hidrolisa os fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico (AA) – Figura 5. Este, por sua vez, serve de substrato para duas vias enzimáticas: cicloxigenase (COX) ou lipoxigenase (LOX). Pela via da COX é gerada a PGH_2 , que estimula a formação de vários prostanoídes, incluindo diversas prostaglandinas (PGI_2 , PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$) e tromboxano A_2 (TXA_2). Pela via da LOX são formados leucotrienos, lipoxinas e outros mediadores (BATLOUNI, 2010).

Os produtos do metabolismo do AA por estas duas vias enzimáticas são denominados de eicosanoides e desempenham importantes funções na indução e propagação de doenças, principalmente as inflamatórias, sendo por este motivo um dos principais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (CASTRO, 2011).

Figura 5 – Metabolismo do ácido araquidônico.



Notas: Em resposta à lesão tecidual, uma via metabólica se inicia a partir da ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que hidrolisa os fosfolípídeos de membrana em ácido araquidônico (AA), substrato para duas vias enzimáticas: ciclooxigenase (COX) ou lipoxigenase (LOX). Pela via da COX é gerada a PGH₂, que estimula a formação de vários prostanoídeos, incluindo diversas prostaglandinas (PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂). Pela via da LOX são formados leucotrienos, lipoxinas e outros mediadores.

Fonte: Mendes et al. (2012).

A COX é encontrada em três isoformas: COX₁, COX₂ e COX₃. A COX₁ é a forma constitutiva, encontrada em plaquetas, células endoteliais, estômago e rins, e seus derivados estão associados à citoproteção gástrica (PGE₂), agregação plaquetária (TXA₂) e hemostasia renal (PGI₂). A COX₂ é a forma induzida na presença de inflamação, podendo também ser encontrada nos tecidos cerebral e

renal, na ausência de inflamação. Já a isoforma COX₃ está relacionada à síntese da lipoxina que possui efeito anti-inflamatório e está presente no SNC (SILVA; PEREIRA, 2016).

A indução da expressão de COX₂ é reconhecidamente um componente chave de processos inflamatórios e tumorais, podendo ser mediada por citocinas. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células nos locais de lesão e por células do SI, uma vez que são necessárias para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. Influenciam na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, aumentando (próinflamatórias) ou atenuando (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Como próinflamatórias, incluem-se: IL-1, IL-2, IL-6, IL-17 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), capazes de aumentar os níveis de COX₂. Por outro lado, a diminuição da expressão de COX₂ é efetuada por citocinas anti-inflamatórias, como: IL-4, IL-10 e TGF- β (Quadro 1) (CURFS; MEIS, 1997; ZHANG; AN, 2007; BEAULIEU et al., 2010).

Já está bem estabelecido que as citocinas próinflamatórias, especialmente IL-17 e o TNF- α , estão envolvidas na patogênese de doenças inflamatórias crônicas como AR (CHOY, 2012; DIMITROULAS et al., 2013). Estudos recentes têm sugerido que células produtoras de IL-17 (chamadas Th17) compõem um novo subgrupo de células críticas para a patogênese da AR. A IL-17 induz a produção de mais citocinas próinflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , apresentando um papel patogênico devido à sua associação com a destruição óssea (KIM et al., 2013).

O TNF- α também é considerado o desencadeador de eventos próinflamatórios pela capacidade de induzir a produção de outras citocinas, como a IL-1, IL-6 e IL-8, frequentemente encontradas nas articulações de pacientes com AR (LINDSTROM; ROBINSON, 2010). Para além desta capacidade, o TNF- α favorece a liberação de metaloproteinases de matriz, que promovem a destruição tecidual e induz a expressão de moléculas de adesão, facilitando a infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial (CHEN et al., 2012; CHOY, 2012).

Quadro 1 – Características das principais citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Características		
Citocinas pró-inflamatórias	TNF-α	Na AR, está relacionada com a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e pela modulação de células Treg.
	IFN-γ	Regula a ativação de macrófagos e células NK; estimula a secreção de imunoglobulinas; promove a diferenciação de células Th1.
	IL-1	Promove a ativação de leucócitos, células endoteliais, osteoblastos e condrócitos.
	IL-2	Indução da ativação e proliferação de células T e B; estimulação da citotoxicidade das células NK; expansão clonal dos linfócitos Tc.
	IL-6	Promove a diferenciação e crescimento de células T, células B e osteoblastos
	IL-17	Indutoras da inflamação, promovendo a infiltração celular e produção de outras citocinas pró-inflamatórias
Citocinas anti-inflamatórias	TGF-β	Inibe a proliferação de células T; bloqueia os efeitos das citocinas pró-inflamatórias; inibe a ativação de macrófagos.
	IL-4	Estimula a diferenciação e proliferação de linfócitos Th2; tem anti-inflamatória em células T e monócitos
	IL-10	Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias; estimula a proliferação de mastócitos; inibe a diferenciação de células Th1; inibe a função de células NK

Notas: Características da ação das principais citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Tc = linfócito T CD8+; Th1 = T *helper* 1; Th2 = T *helper* 2; TNF- α = fator de necrose tumoral *alfa*; IFN- γ = interferon *gama*; IL = interleucina; TGF- β = fator de crescimento transformador *beta*; AR = artrite reumatoide; NK = *natural killers*.

Fonte: Adaptado de Pedrosa (2014).

É possível constatar que as citocinas formam uma rede complexa e redundante, cujo balanço final depende de múltiplas interações. Em relação à inflamação, o resultado será a progressão ou a resolução do processo inflamatório. Assim, nenhuma citocina tem uma única função e nenhuma das fases do processo inflamatório depende de uma única citocina. A inflamação que caracteriza a AR é predominantemente caracterizada por efeitos das citocinas pró-inflamatórias que se sobrepõem as citocinas anti-inflamatórias (FAUCI et al., 2005; BOISSIER et al., 2012).

Para a maioria dos pacientes, a recuperação do tecido lesionado ocorre naturalmente, sem a necessidade de medicamentos, terapia ou outras intervenções (WATSON, 2012). Entretanto, numa inflamação extensiva como na AR, ou num quadro não regulado no qual o agente agressor não é removido, o processo inflamatório progride para uma inflamação crônica, podendo ser altamente prejudicial ao organismo.

Desta forma, compreende-se a busca pela possibilidade de facilitar ou promover a normalidade da reparação tecidual por intermédio da otimização dos eventos envolvidos na inflamação (WATSON, 2012). Com a finalidade de aperfeiçoar o estudo da etiopatogenia da AR e de buscar diferentes tratamentos, inúmeros modelos experimentais murinos que mimetizam a artrite humana têm sido desenvolvidos nas últimas décadas (YU et al., 2002; DAHER; MELO; TONUSSI, 2005).

Para o desenvolvimento de AR em modelos *in vivo* é necessário o uso de adjuvantes antigênicos capazes de amplificar a resposta imunológica no organismo. Dentre os diferentes tipos de adjuvantes, destaca-se o adjuvante completo de Freund (CFA), do tipo imunoestimulador (MOTA; LIMA; MELO, 2006), que é constituído por 85% de óleo mineral e 15% de emulsificante com 500 µg de micobactéria (*Mycobacterium* sp – inativada), por mililitro de emulsão (NUNES et al., 2009). O CFA é um dos adjuvantes mais eficazes em modelos experimentais, pois demonstra uma resposta imunológica aceitável em animais, aumenta o recrutamento de células produtoras de anticorpos para o local da indução, melhorando o contato antígeno com as células do SI e induz a inflamação local. Além disso, pode aumentar a velocidade e a duração da resposta imunológica (RESENDE et al., 2004; MOTA; LIMA; MELO, 2006).

O conhecimento e a compreensão a partir desse modelo experimental associados à análise da resposta imune, através de parâmetros qualitativos e quantitativos das citocinas, são de importante valor para a realização de pesquisas em busca de novos tratamentos (SOUZA; LOURENÇO; DELLALIBERA-JOVILIANO, 2017).

Assim, constitui uma necessidade eminente à descoberta de novas substâncias que possam ser empregadas na prevenção, controle e/ou cura dos processos inflamatórios sem, no entanto, interferir em seus efeitos benéficos, com melhor eficácia e menores complicações ao paciente.

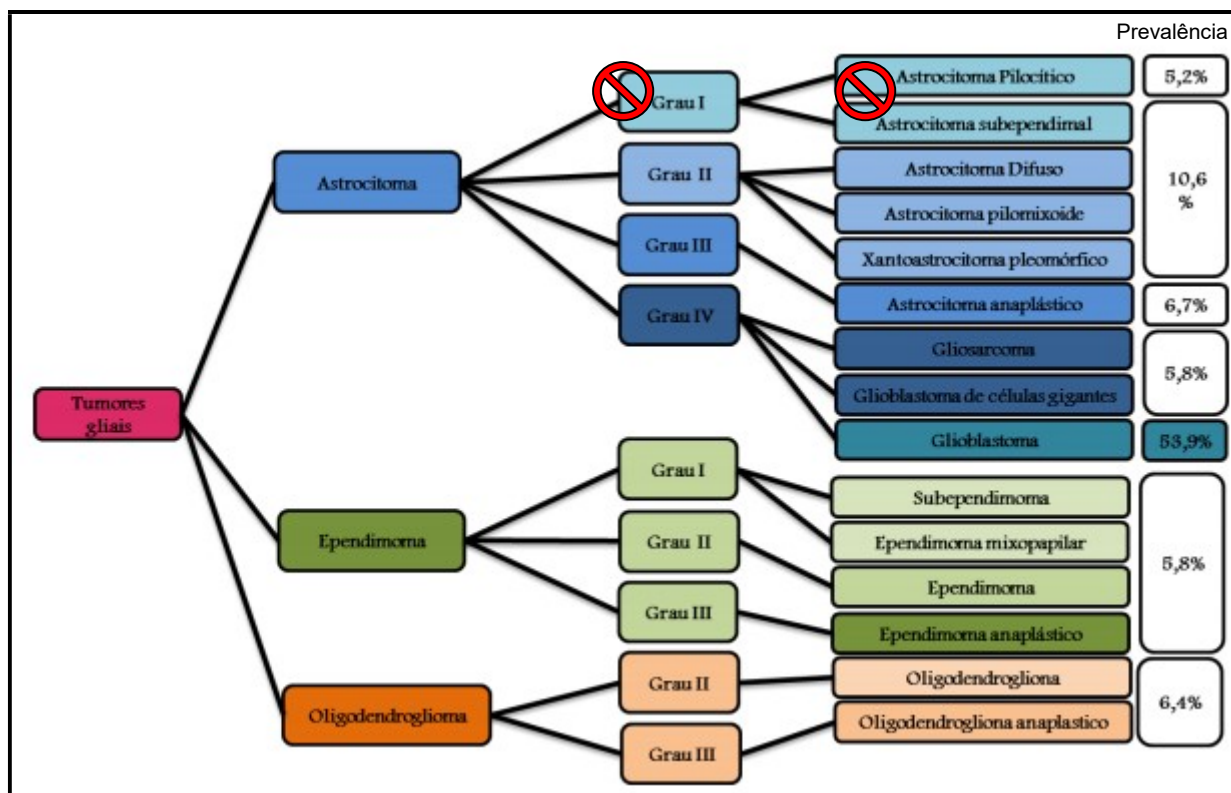
2.3 Glioblastoma

A relação entre inflamação e câncer vem sendo extensamente estudada e vários modelos de eventos inflamatórios contribuem para a progressão de fenótipo maligno em diversos tipos tumorais, além de apresentar relação com o grau da doença, inclusive para os gliomas. Doenças ou infecções repetitivas que desencadeiam um quadro de resposta inflamatória crônica podem eventualmente levar a um câncer, como por exemplo: as conseqüências do tabagismo, obesidade, ingestão de bebidas alcoólicas, ou ainda infecções virais, bacterianas ou exposição a substâncias como amianto; e, no aspecto intrínseco, a manifestação de oncogenes pode também desencadear inflamação associada à doença (AGGARWAL; SUNG; GUPTA, 2014). Há indícios de que a inflamação em tumores cerebrais seja impulsionada por mutações oncogênicas assim como mudanças no microambiente; logo, glioma é melhor descrito como um câncer que induz inflamação (ALBULESCU et al., 2013).

Até 2007, os tumores cerebrais eram classificados em grupos e graus de malignidade considerando características histológicas e as células de origem, agrupados de acordo com a morfologia, independentemente da similaridade ou distinção clínica entre eles (LOUIS et al., 2007). No entanto, a classificação proposta em 2016 pela OMS os reorganizou para que, além da histologia, fossem considerados parâmetros moleculares de diagnóstico e mutações/deleções comuns, formulando-se um novo agrupamento das subdivisões (LOUIS et al., 2016; BANAN et al., 2017).

Desse modo, de acordo com a reformulação atual da OMS (2016), todos os gliomas difusos infiltrantes compõe um único grupo, incluindo aqueles de origem astrocítica, oligodendrogial e os mistos (astrocíticos e oligodendrogiais). O astrocitoma pilocítico, antes classificado como astrocitoma grau I, não pertence mais ao grupo dos gliomas difusos, passando a ser classificado como outro tipo de tumor astrocítico. Logo, a nova classificação se inicia a partir dos gliomas difusos infiltrantes grau II, com atipias citológicas isoladas (por exemplo, astrocitomas difusos); aqueles que também apresentam anaplasias e atividade mitótica (por exemplo, astrocitomas anaplásicos) são considerados de grau III; e os tumores que também apresentam proliferação microvascular e/ou necrose são considerados de grau IV (glioblastoma multiforme ou glioblastoma, GBM) (Figura 6).

Figura 6 – Esquema representativo da última classificação de tumores gliais segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).



Fontes: Adaptado de Louis et al. (2016); Adaptado de Freitas (2017).

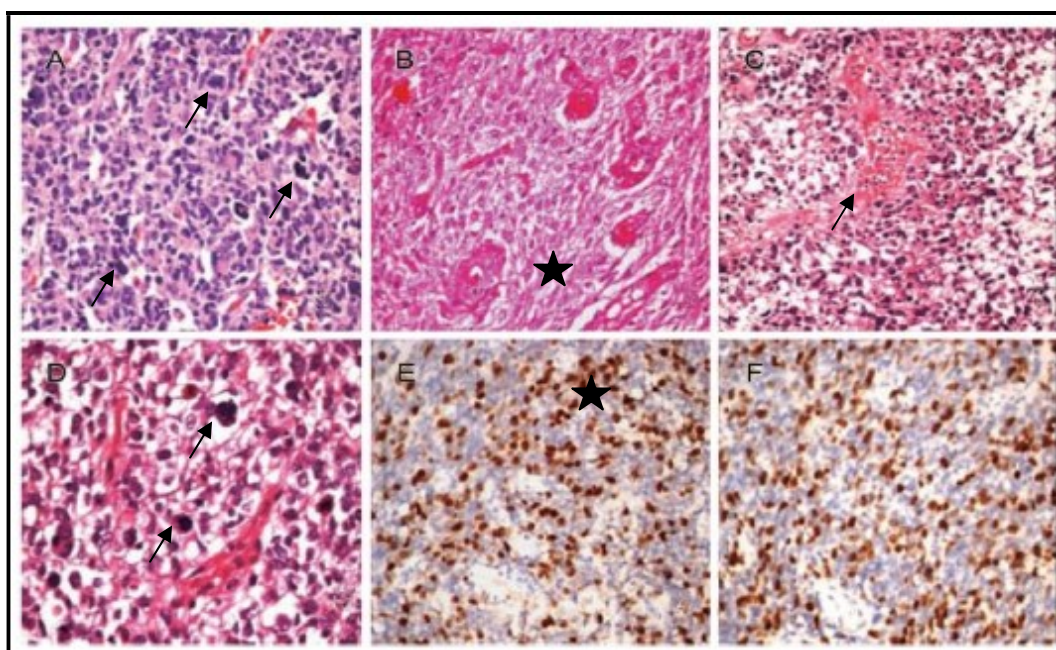
Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) a incidência de tumor no SNC no Brasil é de 5,5 novos casos para cada 100 mil homens e 4,7 novos casos para cada 100 mil mulheres, dentre os quais os gliomas representam o tipo mais frequente (40 – 60%).

O GBM é o mais comum e agressivo tumor cerebral primário em adultos, com uma incidência de 3 a 5 casos por 100 mil habitantes por ano – o que corresponde a 15% dos casos de tumores malignos intracraniais e mais da metade (50 – 60%) dos gliomas (VELIZ et al., 2015; GALCERAN et al., 2017). O GBM pode se desenvolver em todas as idades, com o pico de incidência na sexta década de vida; e a idade média do diagnóstico de 62 anos (MARTÍNEZ-GARCIA et al., 2018).

O GBM é caracterizado pelo crescimento rápido, difuso e infiltrativo, atipias celulares, alta capacidade mitótica e de proliferação microvascular e necrose, aos quais se atribui a malignidade desse tipo de tumor, como é possível observar na Figura 7 (WESSELING; KROS; JEUKEN, 2011). Outra característica peculiar desse tipo de tumor é sua alta heterogeneidade molecular, histológica e citológica, que justifica seu nome original como glioblastoma “multiforme” (SOTTORIVA et al., 2013;

PATEL et al., 2014). Embora o GBM ocorra predominantemente no cérebro, é possível seu desenvolvimento no tronco encefálico, cerebelo e na medula espinal (DAVIS, 2016).

Figura 7 – Observação microscópica histopatológica de glioblastoma (GBM) em hematoxilina eosina (HE, 20 X).



Notas: Características microscópicas de glioblastoma e do microambiente. A – setas demonstrando atividade mitótica; B – estrela indica região de necrose paliçádica típica; C – seta indicando GBM com proliferação endotelial; D – setas demonstrando células tumorais gigantes multinucleadas; E – estrela indicando atividade proliferativa em Imunohistoquímica (IHC, 20x); F – IHC para p53. (indicativos nas figuras)

Fonte: UNICAMP (2017).

A etiologia do GBM não foi totalmente elucidada. Acredita-se que seja um tumor espontâneo, mas que pode ocorrer em pessoas pré-dispostas com lesões na cabeça por contusão cerebral, ou ainda, através da hereditariedade para a qual é atribuída 1% dos casos (SCHWARTZBAUM et al., 2006; ZHEN et al., 2010).

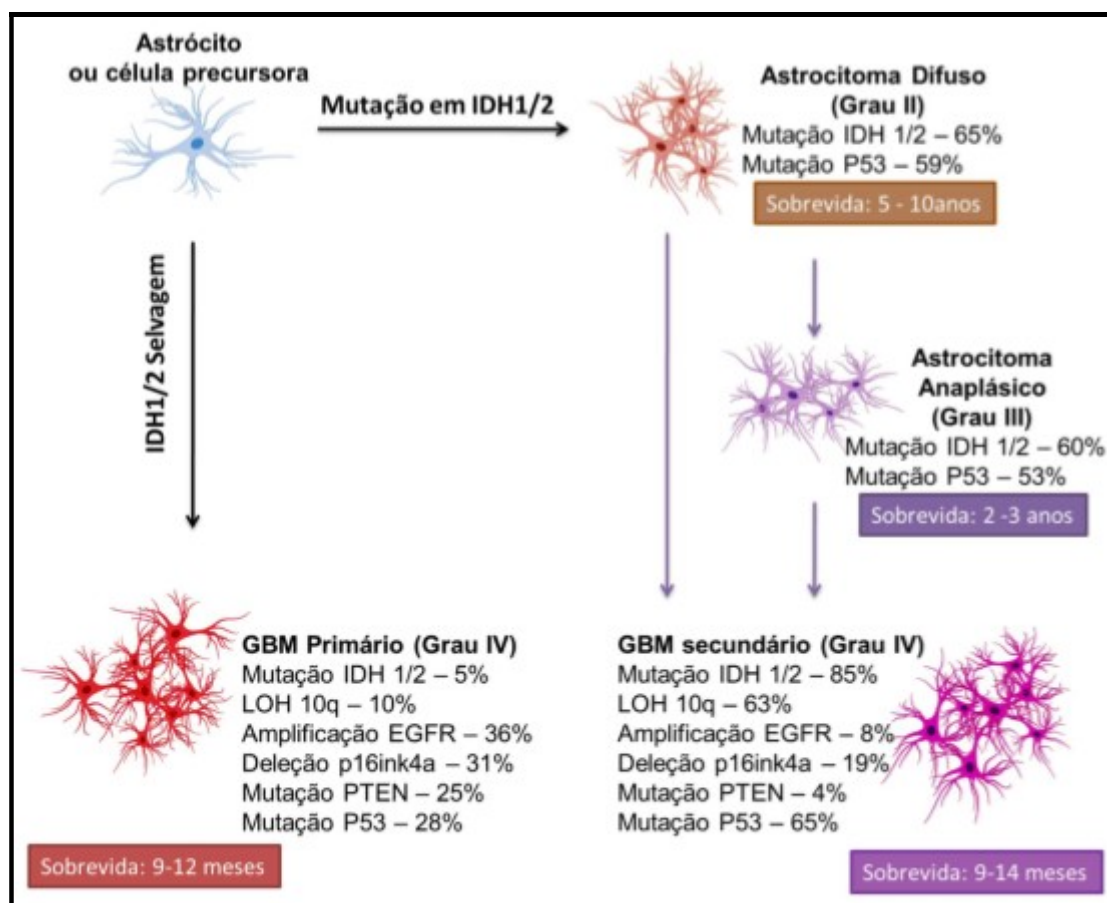
Os sintomas observados no GBM estão associados à evolução do tumor, sendo o aumento da massa tumoral a principal causa do agravamento, uma vez que induz a elevação da pressão intracraniana, gerando cefaleias, ataxia, tonturas, distúrbios de visão, síncope frequente, além de convulsões em pacientes não epiléticos, o que requer exames de neuroimagem (LAKHAN; HARLE, 2009; SANLI et al., 2010).

O GBM pode ser classificado quanto à origem e progressão em primário ou secundário. Os GBMs primários, ou “de novo”, desenvolvem-se na ausência de uma lesão precursora, não possuindo, portanto, um histórico de progressão a partir de lesões de baixo grau. A maioria (90%) dos GBMs é primária, em pacientes na média dos 60 anos e com prognóstico não promissor (OHGAKI; KLEIHUES, 2007; WILSON; KARAJANNIS; HARTER, 2014). Os GBMs secundários, por sua vez, apresentam evidências de progressão a partir de lesões de menor grau, como o astrocitoma difuso ou o astrocitoma anaplásico, com um histórico clínico de até 10 anos, que correspondem a aproximadamente 5%, com incidência maior em pacientes mais jovens (aproximadamente 45 anos) em comparação com o GBM primário (OHGAKI et al., 2004; OHGAKI et al., 2007).

Apesar das diferenças em sua origem e desenvolvimento, GBMs primários e secundários são histologicamente indistinguíveis. Fundamentalmente, as diferenças se baseiam em alterações moleculares já descritas na literatura. Estas são responsáveis pela resistência aos tratamentos atuais e conseqüentemente diferirem o curso do prognóstico sendo determinantes para a resposta terapêutica (VERHAAK et al., 2010; PEÑARANDA-FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016).

Dentre os fatores moleculares descritos para o GBM, incluem: mutações em enzimas responsáveis pelo reparo oxidativo celular – isocitrato-desidrogenase-1 (IDH1) e 2 (IDH2), perda de heterozigose no cromossomo 10q (LOH 10q), amplificação do gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), supressão da via p16^{INK4a}/RB1 (o qual controla a progressão da fase G1 para S no ciclo celular), assim como mutações no gene PTEN (homólogos da fosfatase e tensina – relacionado à resistência ao tratamento) e na proteína de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) p53 (Figura 8) (KAKKAR et al., 2011; WILSON et al., 2014; ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; YOUNG et al., 2015; JIN et al., 2016; CAMBRUZZI, 2017; BENITEZ et al., 2017).

Figura 8 – Modelo das alterações moleculares na progressão do glioblastoma (GBM) pela via de novo (primária) e via progressiva (secundária), adaptado com a inclusão do papel das mutações de isocitrato-desidrogenases 1 e 2 (IDH 1 e IDH2) no desenvolvimento do tumor.



Notas: Dentre os fatores moleculares descritos para o GBM, incluem: mutações em enzimas responsáveis pelo reparo oxidativo celular – isocitrato-desidrogenase-1 (IDH1) e 2 (IDH2), perda de heterozigose no cromossomo 10q (LOH 10q), amplificação do gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), supressão da via $p16^{INK4a}/RB1$ (o qual controla a progressão da fase G1 para S no ciclo celular), assim como mutações no gene PTEN (homólogos da fosfatase e tensina – relacionado à resistência ao tratamento) e na proteína de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) p53.

Fontes: Ohgaki et al. (2007); Cohen, Holmen, Colman (2013); Ohba, Hirose (2016); Souza (2017).

Mutações na enzima IDH 1, inicialmente descritas por Parsons et al. (2008), ocorrem precocemente na gliomagenese, alterando sua função, que é catalisar a carboxilação do isocitrato a α -cetoglutarato, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, resultando na produção de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). As mutações verificadas de perda de função neste estudo ocorreram em quase todos os pacientes diagnosticados com GBM secundário, os quais apresentaram maior

sobrevida (3,8 anos) comparativamente ao grupo que não apresentava mutação em IDH1 (1,1 anos de sobrevida). A caracterização molecular como GBM IDH-selvagem ou GBM IDH-mutado o sugere, portanto, como indicador de prognóstico do GBM.

Gliomas com IDH1 e IDH2 mutados melhoraram o prognóstico em comparação com gliomas com IDH de tipo selvagem. O IDH mutado pode ser detectado por imuno-histoquímica e espectroscopia de ressonância magnética. Nenhum fármaco atualmente tem como alvo a mutação em IDH, embora isso continue a ser uma área de pesquisa ativa (COHEN; HOLMEN; COLMAN, 2013).

Os métodos para determinar atipagem específica do tumor requerem uma biópsia invasiva ou ressecção cirúrgica para realizar análise genômica. A genômica de imagens é uma ciência emergente que explora associações entre perfis moleculares e características radiológicas e pode eventualmente servir como uma técnica não invasiva para determinar a correlação, previsão e identificação (MOTON et al., 2015).

Logo, a subtipagem molecular associada ao planejamento racional e a síntese de fármacos antitumorais para GBM constitui um segmento promissor no sentido de assegurar um melhor prognóstico aos pacientes haja vista a fidedignidade na identificação da tipagem tumoral bem como uma terapia-alvo com menores efeitos adversos e maior eficácia (VITUCCI; HAYES; MILLER, 2011).

Nos últimos 60 anos, a média de sobrevida dos pacientes portadores de gliomas de alto grau aumentou significativamente de 8 para 15 meses (ANDERSON et al., 2008; HAN; SUGHRUE, 2012). Esta evolução se atribui ao aumento de pacientes encaminhados aos centros especializados de tratamento, e também aos avanços nas últimas décadas dos métodos terapêuticos e diagnósticos (histopatológico e molecular após remoção cirúrgica, segundo os critérios atualizados da OMS já descritos) (KATSETOS et al., 2009).

Os sintomas decorrentes do edema peritumoral são tratados com glicocorticoides com dose inicial de dexametasona de 12 a 16 mg/dia. Convulsões podem ser tratadas com antiepiléticos, se não houver contraindicação. A abordagem terapêutica é multidisciplinar e inclui cirurgia, quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) (MARRA, 2016).

A cirurgia compreende o tratamento inicial, com objetivo de máxima ressecção e preservação de função neurológica. A ressecção cirúrgica macroscópica total prolonga a sobrevida dos pacientes em relação à ressecção

subtotal (CHAICHANA et al., 2014; CHEN; MAO, 2014; HARDESTY; SANAI, 2012; MCGIRT et al., 2009), além de fornecer informações quanto à histologia e biologia molecular tumoral. Promove, ainda, a melhora dos sintomas expansivos e aumento do fluxo sanguíneo às regiões hipóxicas ou de necrose, bem como melhor distribuição dos agentes quimioterápicos e efeito biológico da RT pela oxigenação dos tecidos (MARRA, 2016).

Entretanto, devido à localização delicada e a grande capacidade invasiva ao parênquima cerebral, a delimitação anatômica e remoção completa da massa tumoral são muito difíceis, acarretando em uma alta taxa de recidiva. Ademais, quando possível, a ressecção cirúrgica no caso do GBM é limitada em razão da agressividade do GBM que é caracterizada por infiltração no tecido circundante e extensa vascularização. Desse modo, a cirurgia de ressecção é acoplada a um curso de farmacoterapia e/ou terapia de radiação (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; SÉHÉDIC et al., 2015).

O principal objetivo da RT é induzir a morte celular através de efeitos diretos da radiação, ou seja, quando a própria energia causa alterações no DNA. Porém, predominam os efeitos indiretos – através da radiólise da água, que danifica o DNA celular com a formação de radicais livres, causando oxidação e dano celular indireto (HALL; GIACCIA, 2012; SANTACROCE et al., 2013).

Prosseguente, durante a RT, utilizam-se doses fracionadas de radiação em campos direcionados à região do tumor. Porém, parte do tecido normal adjacente também sofre os efeitos do tratamento, o que compromete seu uso. Outro inconveniente é o fato dos gliomas de alto grau crescerem rapidamente e num volume intenso, podendo apresentar regiões hipóxicas ou até necróticas. O ambiente hipóxico modifica a sensibilidade das células à radiação, tornando-as menos sensíveis ao tratamento (OGAWA et al., 2012).

A RT pós-operatória, como monoterapia, foi o tratamento padrão até 2005, quando os resultados de um estudo piloto de fase III mudaram o padrão de tratamento para GBM. Este ensaio confirmou que a RT somada à QT foi mais eficaz que a RT utilizada de forma isolada. Os pacientes que receberam o tratamento associado apresentaram em média uma maior sobrevida (14,6 meses) que aqueles tratados somente com a RT (12,1 meses) (STUPP et al., 2005).

A QT para GBM evoluiu desde a década de 1970, quando os pesquisadores relataram pela primeira vez dados sobre a eficácia da carmustina, um fármaco capaz

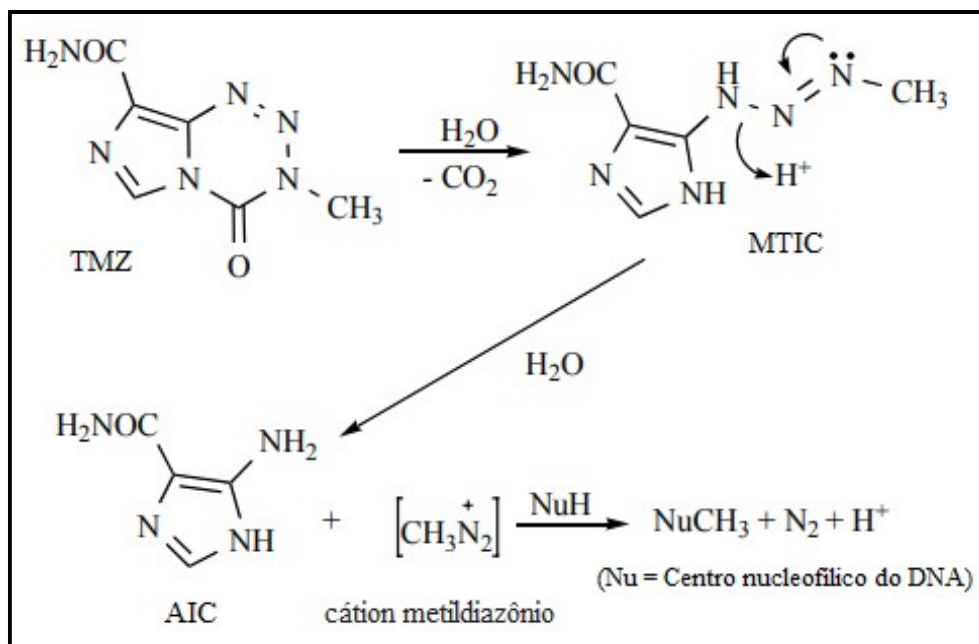
de atuar diretamente nas células de glioma (WILSON, 1976; WALKER et al., 1980). Em 1999, a temozolomida (TMZ), quimioterápico utilizado por via oral, foi aprovado pelo órgão fiscalizador norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA), do inglês Administração de Fármacos e Alimentos, para tratar astrocitoma anaplásico (YUNG et al., 1999; BRADA et al., 2001). Atualmente, TMZ é o agente quimioterapêutico padrão ouro aprovado pela FDA para tratamento do GBM (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; FROSINA, 2015).

A TMZ {3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-d]-[1,2,3,5]-tetrazina-8-carboxamida}, é um agente alquilante do DNA da classe das imidazotetrazinas conhecido por atuar no ciclo celular entre as fases G2/M e direcionar eventualmente à apoptose (ALONSO et al., 2007). O baixo peso molecular e a natureza lipofílica da TMZ possibilitam a difusão deste fármaco pela barreira hematoencefálica (BHE), bem como a administração por via oral em esquema terapêuticos de múltiplas administrações. Pacientes recém-diagnosticados com GBM recebem 75 mg/m²/dia de TMZ por 6 semanas concomitantemente a RT focal, seguidos de 6 ciclos de 150 mg/m²/dia durante 5 dias consecutivos, e 23 dias subsequentes sem tratamento antes do próximo ciclo (LEE, 2016).

TMZ é um pró-fármaco, estável a um pH inferior a 5, mas em pH superior a 7 é rapidamente hidrolisado a 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC) com uma meia-vida plasmática de 1,8 horas (MOODY; WHEELHOUSE, 2014). MTIC reage ainda com água para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e o cátion metildiazônio altamente reativo (Figura 9). Este intermediário metila (Me) preferencialmente o DNA em posições N7 de guaninas, em regiões ricas desta base nitrogenada – (N7-MeG; 70%), mas também metila N3 de adeninas (N3-MeA; 9%) e resíduos O6 de guaninas (O6-MeG; 6%), estes para os quais são atribuídas à citotoxicidade (TISDALE, 1987; DENNY et al., 1994).

Os locais metilados podem permanecer mutados, ou podem ainda passar por mecanismos de correção: reparo de incompatibilidade de DNA (MMR), ou serem removidos por reparo de excisão de base (BER) – pela ação da alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG) –, ou desalquilados pela ação de uma enzima desmetilante como a O6-metilguanina metiltransferase (MGMT), restaurando a guanina (Figura 10) (LEE, 2016).

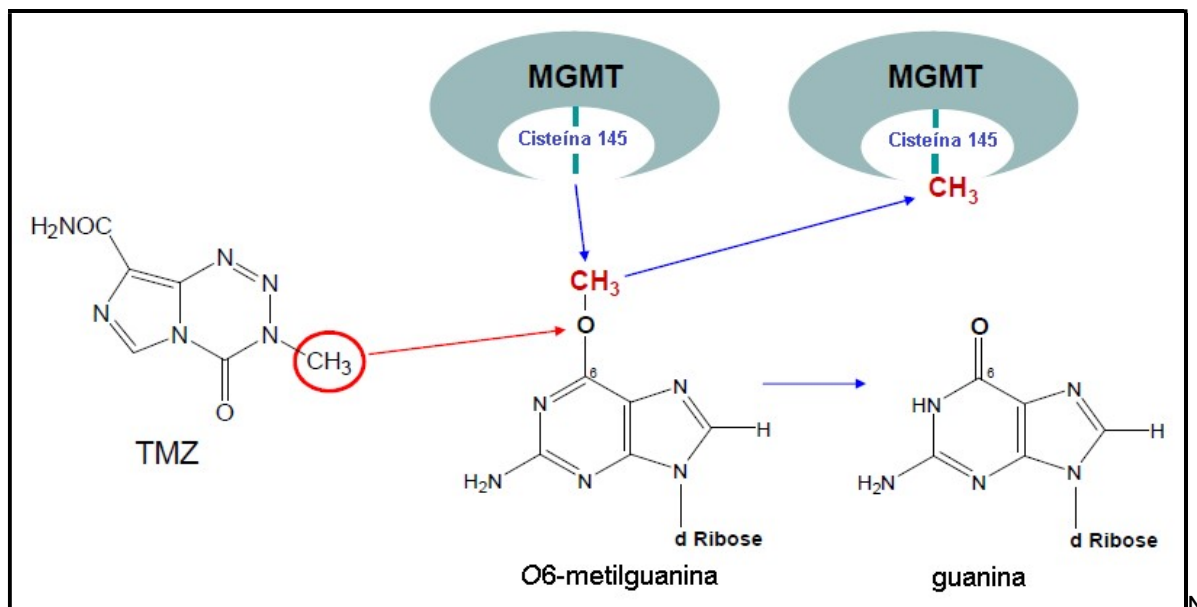
Figura 9 – Estrutura e rota de ativação do pró-fármaco temozolomida.



Notas: TMZ é um pró-fármaco, estável a um pH inferior a 5, mas em pH superior a 7 é rapidamente hidrolisado a 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC) o qual reage ainda com água para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e o cátion metildiazônio altamente reativo.

Fonte: Adaptado de Zhang, Stevens, Bradshaw (2012).

Figura 10 – Reparo mediado pela O6-metilguanina metiltransferase.



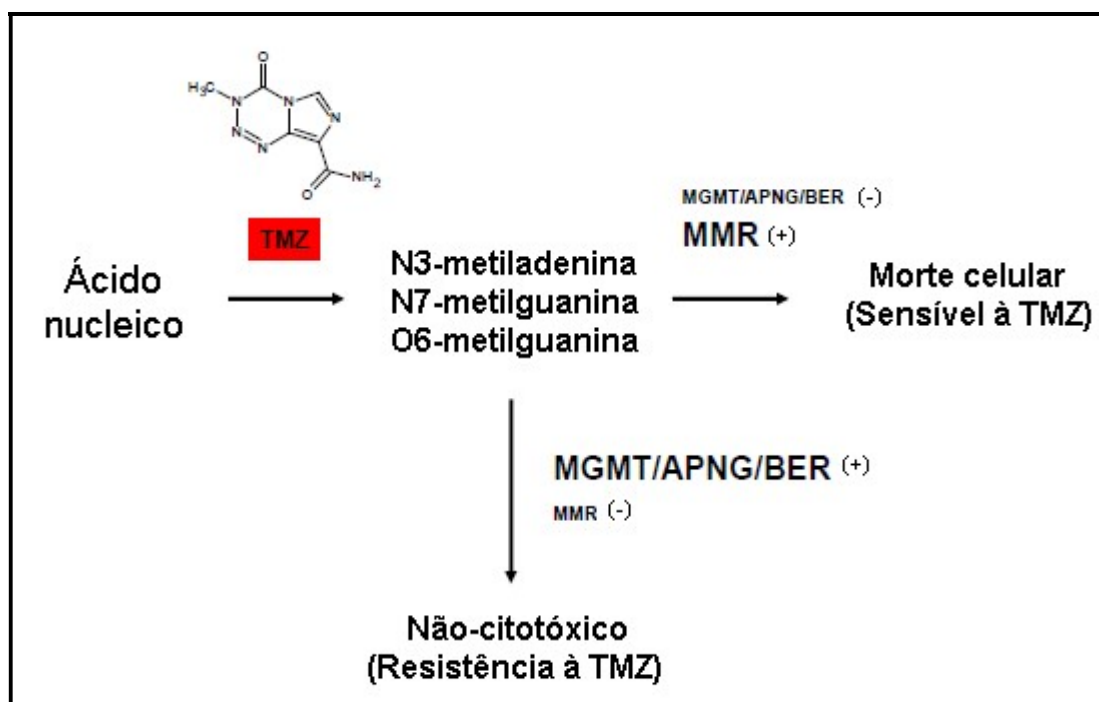
Notas: Mecanismos de correção celular após metilação pelo TMZ: reparo de incompatibilidade de DNA (MMR), ou serem removidos por reparo de excisão de base (BER) – pela ação da alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG) –, ou desalquilados pela ação de uma enzima desmetilante como a O6-metilguanina metiltransferase (MGMT), restaurando a guanina.

Fonte: Adaptado de Zhang, Stevens, Bradshaw (2012).

As células são sensíveis ao TMZ quando MMR é expresso e ativo. Quando as proteínas MGMT, APNG e BER são expressas, as células GBM são resistentes ao TMZ. Uma boa resposta ao TMZ requer, portanto, MMR funcional e baixos níveis de MGMT (Figura 11) (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW (2012).

A ocorrência de resistência ao tratamento com TMZ, associada a prognósticos não promissores e aos efeitos limitantes e adversos desta terapia (como hepatotoxicidade, mielotoxicidade, dentre outros), ressalta a importância da pesquisa de novos fármacos-alvo mais eficazes que constituam uma alternativa de tratamento ou um tratamento adjuvante para o GBM.

Figura 11 – Mecanismo de ação e resistência à temozolomida.



Notas: TMZ= temozolomida; MGMT = O6-metilguanina metiltransferase; APNG = alquilpurina-DNA-N-glicosilase; BER = reparo de excisão de base; MMR = reparo de incompatibilidade de DNA. Após metilação das bases nitrogenadas pelo TMZ, tornam-se sensíveis quando MMR é expresso e ativo. Quando as proteínas MGMT, APNG e BER são expressas, as células GBM são resistentes ao TMZ. Uma boa resposta ao TMZ requer, portanto, MMR funcional e baixos níveis de MGMT

Fonte: Adaptado de Lee (2016).

2.4 Imunomodulação e imunomoduladores

Frente aos processos nociceptivos, inflamatórios ou tumorais, o SI, fundamental na defesa do corpo humano, possui vários mecanismos de defesa que

são classificados de acordo com a sua especificidade, apresentando assim uma grande variedade de células, diversos fatores solúveis, como citocinas, e um tecido linfóide com uma organização própria e características específicas. Todos estes componentes permitem uma resposta imunológica efetiva e bem coordenada, consoante a essas ou outras ameaças ao organismo (CARE, 2010).

É fato que o SI está envolvido em muitas doenças, incluindo condições que não eram tradicionalmente consideradas infecciosas, inflamatórias ou autoimunes, como câncer e doenças cardiovasculares. Nesse contexto, a imunomodulação compõe, atualmente, alvo importante do arsenal farmacológico. A imunomodulação remete à manipulação do SI e a todas as alterações terapêuticas voltadas ao aumento de respostas imunes, como por exemplo o bloqueio da proteína de morte celular programada tipo 1 (anti-PD-1, do inglês *programmed cell death protein-1*, voltado ao tratamento do melanoma) (MAHIMA et al., 2013; DEGUINE, 2018).

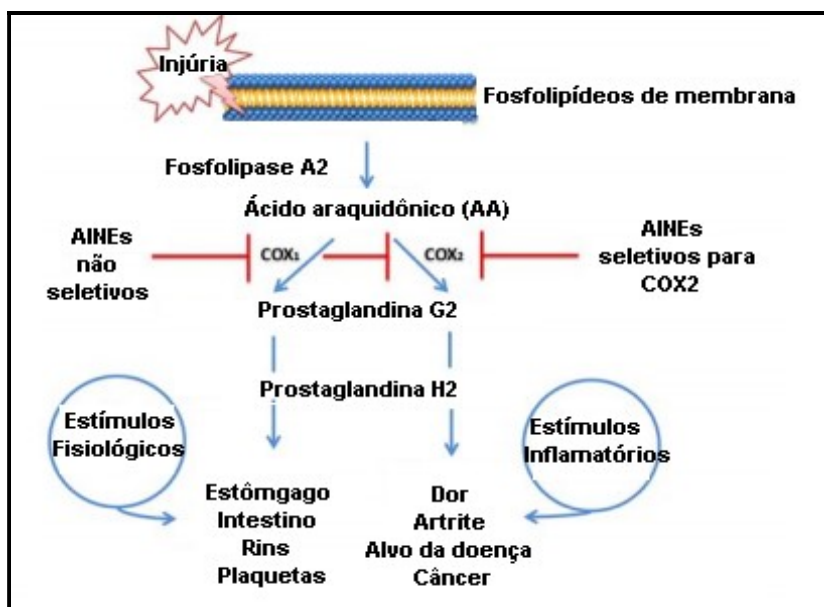
Diante da relevância e correlação entre o SI e o surgimento de inúmeras doenças, este se torna um alvo importante para prevenção, controle e tratamento (JANEWAY; TRAVERS; WALPORT; 2001). Inúmeras doenças são marcadas pela presença da inflamação e dor, com caráter agudo ou crônico. A inflamação precisa de mecanismos bem controlados que permitam promover o seu declínio. Este fenômeno do organismo se torna um problema grave quando envolve uma perda de tolerância e/ou de processos regulatórios, tendo assim a capacidade de promover dano irreparável para os tecidos do hospedeiro (CALDER et al., 2009).

A relevância, portanto, destas doenças inflamatórias no contexto de saúde pública é indiscutível, tendo em vista que o número de pessoas afetadas é elevado e que a prevalência de portadores vem aumentando ao longo dos últimos anos (ZIMMERMANN-FRANCO, 2017).

O tratamento para tais doenças requer, basicamente, o uso de medicamentos anti-inflamatórios. Para aquelas de curso rápido e fácil resolução geralmente são empregados os AINES. Dependendo de sua gravidade, pode ser indicado o uso dos AIEs, que estão relacionados a diversos efeitos secundários graves (CICCHITTI; MARTELLI; CERRITELI, 2015). Para os casos mais avançados, o uso de imunossupressores ou drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas ou biológicas pode ser requerido (SCHETT, 2007; MOTA et al., 2012; PAWAR et al., 2012; ZIMMERMANN-FRANCO, 2017).

Os AINEs constituem uma das classes de fármacos mais prescritas em todo mundo para tratamento da dor aguda, moderada e crônica decorrente de processo inflamatório. Apresentam efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos devido à inibição da enzima COX (Figura 12) (SANDOVAL et al., 2017).

Figura 12 – Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).

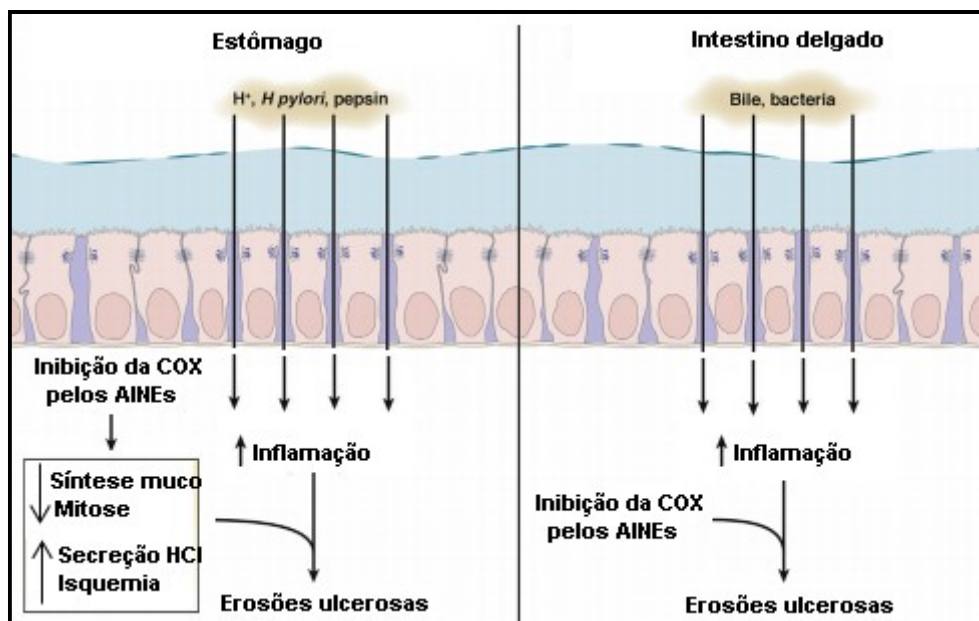


Notas: COX: cicloxigenase; AA = ácido araquidônico; AINEs = anti-inflamatórios não-esteroidais. Após injúria tecidual e conversão dos fosfolípidos de membrana a AA pela PLA2, as COX induzem mecanismos fisiológicos os quais são inibidos pelos AINEs.

Fonte: Adaptado de Scarim et al. (2017).

Com a inibição das isoformas da COX (1, 2 e 3), efeitos adversos são frequentemente observados, tais como: manifestações no trato gastrointestinal (úlceras, hemorragias, dispepsia, diarreia – comumente associados ao uso de AINES não-seletivos, Figura 13), alterações na pressão arterial, aumento do risco de doenças cardiovasculares, sendo este último também extensivo aos fármacos AINES seletivos para COX₂. Os medicamentos desta classe estão envolvidos em diversas interações medicamentosas e seu uso deve ser monitorado em pacientes idosos, portadores de doenças renais, cardíacas ou hepáticas, com histórico de hipertensão arterial, asma, rinite alérgica entre outros distúrbios. A toxicidade cumulativa e o risco de reações graves (ex. Síndrome de Stevens-Johnson) são algumas das razões para que estes agentes não sejam indicados em tratamentos em longo prazo (LAAR et al., 2012).

Figura 13 – Mecanismos de toxicidade gastrointestinal induzidos pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).



Notas: COX = cicloxigenase; HCl = ácido clorídrico; *H. pylori* = *Helicobacter pylori*; AINEs = anti-inflamatórios não esteroidais. A inibição das isoformas da COX 1 e 2 geram efeitos adversos frequentemente observados, na mucosa gástrica (úlceras, hemorragias e dispepsia) e no trato gastrointestinal (úlceras e diarreia).

Fonte: Adaptado de Bjarnason et al. (2018).

Os AIEs, devido ao seu potencial imunossupressor, têm sido empregados como adjuvantes efetivos no tratamento de diversas condições inflamatórias crônicas. No entanto, os efeitos adversos oriundos de longos períodos de uso, ainda que em doses terapêuticas, limitam sua utilização, pois acarretam distúrbios metabólicos, hiperglicemia, sarcopenia, hipertensão, osteoporose e imunossupressão, elevando o risco de infecções oportunistas, dentre outros (RIPA et al., 2018).

Outros fármacos com potente ação imunossupressora como a ciclofosfamida, a azatioprina e as ciclosporinas podem ser consideradas em casos mais graves; em especial, as doenças autoimunes tais quais psoríase avançada ou AR com manifestações extra-sistêmicas, bem como no tratamento do câncer. Estes fármacos apresentam elevada toxicidade, como: mielossupressão grave, aumento da ocorrência de infecções, esterilidade, toxicidade vesical e aumento da ocorrência de neoplasias (WISEMAN, 2016).

As DMCDs sintéticas também são indicadas como antitumorais além de serem empregadas no tratamento de doenças autoimunes (como a artrite) e para as doenças inflamatórias intestinais. Pertencem a esta classe: a hidroxiquina, sulfassalazina, leflunomida e o metotrexato (SHARP et al., 2000; SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000; AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, 2002; SAXNE et al., 2003; LEE et al., 2014). Apesar da eficácia destes medicamentos, inúmeros efeitos adversos e limitações de seu uso referentes a doenças pré-existentes já foram relacionados, como pode ser visto no Quadro 2.

Quadro 2 – Drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), seus principais efeitos adversos e limitações de seu uso.

DMCDs Sintéticas	Efeitos adversos	Limitações no uso
Hidroxiquina	Intolerância gastrointestinal (náuseas, vômitos, dor abdominal), hiperpigmentação da pele, cefaleia, tontura, miopatia e retinopatia. Indica-se monitoração oftalmológica regular (avaliação inicial e anual após cinco anos, ou anual desde o princípio, se houver fatores de risco: pacientes com disfunção renal ou hepática, com maculopatia, idosos ou dose cumulativa superior a 1000 g/ano)	Pacientes com alterações na retina e de campo visual, hipersensíveis a sulfas e sacilatos.
Sulfassalazina	Intolerância gastrointestinal (anorexia, náuseas, vômitos), exantema cutâneo, elevação de enzimas hepáticas, úlceras orais e mielossupressão (leucopenia com neutropenia). Podem ser observadas pneumonia de hipersensibilidade, manifestações neurológicas ou alterações da fertilidade masculina.	Pacientes portadores de porfíria, com obstruções do trato gastrointestinal ou geniturinário.
Leflunomida	Náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, alterações das enzimas hepáticas, exantema cutâneo e hipertensão arterial sistêmica.	Mulheres com risco de engravidar, gestantes e lactantes e pacientes portadores de insuficiência renal e hepatopatias.
Metotrexato	Anemia, neutropenia, náuseas e vômitos, mucosite e elevação de enzimas hepáticas e necessidade de reposição no ácido fólico.	Pacientes com insuficiência renal, hepatopatias, etilismo, supressão de medula óssea, mulheres em idade fértil com risco de engravidar.

Fontes: Adaptado de Sharp et al. (2000), Suarez-Almazor et al. (2000), *American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines* (2002), Saxne et al. (2003), Lee et al. (2014), Zimmermann-Franco (2017).

Existem ainda as DCMDs biológicas ou “novas DMCDs”, que são bloqueadores de TNF- α (adalimumabe, etanercepte e infliximabe), depletores de linfócito B (rituximabe), e antagonistas do receptor de IL-1 (Anankira) e IL-6 (tocilizumabe). Em geral, apresentam eficácia e segurança e são capazes de interferir em pontos de regulação imune alterados, modificando o curso de várias doenças autoimunes e reumatológicas. Além disso, as DMCDs biológicas são promissores alvos na terapia antitumoral. A indicação destes medicamentos é feita para os pacientes que persistem em curso inflamatório de uma doença apesar de já estarem em tratamento com outro medicamento ou combinações dos mesmos. As desvantagens, no entanto, dizem respeito ao custo elevado, a administração por via parenteral, a necessidade do paciente ser monitorado por um especialista e aos efeitos colaterais e reações adversas, destacando-se o maior risco de infecções devido ao efeito imunossupressor (BÉRTOLO et al., 2007; ROSMAN; SHOENFELD; ZANDMAN-GODDARD; 2013; WISEMAN, 2016).

Um ponto importante a ser observado é que, dependendo da doença, o uso de DMCDs deverá ser crônico, tendo em vista que eles são capazes apenas de reduzir as manifestações clínicas e incômodos relacionados à progressão da doença (ZIMMERMANN-FRANCO, 2017).

Uma revisão realizada por Bosma-den Boer, Van Wetten e Pruijboom (2012) destacou que os medicamentos atuais usados para tratar essas manifestações suprimem os sintomas, mas não promovem a resolução completa da doença, conduzindo a um baixo grau persistente. Os autores alegaram ainda que o uso crônico de anti-inflamatórios poderia impedir o organismo de promover uma recuperação completa como pode ocorrer em doenças como a síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença inflamatória crônica do intestino, doenças cardiovasculares e na AR.

Diante disso, torna-se evidente a necessidade de opções terapêuticas que otimizem o tratamento, induzindo menos efeitos colaterais e reações adversas e que sejam economicamente viáveis. Todas estas variáveis contribuem para uma melhor qualidade de vida dos pacientes portadores de doenças crônicas que dependem de imunomoduladores (ZIMMERMANN-FRANCO, 2017).

Desta forma, a busca por moléculas bioativas promissoras funciona como estímulo para os esforços da Química Medicinal voltados à síntese parcial ou total destes compostos, conhecidos como análogos (GUANTAI; CHIBALE, 2011).

Uma vantagem dos análogos sintéticos é poder oferecer uma fonte suplementar do composto de interesse, permitido sua produção em quantidades satisfatórias. Além disso, muitos desses análogos, com base nas relações estrutura-atividade, conseguem ser mais potentes e/ou superar dificuldades físico-químicas e barreiras biológicas apresentadas pelos seus protótipos (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; OCEAN; VAHDAT, 2004; GUTIERREZ-GUTIERREZ et al., 2010; GUANTAI; CHIBALE, 2011). Esta forma de investigação tem conduzido à identificação de diversos compostos estruturalmente relacionados a moléculas bioativas de diferentes classes químicas (HADI et al., 2013), como no presente estudo conduzido com o LASSBio-596, um análogo derivado do fármaco imunomodulador talidomida.

2.5 Talidomida

Segundo levantamento realizado por Botelho, Martins e Reis (2018) acerca da análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde (SUS), os antineoplásicos e imunomoduladores configuram entre os grupos farmacológicos com maior registro nos últimos anos, o que demonstra ascensão, necessidade e prioridade no planejamento, investigação e lançamento de novos medicamentos com essas propriedades terapêuticas.

A talidomida é um potente imunomodulador com propriedades anti-inflamatórias, cujo uso clínico é voltado ao tratamento de distúrbios como: eritema nodoso leproso, AR e doença de Crohn (MALLEO et al., 2008; ITO et al., 2010; MAZZOCCOLI et al., 2012). Além disso, a constatação da atividade antiangiogênica da talidomida conduziu à hipótese da mesma ser empregada no tratamento de doenças dependentes de angiogênese, como no câncer (RIVA et al., 2007; HASSLER et al., 2015).

A angiogênese é uma das principais características da patogenia dos gliomas malignos. A regulação negativa da trombospondina (um inibidor da angiogênese) e a superexpressão de fatores que promovem nova formação vascular como o VEGF, fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), culminam na maior agressividade dos gliomas. Além disso, a expressão dos receptores que estão diretamente envolvidos na resposta angiogênica e se encontram intimamente relacionados à presença das

enzimas COX₂ e tumores malignos também amplificam essa resposta (PERDIKI et al., 2007).

Entre os fármacos antiangiogênicos, a talidomida inibe a atividade angiogênica do b-FGF e do TNF- α , uma citocina necessária para deflagração da inflamação e, conseqüentemente, à neovascularização, produzida por monócitos e macrófagos. Além disso, ocorre uma resistência ao processo angiogênico devido ao efeito inibitório da talidomida sobre o VEGF e fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), como esperado por fármacos antiangiogênicos (MACPHERSON et al., 2003; ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004).

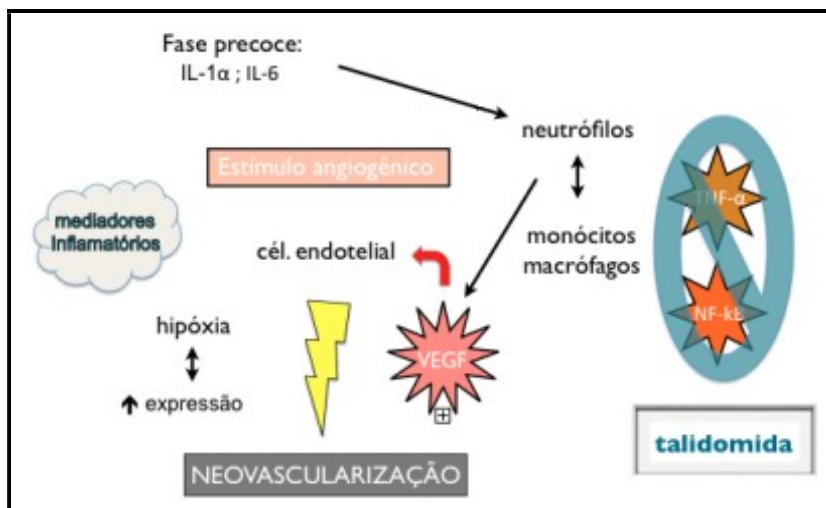
Acredita-se, também, que o fator nuclear *kappa* B (NF-kB) controla, em parte, a atividade da talidomida. O TNF- α induz a ativação do NF-kB que, quando ativado, regula a expressão de vários genes envolvidos na proliferação celular, inflamação, angiogênese e inibição da apoptose, a saber VEGF e IL-8. Assim, postulou-se que o efeito antiangiogênico da talidomida é atribuído a uma sequência de acontecimentos que finaliza com a inibição indireta da neovascularização. Esta sequência de eventos se inicia com o efeito inibitório da talidomida sobre TNF- α , que, inibido, suprime a ativação de NF-kB e dos demais genes, especialmente os que codificam VEGF, limitando a formação de novos vasos (Figura 14) (MACPHERSON et al., 2003; RIBEIRO et al., 2011).

A associação da talidomida com TMZ tem se demonstrado promissora quando utilizada em pacientes com gliomas de alto grau, gerando uma nova alternativa na terapia antitumoral, combinando um fármaco antiangiogênico com um agente alquilante em pacientes com GBM recém-diagnosticados, principalmente na recidiva (RIVA et al., 2007; HASSLER et al., 2015). Talidomida e TMZ induzem diferentes mecanismos de atividade, não sobrepostos. A primeira como um agente citostático para prevenir a progressão do tumor mediada pela formação neovascular, enquanto a TMZ atua como agente citotóxico, inibindo crescimento de glioma celular residual (STUPP et al., 2002).

Embora a talidomida produza uma melhora sintomática e constitua uma opção adjuvante no tratamento do GBM, ela pode causar alguns efeitos adversos que variam de sintomas toleráveis (sonolência, constipação, erupção cutânea e fadiga, observados em até 75% dos pacientes) aos mais graves: neuropatia periférica, bradicardia e eventos trombóticos. Apesar da alta freqüência de efeitos

adversos, os mais graves, que resulta na descontinuação do tratamento, são observados em 10-15% dos pacientes (SINGHAL; MEHTA, 2001).

Figura 14 – Representação esquemática e simplificada do mecanismo antiangiogênico da talidomida.



Notas: IL = interleucina; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; TNF- α = fator de necrose tumoral *alfa*; NF- κ B = fator nuclear *kappa* B. O TNF- α induz a ativação do NF- κ B que, quando ativado, regula a expressão de vários genes envolvidos na proliferação celular, inflamação, angiogênese e inibição da apoptose, a saber VEGF e IL-8. Assim, o efeito antiangiogênico da talidomida é atribuído a uma sequência de eventos que finaliza com a inibição indireta da neovascularização. Esta sequência de eventos se inicia com o efeito inibitório da talidomida sobre TNF- α , que, inibido, suprime a ativação de NF- κ B e dos demais genes, especialmente os que codificam VEGF, limitando a formação de novos vasos

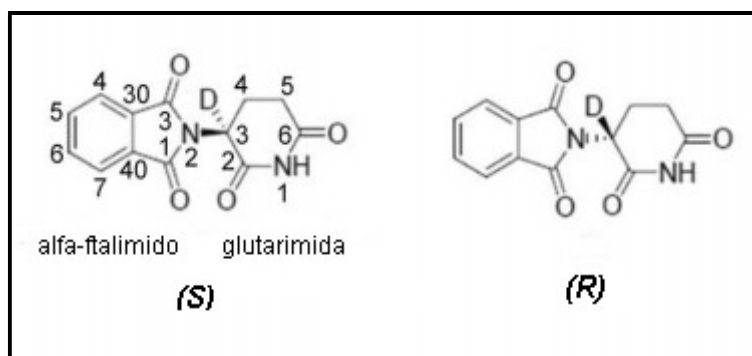
Fonte: Adaptado de Ribeiro (2011).

A fim de melhorar as propriedades farmacocinéticas da talidomida e reduzir a incidência de efeitos colaterais, novos derivados com eficácia comparada na modulação de respostas inflamatórias e com melhor perfil de segurança estão sendo investigados. Alguns análogos têm demonstrado resultados cada vez mais promissores (CORRAL et al., 1999; ALMEIDA et al., 2007; MAZZACCOLI et al., 2012). Os primeiros estudos com análogos da talidomida procuraram a relação entre estrutura química e atividade biológica (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

A talidomida [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1*H*-isoindol-1,3-(2*H*)-diona] é um composto sintético α -ftalimido-glutarimida, que possui um centro quiral (o átomo de carbono C3 do anel glutarimida) e compreende uma mistura racêmica de dois isômeros ópticos, enantiômeros (R)- (também (+) -) e (S)- (também (-) -) (Figura 15).

Os enantiômeros (R) e (S) são responsáveis pelos efeitos sedativos e teratogênicos, respectivamente. Essa idéia foi refutada pelos achados de que o enantiômero (R) também é teratogênico em um modelo utilizando coelhos (BARTLETT; DREDGE; DALGLEISH, 2004; FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004) e que a interconversão dos enantiômeros poderia ocorrer sob condições fisiológicas (NISHIMURA; HASHIMOTO; IWASAKI, 1994; ERIKSSON et al., 1995; BJORKMAN et al., 1998). No entanto, vários relatos, incluindo alguns descrevendo o uso de análogos de talidomida de configuração estável, mostraram que o enantiômero (S) é mais teratogênico e eficaz na inibição do TNF- α em comparação com o enantiômero (R) (NISHIMURA; HASHIMOTO; IWASAKI, 1994; WNENDT et al., 1997; TEO et al., 2003).

Figura 15 – Enantiômeros da talidomida.



Notas: (S) = do latim, *Sinister* = esquerda; (R) = do latim, *Rectus* = direita. Enantiômeros S e R da talidomida.

Fonte: Mori et al. (2018).

Apresentada nos anos 1950 com propriedades anti-eméticas e sedativas, a talidomida foi posteriormente proibida por seus efeitos deletérios, e nos últimos anos tem sido indicada no tratamento de pacientes com doenças como o câncer (MORO; INVERNIZZI, 2017). Novos usos deste fármaco estão sendo pesquisados e implementados atualmente, bem como modificações estruturais têm sido realizadas nos grupamentos ftalimídicos e glutarimídicos (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001) a fim de otimizar a terapia.

Sabe-se que alterações na subunidade ftalimídica reduzem a liberação de TNF- α (COLLIN et al., 2001; LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001; MACHADO et al., 2005; MAZZACCOLI et al., 2012). No estudo de Mazzaccoli et al. (2012), os

análogos da talidomida com estrutura aberta ftalimídica não só reduziram os níveis de TNF- α , mas também diminuíram a síntese de IL-12 e IL-1 β de monócitos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS).

Num estudo anterior, realizado por Almeida et al. (2007) foi demonstrado que análogos da talidomida contendo diaminas e estruturas abertas de ftalimida com a inserção do grupamento nitro (-NO₂) inibiram *in vitro* a produção de TNF- α , IL-12, interferon-gama (IFN- γ), IL-6, ligantes de quimiocina 9 e 10 (CXCL9, CXCL10) e (grupamentos de diferenciação 80) CD80 em macrófagos J774. O que corrobora os achados de Costa et al. (2015) com dois análogos: um com dupla substituição com grupamentos nitro e outro duplamente substituído com grupamentos carboxi (-COOH) os quais apresentaram atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras ao inibirem TNF- α e IL-6.

Talaat et al. (2015) também observaram que análogos ditiocarbamato e ditioato da talidomida exibiram atividades anti-inflamatórias mais pronunciadas do que a própria talidomida.

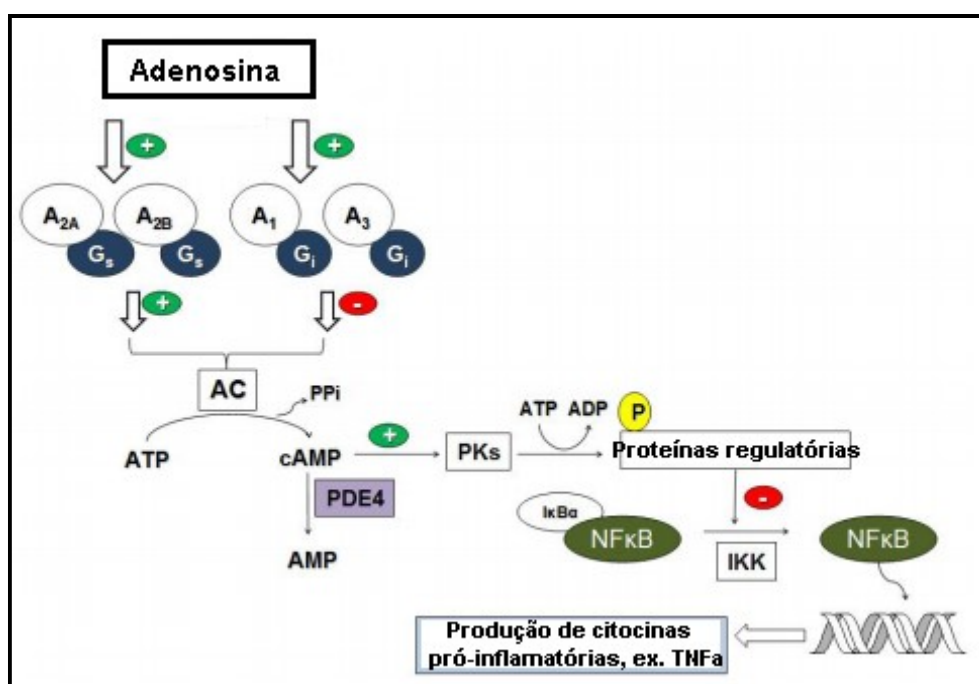
Assim, diante da utilidade da talidomida como um fármaco com atividades antiangiogênica, anti-inflamatória e imunomoduladora, novas pesquisas surgiram no intuito de descobrir fármacos com propriedades símeis, mas com capacidade de minimizar seus eventuais efeitos adversos, assim como anular seu clássico efeito teratogênico (RIBEIRO, 2011).

2.6 LASSBio-596: um análogo da talidomida

Dentro de uma perspectiva que visa a identificação de novos candidatos a fármacos imunomoduladores, uma possível estratégia de desenvolvimento de protótipos de fármacos está relacionada à modulação da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e guanosina monofosfato cíclica (GMPc) envolvidas no processo inflamatório. Esses segundos mensageiros ativam proteínas como as quinases A e G (PKA e PKG, respectivamente) que regulam diversas respostas fisiológicas. Seus níveis intracelulares são controlados pelas enzimas fosfodiesterases (PDE), de maneira que a inibição de PDE provoca aumento dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc, exibindo assim um efeito anti-inflamatório e imunomodulador significativo, associados à supressão de células imunes e inflamatórias (ESSAYAN, 2001).

Na resposta inflamatória, a ativação dessas quinases impede que fatores transcricionais, como o NF- κ B, promovam a expressão de genes codificadores de citocinas. Assim, agentes que estimulam a formação do AMPc ou impedindo a sua degradação, inibem citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α e IL-1 β), resultando num efeito imunossupressor (Figura 16) (CHUNG, 2006).

Figura 16 – Modulação do AMPc na resposta inflamatória.



Notas: AC = adenilato ciclase; ATP = trifosfato de inositol; cAMP = monofosfato de adenosina cíclica; PDE4 = fosfodiesterase 4; PKs = proteínas quinases; Pi = fosfato inorgânico; IKK = quinase I κ B; TNF- α = fator de necrose tumoral *alfa*; NF- κ B = fator nuclear *kappa* B. AMPc e GMPc ativam PKA e PKG, respectivamente, que regulam diversas respostas fisiológicas. Seus níveis intracelulares são controlados pelas enzimas PDEs, de maneira que a inibição de PDE provoca aumento dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc, exibindo assim um efeito anti-inflamatório e imunomodulador significativo, associados à supressão de células imunes e inflamatórias. Na resposta inflamatória, a ativação dessas quinases impede que fatores transcricionais, como o NF- κ B, promovam a expressão de genes codificadores de citocinas.

Fonte: Adaptado de Barbosa et al. (2011).

Nesse contexto, protótipos de fármacos capazes de modular os níveis intracelulares de AMPc e GMPc emergem como boas estratégias (LIPWORTH, 2005; CHUNG, 2006; JACOBSON; GAO, 2006).

O LASSBio-596 (ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzoico), foi racionalmente planejado como um híbrido da talidomida, sildenafil (inibidor seletivo da PDE5) e arilsulfonamida (protótipo inibidor seletivo da PDE4) e exibe importantes propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Figura 17) (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001; ROCCO et al., 2003; CAMPOS et al., 2006).

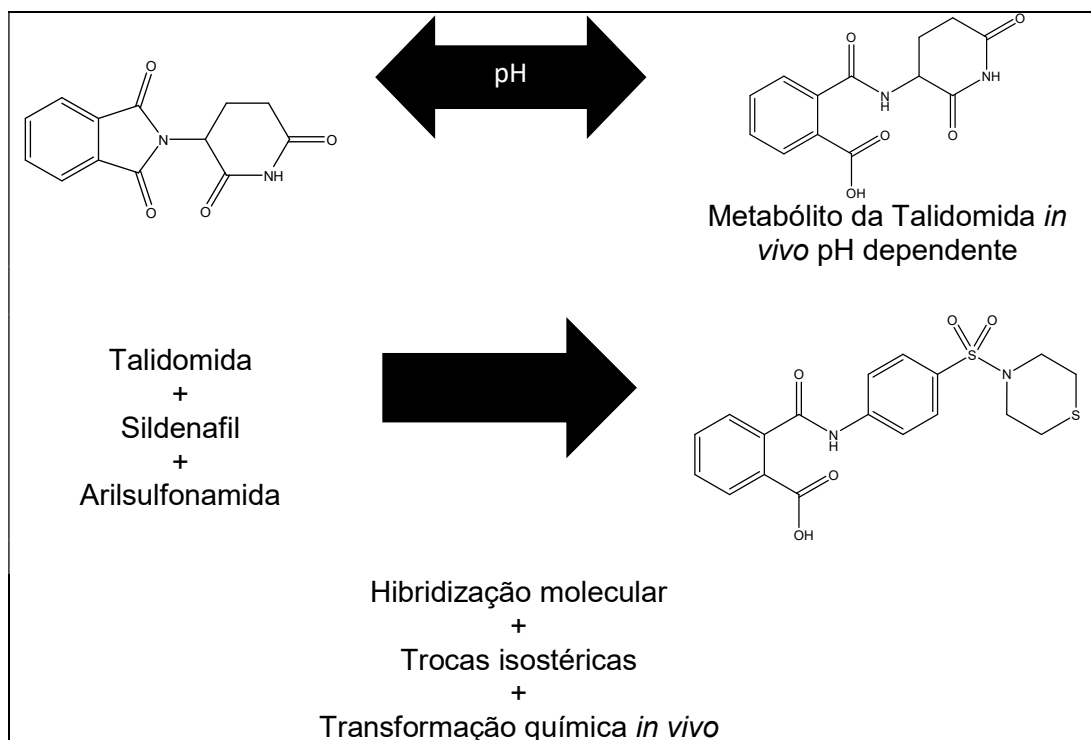
Esse análogo da talidomida, obtido através de reações de hidrólise, não possui o anel ftalimida (responsável pelo efeito teratogênico da talidomida), sugerindo a ausência de uma eventual teratogenia deste novo composto (LIMA; DE LIMA, 2009). Análogos da talidomida com estrutura aberta ftalimídica induziram a supressão de TNF- α , IL-12 e IL-1 β , conforme já descrito anteriormente (MAZZACCOLI et al., 2012) condizente ao planejamento original como agente anti-TNF- α .

Assim, estudos farmacocinéticos e toxicológicos pré-clínicos com LASSBio-596 foram realizados, visto que a avaliação farmacocinética nessa fase é importante para determinar os parâmetros que caracterizam a absorção (biodisponibilidade), distribuição (volume de distribuição) e eliminação (depuração e meia-vida), que informam como o fármaco é processado pelo organismo, bem como avaliar os possíveis efeitos deletérios que determinarão a segurança deste análogo (ROCCO et al., 2010).

LASSBio-596 demonstrou-se biodisponível quando administrado pela via oral com tempo de meia-vida curto, semelhantemente ao observado por via intravenosa, boa distribuição entre os tecidos, especialmente hepático, que pode estar relacionada com a elevada vascularização desse órgão, com um *clearance* renal favorável (SCHARGEL; WU-PONG; YU, 2005; CATTANI et al., 2009). O derivado não induziu mortes em roedores nos ensaios de toxicidade aguda (em dose 200 vezes superior a necessária ao efeito antiasmático) e toxicidade crônica (em doses até 25 vezes maior àquela necessária ao efeito), tampouco induziu efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos em estudos *in vitro* (ARAÚJO et al., 2014).

Em 2001, Lima, Fraga e Barreto mostraram que o LASSBio-596 modula o processo inflamatório *in vitro* inibindo o recrutamento de neutrófilos induzido por LPS, correlacionado ao seu efeito anti-TNF- α .

Figura 17 – Estruturas químicas da talidomida, seu metabólito e do LASSBio-596.



Notas: Radical A representa radical da talidomida que de acordo com o pH se transforma em radical A' *in vivo*. Radical A' se mantém na estrutura química do LASSBio-596. LASSBio-596 que possui a subunidade ftalimida aberta na sua porção lateral, grupamento arilsulfonamida medial (anti-PDE4) e na outra extremidade um anel heterocíclico substituído oriundo do sildenafil (anti-PDE5).

Fonte: Ribeiro (2011).

Dois anos depois, Rocco et al. (2003) testaram LASSBio-596 num modelo de inflamação pulmonar e concluíram que o tratamento intraperitoneal (i.p.) (10 mg/kg) inibiu a neutrofilia pulmonar, bem como a liberação de TNF- α e a bronconstrição, demonstrando também efeito protetor contra a formação de edema pulmonar. Corroborando, assim, os achados futuros de Padilha et al. (2015) num modelo de enfisema induzido por elastase. Após oito dias de tratamento i.p. (10 mg/kg) com LASSBio-596, os animais apresentaram diminuição do teor de fibras colágenas, aumento do teor de fibras elásticas, redução do número de macrófagos M1 e diminuição de TNF- α , IL-1 β , IL-6 dentre outras citocinas.

Os estudos pré-clínicos iniciais conduzidos com LASSBio-596 sugeriram, portanto, futuro promissor a este protótipo aquiral de estrutura simples e original, credenciando a continuidade das pesquisas (ROCCO et al., 2010).

Carvalho et al. (2010) e Casquilho et al. (2011) estudaram o efeito do LASSBio-596 no modelo de inflamação pulmonar e hepática induzida por microcristalina-LR (toxina produzida por cianobactérias), constatando que os tratamentos i.p. (10 mg/kg) e oral (v.o.) (50 mg/kg) reduziram o prejuízo funcional pulmonar agudo, bem como preveniram a inflamação pulmonar e deterioração do fígado.

Partindo do princípio das propriedades anti-inflamatórias e do fato do LASSBio-596 ser quimicamente derivado da talidomida, com importante ação farmacológica supressora sobre TNF- α e outros mediadores inflamatórios, Ribeiro et al. (2011) investigaram os efeitos desse híbrido na angiogênese inflamatória. Os autores observaram que a aplicação tópica de LASSBio-596 (1%) em colírio, três vezes ao dia, apresentou potencial efeito inibitório sobre a angiogênese corneana inflamatória de coelhos.

Silva et al. (2016), num outro modelo para doenças respiratórias, avaliaram a coadministração de surfactante com LASSBio-596 a fim de reduzir a inflamação e edema pulmonar. A associação reduziu o teor de fibras colágenas, número total de células e neutrófilos do lavado, o teor proteico no lavado bronquioalveolar e a tensão superficial, conforme esperado.

Diante dos resultados promissores descritos e visando eficácia significativa com menos efeitos adversos comparados aos seus protótipos, o presente estudo objetivou testar o híbrido LASSBio-596 em modelos *in vivo* de nocicepção e inflamação e *in vitro* com glioblastoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do derivado da talidomida, LASSBio-596, em modelos experimentais *in vivo*, e antitumoral em modelos *in vitro* para glioblastoma.

3.2 Objetivos específicos (Capítulo I)

- Avaliar a atividade antinociceptiva periférica do LASSBio-596 no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina;
- Avaliar a atividade antinociceptiva central do LASSBio-596 nos modelos de nocicepção induzida por glutamato e placa quente (*hot plate*);
- Avaliar a performance motora dos animais pós-tratamento com LASSBio-596 no modelo de barra giratória;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória aguda do LASSBio-596 no modelo de peritonite induzida por zymosan;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória crônica do LASSBio-596 no modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund;
- Quantificar e correlacionar as principais citocinas pró-inflamatórias no ensaio da artrite como tratamento com LASSBio-596;
- Analisar macroscopicamente e microscopicamente as patas e órgãos de camundongos tratados com LASSBio-596 no modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund.

3.2 Objetivos específicos (Capítulo II)

- Avaliar a viabilidade celular de células de GBM02 humanas após o tratamento com LASSBio-596 em diferentes tempos e concentrações;
- Avaliar a viabilidade celular de leucócitos humanos após o tratamento com LASSBio-596 em diferentes concentrações.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo I - LASSBio-596, New Thalidomide Hybrid, Induces Antinociceptive and Antirheumatic Effects on Mice



INNS: 0360-3997

Impact-factor: 2.884

LASSBio-596, New Thalidomide Hybrid, Induces Antinociceptive and Antirheumatic Effects on Mice

Max Denisson Maurício Viana¹, Alyne Almeida de Lima¹, Geraldo José da Silva Neto¹, Suellen Maria Albuquerque da Silva¹, Anderson Brandão Leite¹, Lídia Moreira Lima², Eliezer Jesus Barreiro², Elane Conceição dos Santos³, Ênio José Bassi³, Eliane Aparecida Campesatto¹, Magna Suzana Alexandre Moreira¹

¹Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LaFI, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió 57072-900, AL, Brasil.

²Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – LASSBio, Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68024, Rio de Janeiro 21944-902, RJ, Brasil.

³Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia – LAPEVI, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió 57072-900, AL, Brasil.

Abstract: Painful and inflammatory disorders are significant health problems because of its prevalence and the disabilities it can induce. Drugs to treat these diseases induce significant side effects which highlights the need for therapeutic alternatives that optimize treatment, providing better clinical results, safety, and also being economically feasible. Originally designed as hybrid of an anti-TNF agent and a PDE inhibitor (PDE-4 and PDE-5), LASSBio-596 is a thalidomide derivative which has been reported as efficacy pharmacological agent against respiratory disorders. In this regard, the aim of this work was to evaluate the pharmacological effect of

LASSBio-596 in murine models of nociception and rheumatoid arthritis. The first test performed was acetic acid-induced writhing. In this assay, LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) inhibited the writhing response by 39.9%. Afterward, neurogenic and inflammatory pains were evaluated using the formalin-induced nociception assay, in which reduced paw licking time at first phase by 25.7%, while second phase, 23.9%. In addition, in order to identify any possible central antinociceptive activity, the hot-plate test was carried out and the animals treated with LASSBio-596 increased latency time at 90 and 120 minutes. Moreover, corroborating this finding, the treatment with LASSBio-596 decreased the glutamate-induced nociceptive response by 31.9%. In acute inflammation model of zymosan-induced peritonitis, LASSBio-596 decreased cell recruitment by 39.9%. Whereas, in the chronic inflammation induced by complete Freund's adjuvant, this analogue decreased paw edema since 14th day of treatment until 21st day, differently of your prototype drug, without splenic impairment. Furthermore, in this model, LASSBio-596 decreased serum levels of IL-17A, IFN- γ , and TNF- α by 79.0%, 55.4%, and 67.1%, respectively, as expected from rational planning of this molecule. Given that previous experiments are based on animal behaviour and to rule out any action of LASSBio-596 in motor coordination, rotarod test was performed in which it did not induce motor impairment. These data demonstrated the antinociceptive effect of LASSBio-596 and reinforces its anti-inflammatory property in a model of chronic autoimmune disease (i.e., rheumatoid arthritis), which amplify the therapeutic potential of this molecule.

Keywords: LASSBio-596; thalidomide; anti-nociceptive; anti-inflammatory; anti-arthritic.

Introduction

Painful disorders are significant health problems because of its prevalence and the disabilities it can induce. Tissue damage produces a range of inflammatory mediators that in turn activate or sensitize nociceptors to elicit pain at the site of injury (BASBAUM et al., 2009). Pain and inflammation are physiological processes often associated. According International Association for the Study of Pain (IASP), pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage (IASP, 2012). While

inflammation is an immunologic response to homeostasis disturbance, characterized by leukocyte mobilization and vascular alterations (MEDZHITOV, 2010). Inflammatory pain is a hallmark of many rheumatic diseases, as rheumatoid arthritis, an autoimmune disease with joint inflammation initially (SMOLEN et al., 2018).

Drugs to treat inflammatory disorders possess significant side effects. Non-steroidal anti-inflammatory drugs used to reduce pain and inflammation in many patients (acutely and chronically) cause gastrointestinal, cardiovascular and renal toxicity (BJARNASON et al., 2018). While glucocorticoids, potent immunosuppressive and anti-inflammatory drugs, can induce metabolic and endocrine disturbance (RIPA et al., 2018). Currently, treatment with immunobiological drugs (e.g., anti-cytokines drugs) for inflammatory and autoimmune diseases are growing despite more knowledge about their effectiveness and safety is necessary (DEGUINE, 2018).

In view of this, the need for therapeutic alternatives that optimize treatment, providing better clinical results, fewer side effects and adverse reactions, and also being economically feasible becomes evident. All these variables together contribute to a better quality of life for patients with chronic diseases that depend on immunomodulators (ZIMMERMANN-FRANCO, 2017). In this way, the identification of promising bioactive molecules acts as a stimulus for efforts in Medicinal Chemistry aimed at the partial or total synthesis of these compounds, known as analogues (GUANTAI; CHIBALE, 2011).

Originally designed as an anti-TNF agent and PDE inhibitor (PDE-4 and PDE-5), 2-[4-(1,4-thiazinan-4-ylsulfonyl) phenylcarbamoyl] benzoic acid, LASSBio-596 is a thalidomide derivative (LIMA et al., 2001), which possess pharmacological actions against pulmonary disorders (CAMPOS et al., 2006; LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2018; PADILHA et al., 2015; ROCCO et al., 2003). In this regard, the aim of this work was to evaluate the pharmacological effect of LASSBio-596 in murine models of nociception and acute and chronic inflammations.

Methods

Animals

Swiss mice of both sexes with 6 - 8 weeks of age, weighting 25 - 30 g, were obtained from Central Bioterium – Federal University of Alagoas (Maceió, Brazil). They were housed in single-sex cages under a 12-h light/dark cycle (dark phase: 19:00-7:00), at constant temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) conditions with water and food *ad libitum*. The experiments were performed after the approval by Ethics Committee-UFAL for animal handling (Protocol N° 041/2017).

Chemicals

Thalidomide and LASSBio-596 were synthesized and afforded by the Laboratory of Evaluation and Synthesis of Bioactive Substances (LASSBio®) at the Federal University of Rio de Janeiro. The following substances were used: acetic acid A.R. (Vetec, BR); glutamate (Sigma-Aldrich); formaldehyde A.R (Vetec, BR); zymosan (Sigma-Aldrich); complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich); dipyrone (Sigma-Aldrich), indomethacin (Merck), morphine (Cristália, BR), diazepam (Cristália, BR), and dexamethasone (Fagron, BR). Dipyrone, indomethacin, morphine, and dexamethasone were used as reference drugs. For oral administration (p.o.), thalidomide and LASSBio-596 were emulsified with polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80®, 0.01% (v/v) in saline (0.9% NaCl), Sigma-Aldrich) in distilled water, which was also used to treat the negative control groups (vehicle). All chemical-containing solutions were made fresh daily and were administered at 10 mL/kg of body weight.

Acetic acid-induced nociception

Abdominal writhing in mice was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid (0.6% solution, 0.1 mL/10 g). Animals were treated with LASSBio-596 (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.), thalidomide (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.), dipyrone (40 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) 40 minutes before nociceptive stimulus. The writhing response was determined for 20 minutes after a latency period of 5 minutes (COLLIER et al., 1968).

Glutamate-induced nociception

After 40 min of treatment with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), thalidomide (50 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.), a volume of glutamate

solution (20 μ L - 30 μ mol/paw) was injected in the ventral surface of the right hindpaw. Animals were observed individually for 15 minutes after nociceptive stimulus to record the time that they spent licking the injected paw (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Formalin-induced nociception

Mice were treated with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), thalidomide (50 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) 40 minutes before intraplantar injection of 2.5% formalin solution (20 μ L) into the right hind paw of the animal. The nociceptive response was the time in which the animals spent licking the injected paw. The first 5 minutes are considered the neurogenic phase and inflammatory phase lasting between 15 and 30 minutes after the injection of formalin (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Hot-plate test

Different groups of animals received LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), thalidomide (50 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.). After 40 min, the mice were placed on a hot plate maintained at $54 \pm 1^\circ\text{C}$, separated by a 30-minutes interval. After treatment, the reaction time when the animals licked their fore and hind paws and jumped was recorded at 30, 60, 90 and 120 minutes. The cut-off time used to prevent skin damage was 15 seconds (KURAISHI et al., 1983).

Rotarod test

The animals were pre-selected from two training sessions 24 and 48 hours prior to test. For this test, a bar of 3.0 cm in diameter and 50 cm in length, rotating at 16 rpm at a height of 25 cm, for 4 minutes, was used. Groups of pre-selected animals were treated with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), thalidomide (50 mg/kg, p.o.), diazepam (1.5 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.). Sixty and forty minutes after i.p. and p.o. treatments, respectively, the animals were placed with all four paws into the bar and the number of falls and latency to fall were evaluated. The maximum time allowed was 4 minutes (DUNHAM; MIYA, 1957).

Zymosan-induced peritonitis

Leukocyte migration was induced by intraperitoneal injection of zymosan (2 mg/mL, 250 μ L/animal), after forty minutes of the LASSBio-596 (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.),

thalidomide (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.), indomethacin (30 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) treatments. Six hours after zymosan injection, mice were euthanized and the peritoneal cavity was washed with cold PBS (3.0 mL, i.p.), and after gentle manual massage, the exudate was retrieved. The number of recruited cells to the peritoneum was counted in a Neubauer chamber (DOHERTY et al., 1985).

Arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA)

CFA (0.02 mL/paw) was injected into the right paw of the mice. After 13 days, animals with pronounced arthritis were treated with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), thalidomide (50 mg/kg, p.o.), dexamethasone (1 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) from the 14th to the 21st days after immunization. The paw volumes were measured on the 1st day followed by a daily assessment from 14th to the 21st day. The measured values were expressed by the variation of the mean between the right (arthritic) and left paws (without induction) using a digital plethysmometer (LE 7500; Panlab, Harvard Apparatus) (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). On the 21st day, the animals were euthanized and paws and liver were removed to macroscopical and histological analysis. Additionally, the serum was withdrawn to measure cytokines levels (TNF- α , INF- γ , and IL-17A) by cytometric bead array (CBA) approach according to manufacturer's instructions (BD[®] CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, California, US)

Histology

The samples were processed according to Akramas et al. (2017). Paws and livers were excised followed by routine neutral formalin fixation, decalcification, and paraffin embedding. Paraffin beeswax tissues were prepared for sectioning at 5- μ m thickness by microtome. The obtained tissue sections were collected on glass slides, deparaffinized, and stained with hematoxylin–eosin for histopathological examination. During the processing and analysis of tissues, the pathologist was blinded to the animal groups and the treatments.

Statistical analysis

Data obtained from experiments were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical differences between the treated and control groups were evaluated by ANOVA followed by Dunnett's test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of LASSBio-596 in acetic acid-induced nociception

The results depicted in Fig. 1 show that oral treatment with LASSBio-596 (at 50 mg/kg) reduced abdominal constrictions induced by the intraperitoneal injection of acetic acid in mice by 39.9% when compared to control group (48.6 ± 4.0 writhes). This effect was similar to its prototype, thalidomide (50 mg/kg, p.o., 41.6% of inhibition). The standard drug, dipyrene (40 mg/kg, p.o.), also reduced the writhing by 63.0%. Besides, treatment with 5 and 10 mg/kg (p.o.) of LASSBio-596 and thalidomide did not affect the nociception effect of acetic acid. Thus, in the following nociception experiments only dose of 50 mg/kg was used.

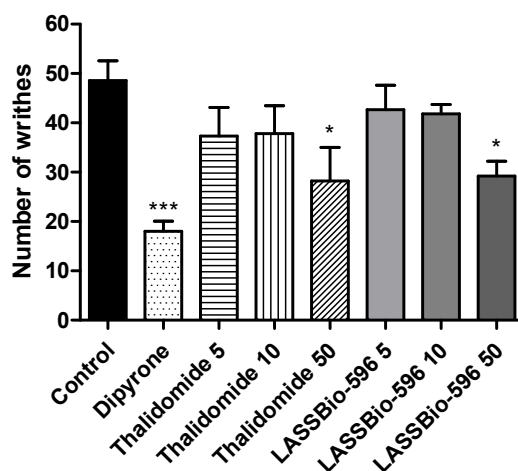


Fig. 1. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the number of writhes in acetic acid-induced nociception assay. Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); dipyrene (40 mg/kg, p.o.); thalidomide (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (5, 10, and 50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the mean $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in glutamate-induced nociception

In glutamate-induced nociception, LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) decreased the nociceptive response in mice by 31.9% when compared to control group (134.0 ± 12.8 s). The standard drug, morphine (5 mg/kg, i.p), and thalidomide (50 mg/kg, p.o.) reduced the paw licking time by 73.2% and 51.9%, respectively (Fig. 2).

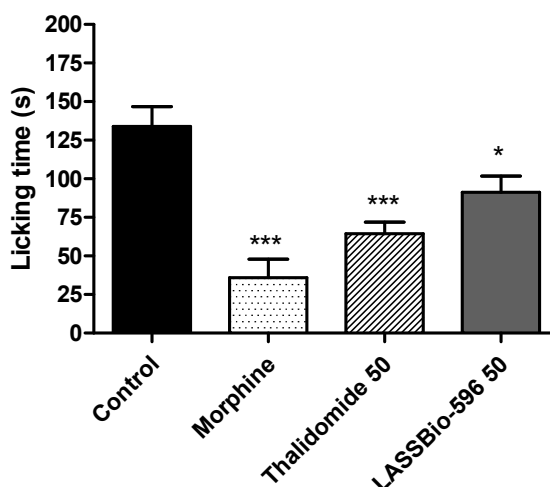


Fig. 2. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the licking time (in seconds) in glutamate-induced nociception assay. Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); morphine (5 mg/kg, i.p.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the mean $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in formalin-induced nociception

The evaluated nociception parameter was inhibited by LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) in both phases of formalin test. At first phase, LASSBio-596 reduced paw licking time of mice by 25.7% (control group: 59.8 ± 3.0 s) (Fig. 3A), while in the second phase, the nociceptive response was inhibited by 23.9% (control group: 196.9 ± 6.0 s) (Fig. 3B). In addition, thalidomide (50 mg/kg, p.o.) also decreased the licking time in both phases (1st: 40.3% and 2nd: 33.2% of inhibition), as well as, the treatment with morphine, 5 mg/kg, i.p. (1st: 62.2% and 2nd: 42.4% of inhibition) (Fig. 3).

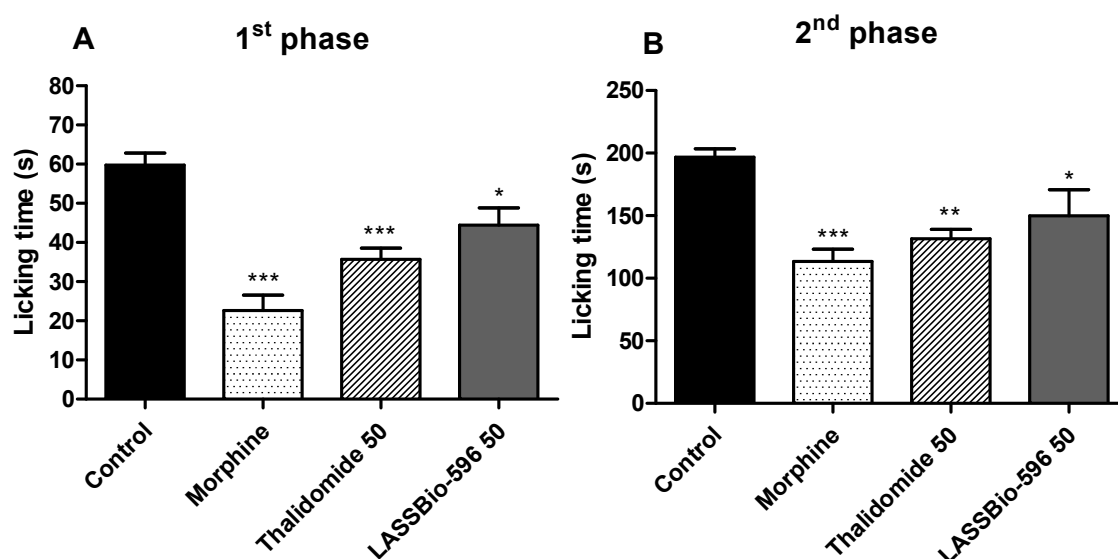


Fig. 3. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the licking time (in seconds) in formalin-induced nociception assay. **A:** 1st phase (neurogenic phase); **B:** 2nd phase (inflammatory phase). Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); morphine (5 mg/kg, i.p.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the mean $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in hot plate test

Central nociception was assessed by hot plate test. The treatment with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) increased latency time of mice at 90 and 120 min, while thalidomide (50 mg/kg, p.o.) did not alter this parameter. In addition, morphine (5 mg/kg, i.p.) also increased latency time of mice (Fig. 4).

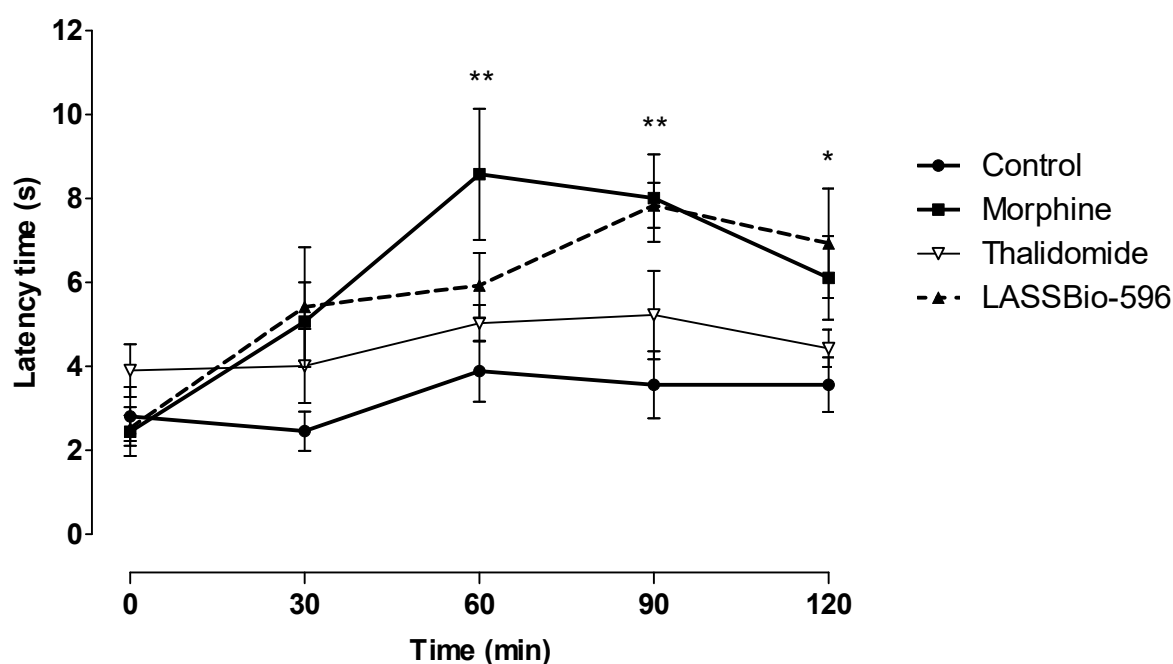


Fig. 4. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the latency time (in seconds) in hot plate test. Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); morphine (5 mg/kg, i.p.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the means $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in rotarod test

To assess impairment in mice motor behavior, rotarod test was performed. As showed at Table 1, LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) did not alter fall numbers and fall latency when compared to control group, similar to its prototype thalidomide (50 mg/kg, p.o.). On the other hand, diazepam (1.5 mg/kg, i.p.), an anxiolytic-sedative drug, increased fall numbers and decreased fall latency when compared to control (Table 1).

Treatment	Fall numbers	Fall latency (s)
Control	0.0 $\pm$ 0.0	240.0 $\pm$ 0.0
Diazepam	25.16 $\pm$ 2.96***	2.37 $\pm$ 0.49***
Thalidomide 50	0.0 $\pm$ 0.0	240.0 $\pm$ 0.0
LASSBio-596 50	0.0 $\pm$ 0.0	240.0 $\pm$ 0.0

Table 1. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the motor performance in rotarod test. Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); diazepam (1.5 mg/kg, i.p.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The values represent the means $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in zymosan-induced peritonitis

In this model of peritoneal inflammation, LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) decreased cell recruitment induced by zymosan by 39.9% when compared to zymosan group. This effect was not observed with treatment at lower doses (5 and 10 mg/kg, p.o.), while thalidomide at 10 and 50 mg/kg, p.o., inhibited 36.9% and 61.7% of peritoneal inflammation. Standard drug, indomethacin (30 mg/kg, p.o.), reduced cell recruitment by 47.7% (Fig. 5).

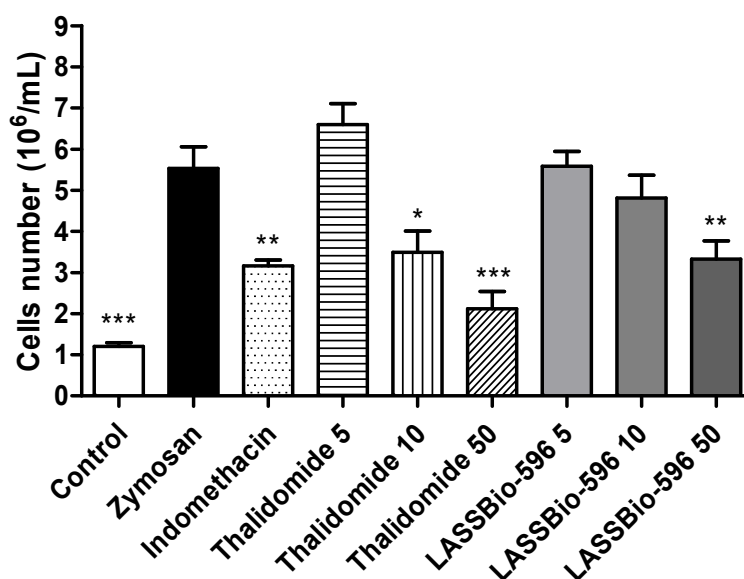


Fig. 5. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the recruited cells number in zymosan-induced peritonitis assay. Control (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); indomethacin (30 mg/kg, p.o.); thalidomide (5, 10, and 50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (5, 10, and 50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the means $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Effect of LASSBio-596 in arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA)

Arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA) was used as chronic inflammation model in mice. Administration of CFA produced an inflammatory process, assessed by an increase in the paw volume in all of the animals, which was persistent throughout the observation period (21 days). Treatment with LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.), from 14th to 21st day after stimulus with CFA, decreased paw edema since 14th day of treatment, similar to dexamethasone (1 mg/kg, p.o.). On the other

hand, the prototype drug, thalidomide, reverts paw inflammation only after 19th day (Fig. 6 and Supplemantar Fig 1).

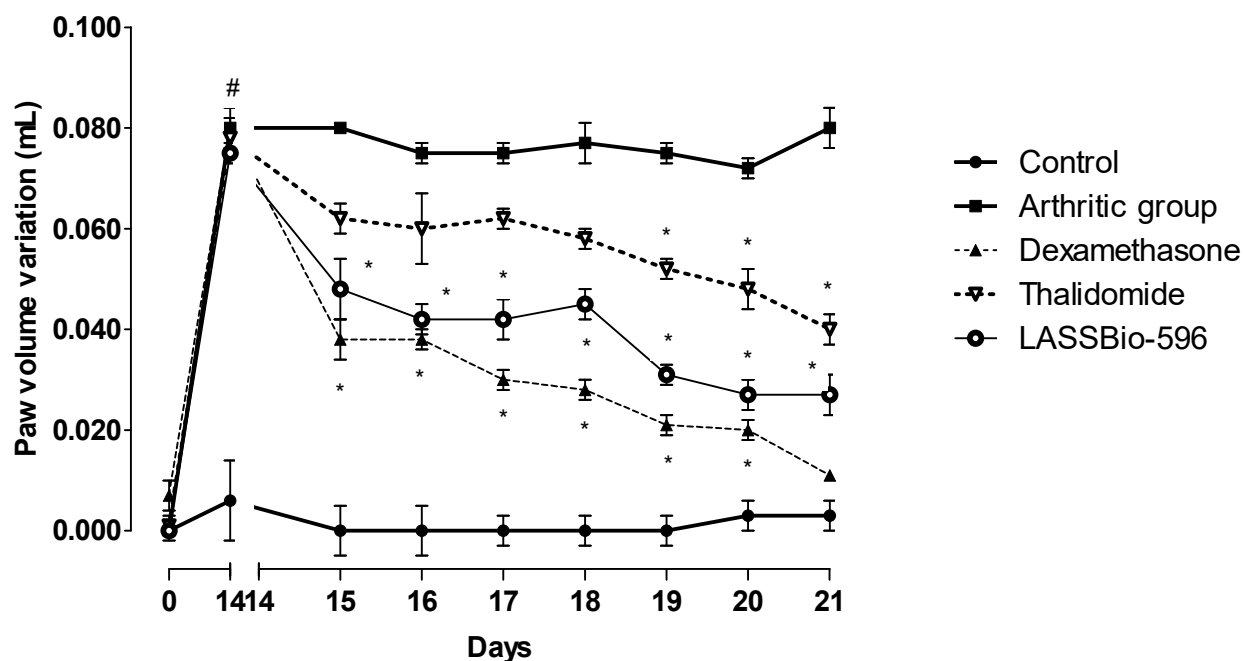


Fig. 6. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the difference of paw volume (mL) in Arthritis induced by complete Freund's adjuvant. Control (no treatment and no immunization); arthritic group (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); dexamethasone (1 mg/kg, p.o.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The values represent the means $\pm$ SEM of each group (n = 6). # p < 0.05 compared with day 0; * p < 0.05 compared with 14th day; using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

In addition, to corroborating these results, cytokines from serum were also assessed. LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) decreased serum levels of IL-17A, IFN- γ , and TNF- α by 79.0%, 55.4%, and 67.1%, respectively, when compared to control group (arthritic). Likewise, dexamethasone and thalidomide also reduced these cytokines levels (Figure 7A, 7B, and 7C).

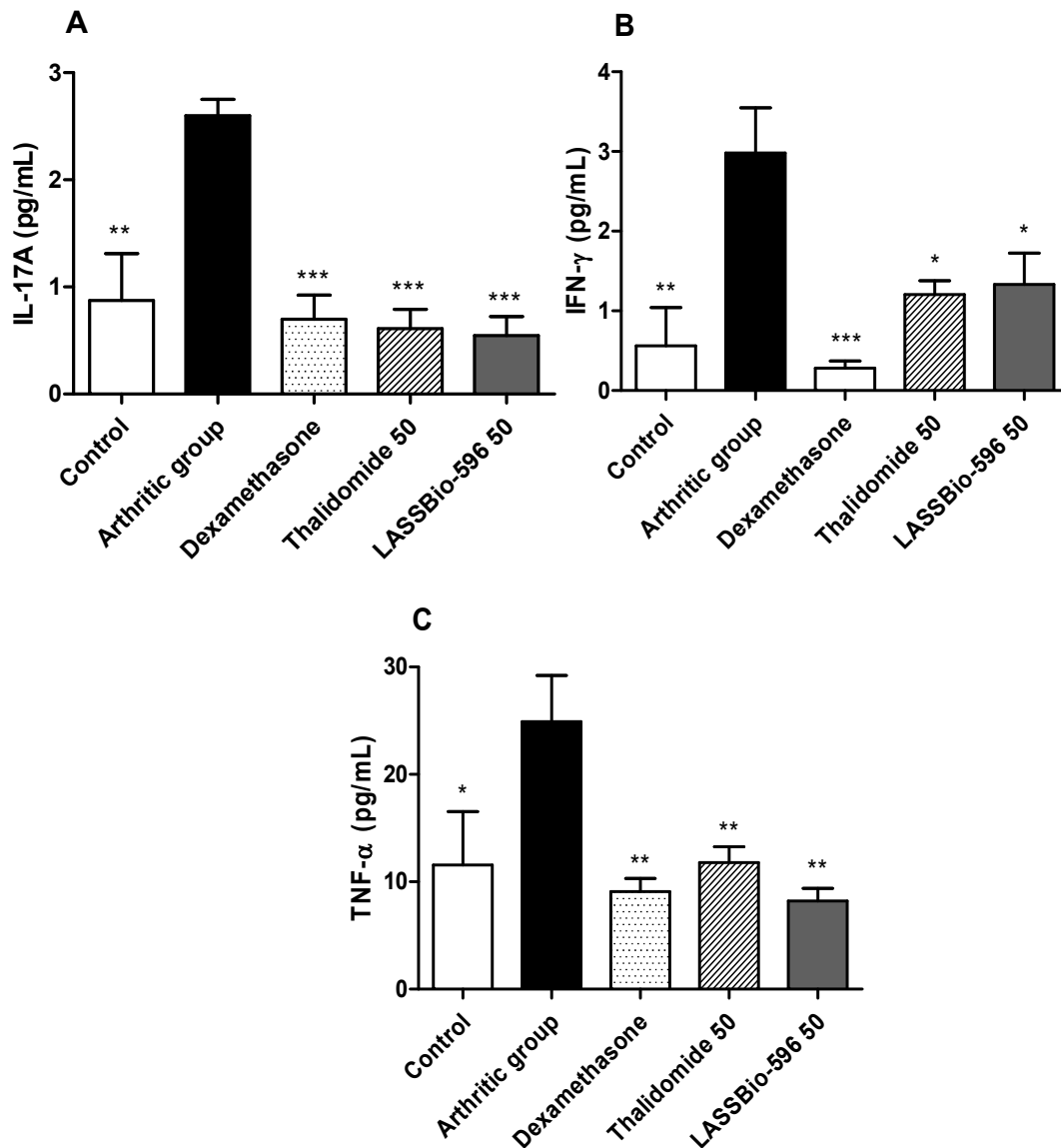


Fig. 7. Effect of the treatment with LASSBio-596 on the concentration of serum cytokines of mice in arthritis induced by complete Freund's adjuvant. **A:** IL-17A; **B:** IFN- γ ; **C:** TNF- α . Control (no treatment and no stimulus with CFA); arthritic group (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); dexamethasone (1 mg/kg, p.o.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (50 mg/kg p.o.). The columns and vertical bars represent the means $\pm$ SEM of each group ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Additionally, stomach, kidney, spleen, and liver from mice were weighed to evaluate a possible toxicity of LASSBio-596. As demonstrated in Table 2, LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.) did not alter the weight of these organs. Moreover, it was not observed any signal of stomach ulcers or bleeding (data not shown). However, dexamethasone treatment (1 mg/kg, p.o.) reduced 68.1% of spleen weight when compared to group control with arthritis.

Treatment	Stomach	Spleen	Kidney	Liver
Control	231.0 ± 20.9	100.7 ± 5.4	164.0 ± 7.0	1134.0 ± 48.2
Arthritic group	261.0 ± 15.4	119.6 ± 5.4	146.7 ± 5.8	1217.0 ± 60.1
Dexamethasone	237.5 ± 18.2	38.2 ± 4.1***	160.2 ± 9.3	1202.0 ± 120.0
Thalidomide	249.7 ± 7.2	110.9 ± 4.8	152.2 ± 3.9	1090.0 ± 26.8
LASSBio-596	241.3 ± 11.8	92.3 ± 4.4	153.1 ± 4.0	1176.0 ± 47.6

Table 2. Weight of organs after subchronic treatment with LASSBio-596 in arthritis induced by complete Freund's adjuvant test. Control (no treatment and no immunization); arthritic group (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); dexamethasone (1 mg/kg, p.o.); thalidomide (50 mg/kg, p.o.); LASSBio-596 (L-596, 50 mg/kg p.o.). The values represent the means ± SEM of each group (n = 6). * $p < 0.05$ compared with control group using ANOVA and Dunnett's test as *post hoc*.

Since hepatotoxicity is reported in the literature (MELCHERT; LIST, 2007; ITO et al., 2010; MALYSKO et al., 2017) as adverse effect of thalidomide, histological evaluation was performed to assess tissue damage, after induction of arthritis in mice and treatment with LASSBio-596. Suplementar Fig. 2a shows that animals receiving vehicle and with no stimulus presented normal liver structures with organized hepatocytes in cords, capillaries and cellularity preserved. Differing from the arthritic group with greater presence of inflammatory infiltrate and inflammatory cells in the vessels (indicated by the arrows). At the same time, liver samples from arthritic animals treated with dexamethasone presented alterations in liver architecture with presence of lipid vacuoles and inflammatory infiltrate. The profile of the infiltrate was also registered with the treatment with thalidomide, in addition it was observed areas with cytoplasm more basophilous or with loss of cytoplasm. On the other hand, no significant changes were observed with LASSBio-596 treatment, except for the inflammatory infiltrate, according to Suplementar Fig. 2e. Thus, the thalidomide hybrid did not induce damage to the hepatocytes, such as its prototype, which is known to be hepatotoxic in the literature.

In histopathological study of paws, it was observed that control group presented epidermis, keratin layer and deep dermis without alterations, differently of arthritic group with inflammatory cells infiltration, loss of keratin layer and areas with edema, necrosis, and loss of epithelial cells. Similarly to dexamethasone thalidomide treatments. These changes did not observed with LASSBio-596 treatment, except inflammatory cells infiltrate, such as other organs – Suplementar Fig. 3.

Discussion

LASSBio-596 is a hybrid of thalidomide and aryl sulfonamide that exhibits inhibitory effects on PDE types 4 and 5 (LIMA et al., 2002) and possess anti-inflammatory properties in lung inflammation models (ROCCO et al., 2003; CAMPOS et al., 2006; PADILHA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018). In this work, models of nociceptive pain as well as peritoneal and chronic inflammation were used to better characterize pharmacological activities of LASSBio-596.

Initially, to assess the ability of LASSBio-596 in modulating nociceptive process, the first test performed was acetic acid-induced writhing. Acetic acid injection (i.p.) promotes activation of acid-sensitive ion channels (ASICs) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) localized in afferent primary fibers. This activation causes a behavior characterized by abdominal constriction followed by extension of the hind limbs (BASBAUM et al., 2009; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Furthermore, in this model, inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β are released by resident peritoneal cells (RIBEIRO et al., 2000), as well as prostanoids and bradykinin (DUARTE; NAKAMURA; FERREIRA, 1988; IKEDA et al., 2001), associated to spinal MAP kinases (ERK, JNK, and p38) and PI3K signaling activation (PAVAO-DE-SOUZA et al., 2012). Inhibitory effect of LASSBio-596 in this model (Fig. 1) could be related to its ability to reduce inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β (CASQUILHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; PADILHA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

The nociceptive process is mediated by excitatory neurotransmitters, such as glutamate. Since LASSBio-596 negatively modulated glutamate-induced nociception (Fig. 2), it is possible that this thalidomide derivative antagonize action of the glutamatergic pathway, which involves stimulation of NMDA and non-NMDA receptors and depends on the activation of the L-arginine-nitric oxide pathway when administered intraplantarly into the mouse paw (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

In order to investigate neurogenic and inflammatory pain the formalin-induced nociception test was performed. Treatment with LASSBio-596 reduces both phases

of this test, indicating that it can modulate mechanisms associated to neurogenic (1st phase), *i.e.* activation of primary afferent neurons (KERSTEIN et al., 2009; MCCALL; TANNER; LEVINE, 1996), by blocking receptors, such as TRPA1. After a quiescent period (interphase), which is associated to of temporary neuronal hyperpolarization (FISCHER et al., 2014), inflammatory phase develops (2nd phase) with release of reactive oxygen specie, histamine, prostaglandins, TNF- α and IL-1 β (GRANADOS-SOTO et al., 2001; KO et al., 2012). Inhibitory effect of LASSBio-596 in this phase could be associated to its effect on reducing of oxidative stress (CASQUILHO et al., 2018) and reduce inflammatory cytokines (CASQUILHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; PADILHA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Since LASSBio-596 inhibits both phases of formalin test, which is an indicative of drugs with central analgesic action, the hot-plate test was carried out. The increase in the latency time of mice on the hot plate (Fig. 4) suggests that LASSBio-596 possess central antinociceptive activity. This effect could be related antagonist action of the glutamatergic pathway of LASSBio-596 (Fig. 2).

Given that previous experiments are based on animal behavior and to rule out any action of LASSBio-596 in motor coordination, rotarod test was performed. LASSBio-596 did not induce motor impairment, since it did not alter fall numbers and fall latency, as observed in Table 1.

Since pain corresponds to one of the classic signs of the inflammatory process and the anti-inflammatory drugs have analgesic effects, it is common to evaluate this effect in molecules that act in this process. So, an acute inflammatory assay was performed through evaluation of leukocyte migration which is an important feature of inflammatory process. In models of lung inflammation, it was demonstrated that LASSBio-596 inhibited influx of polymorphonuclear (CARVALHO et al., 2010; CASQUILHO et al., 2011; LIMA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2015; PADILHA et al., 2015; ROCCO et al., 2003). Similarly, in this study LASSBio-596 reduced leukocyte migration into peritoneal cavity after zymosan stimulus, a cell wall polysaccharide of *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 5). In agreement with these data inhibitors of PDE-4 also has inhibitory effect on neutrophil influx after LPS and zymosan stimulus (MIOTLA; TEIXEIRA; HELLEWELL, 1998). This inhibitory effect of LASSBio-596

could be associated to reduction of pro-inflammatory cytokines, e.g. TNF- α (Fig. 7) (CASQUILHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; PADILHA et al., 2015; SILVA et al., 2016), since these cytokines induces adhesion molecules that allows cell migration. Additionally, it was also reported that LASSBio-596 decrease granulocytes number in blood after subchronic intake (ARAUJO et al., 2014).

Inflammatory process is associated to pathogenesis of many chronic diseases, including autoimmune disease. Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disease with a persistent joint inflammation and pain (CALABRESI et al., 2018). This disease is associated to immune cell infiltration in the joint and increased levels of cytokines, chemokines, and reative C protein in the circulation (SMOLEN et al., 2018). Since LASSBio-596 presents anti-inflammatory and antinociceptive properties it was decided evaluate its effect on animal model of rheumatoid arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA), an emulsion of mycobacterial antigens and mineral oil (MCNAMEE; WILLIAMS; SEED, 2015).

Treatment with LASSBio-596 reduced joint inflammation (Fig. 6) without cause gastrointestinal toxicity (Table 2), a hallmark of non-steroidal anti-inflammatory drugs (VAN DER LINDEN et al., 2009), and did not induce immunosuppression (Table 2), differently to glucocorticoids (FRANCHIMONT, 2004). This anti-inflammatory effect of LASSBio-596 could be related to reduction of pro-inflammatory cytokines, i.e., IL-17A (Fig. 7), which is an effector of Th17 cells associated to pathogenesis of rheumatoid arthritis (KIRKHAM; KAVANAUGH; REICH, 2014). Additionally, LASSBio-596 reduced IFN- γ levels, another immunoregulatory cytokine involved in autoimmune diseases (KIM; MOUDGIL, 2017). This cytokine could polarized macrophages to pro-inflammatory profile M1, which releases pro-inflammatory cytokines to accelerate rheumatoid arthritis signs (WANG et al., 2017). Indeed, it was previously demonstrated that LASSBio-596 decreases M1 macrophage in lung tissue (PADILHA et al., 2015), which may also be occurring in arthritis model through the reduction IFN- γ .

Inhibition of TNF- α levels is characteristic of thalidomide and some of its analogues (DE ALMEIDA et al., 2007; LIMA et al., 2002; MAZZOCCOLI et al., 2012; COSTA et al., 2015). Likewise, LASSBio-596 also reduced TNF- α level in arthritic mice. Other

thalidomide analogue, LASSBio-468, was also able to modulate TNF- α production and to inhibit arthritis model (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2005). This inhibitory effect is fundamental to reduce joint inflammation and is the basis of some therapies for rheumatoid arthritis treatment (LI; ZHENG; CHEN, 2017).

Conclusions

Our data demonstrated, for the first time, the antinociceptive effect of LASSBio-596 and reinforces its anti-inflammatory property in a model of chronic autoimmune disease (i.e., rheumatoid arthritis), which amplify the therapeutic potential of this molecule.

References

- AKRAMAS, L. Anti-inflammatory effect of herbal preparations on adjuvant arthritis in rats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 41, p. 748–756, 2017.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. et al. LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF- α and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 485–494, mar. 2005.
- ARAUJO, G. L. et al. Toxicological in vitro and subchronic evaluation of LASSBio-596. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 148–156, nov. 2014.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, out. 2009.
- BJARNASON, I. et al. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v. 154, p. 500–514, 2018.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, n. 2, p. 219–228, 11 jan. 2002.
- CALABRESI, E. et al. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 36, n. 2, p. 175–184, [s.d.].
- CAMPOS, H. S. et al. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 39, n. 2, p. 283–287, fev. 2006.
- CARVALHO, G. M. C. et al. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung

and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 604–612, 15 set. 2010.

CASQUILHO, N. V. et al. LASSBio 596 per os avoids pulmonary and hepatic inflammation induced by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 58, n. 2, p. 195–201, ago. 2011.

CASQUILHO, N. V. et al. Oxidative imbalance in mice intoxicated by microcystin-LR can be minimized. **Toxicon**, v. 144, p. 75–82, 15 mar. 2018.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Obesity-driven gut microbiota inflammatory pathways to metabolic syndrome. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. nov 2015.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, fev. 1968.

DE ALMEIDA, M. V. et al. Thalidomide analogs from diamines: Synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 223–6, fev. 2007.

DEGUINE, J. New Flavors in Immunomodulation. **Cell**, v. 173, p. 1553-1555, 2018.

DOHERTY, N. S. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769–89, nov. 1985.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 21, n. 2, p. 341–343, 1988.

FISCHER, M. et al. The interphase of the formalin test. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 511–521, mar. 2014.

FRANCHIMONT, D. Overview of the Actions of Glucocorticoids on the Immune Response: A Good Model to Characterize New Pathways of Immunosuppression for New Treatment Strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, n. 1, p. 124–137, jun. 2004.

GUANTAI, E.; CHIBALE, K. How can natural products serve as a viable source of lead compounds for the development of new/novel anti-malarials? **Malaria Journal**, v. 10, suppl 1, S2, 2011.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Participation of COX, IL-1 beta and TNF alpha in formalin-induced inflammatory pain. **Proceedings of the Western Pharmacology**

Society, v. 44, p. 15–17, 2001.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103–114, jul. 1987.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911–2919, 2 nov. 2001.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (2012). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/index.aspx>> Access in: 16/07/2018.

KERSTEIN, P. C. et al. Pharmacological Blockade of TRPA1 Inhibits Mechanical Firing in Nociceptors. **Molecular Pain**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 4 set. 2009.

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. **Cytokine**, v. 98, p. 87–96, out. 2017.

KIRKHAM, B. W.; KAVANAUGH, A.; REICH, K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 133–142, fev. 2014.

KO, Y. K. et al. Antinociceptive effect of phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, on the rat formalin test. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 62, n. 6, p. 558, jun. 2012.

KURAISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algic tests. **Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245–252, 29 ago. 1983.

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

LI, P.; ZHENG, Y.; CHEN, X. Drugs for Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds to Anti-TNF Biologics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 460, 12 jul. 2017.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 3067–3073, set. 2002.

MAZZOCOLI, L. et al. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 5, p. 323–329, jul. 2012.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 208, n. 1, p. 45–48, 12 abr. 1996.

- MCNAMEE, K.; WILLIAMS, R.; SEED, M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 278–286, 15 jul. 2015.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 19 mar. 2010.
- MIOTLA, J. M.; TEIXEIRA, M. M.; HELLEWELL, P. G. Suppression of Acute Lung Injury in Mice by an Inhibitor of Phosphodiesterase Type 4. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 411–420, mar. 1998.
- OLIVEIRA, V. R. et al. Investigating the therapeutic effects of LASSBio-596 in an in vivo model of cylindrospermopsin-induced lung injury. **Toxicon**, v. 94, p. 29–35, fev. 2015.
- OLIVEIRA, V. R. et al. Lung and liver responses to 1- and 7-day treatments with LASSBio-596 in mice subchronically intoxicated by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 141, p. 1–8, jan. 2018.
- PADILHA, G. A. et al. Therapeutic effects of LASSBio-596 in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 267, 30 set. 2015.
- PAVAO-DE-SOUZA, G. F. et al. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI(3)K and microglia in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 320–328, maio 2012.
- RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–118, 3 jan. 2000.
- RIPA, L. et al. Discovery of a Novel Oral Glucocorticoid Receptor Modulator (AZD9567) with Improved Side Effect Profile. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 5, p. 1785–1799, 2018.
- ROCCO, P. R. M. et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **The European Respiratory Journal**, v. 22, n. 1, p. 20–7, jul. 2003.
- SILVA, J. D. et al. Respiratory and Systemic Effects of LASSBio596 Plus Surfactant in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 821–835, 2016.
- SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18001, 8 fev. 2018.
- SOARES CAVALCANTE COSTA, V. et al. High Anti-Inflammatory Activity and Low

Toxicity of Thalidomide Analogs. **Medicinal Chemistry, an open access journal**, v. 5, n. 7, p. 334–339, 2015.

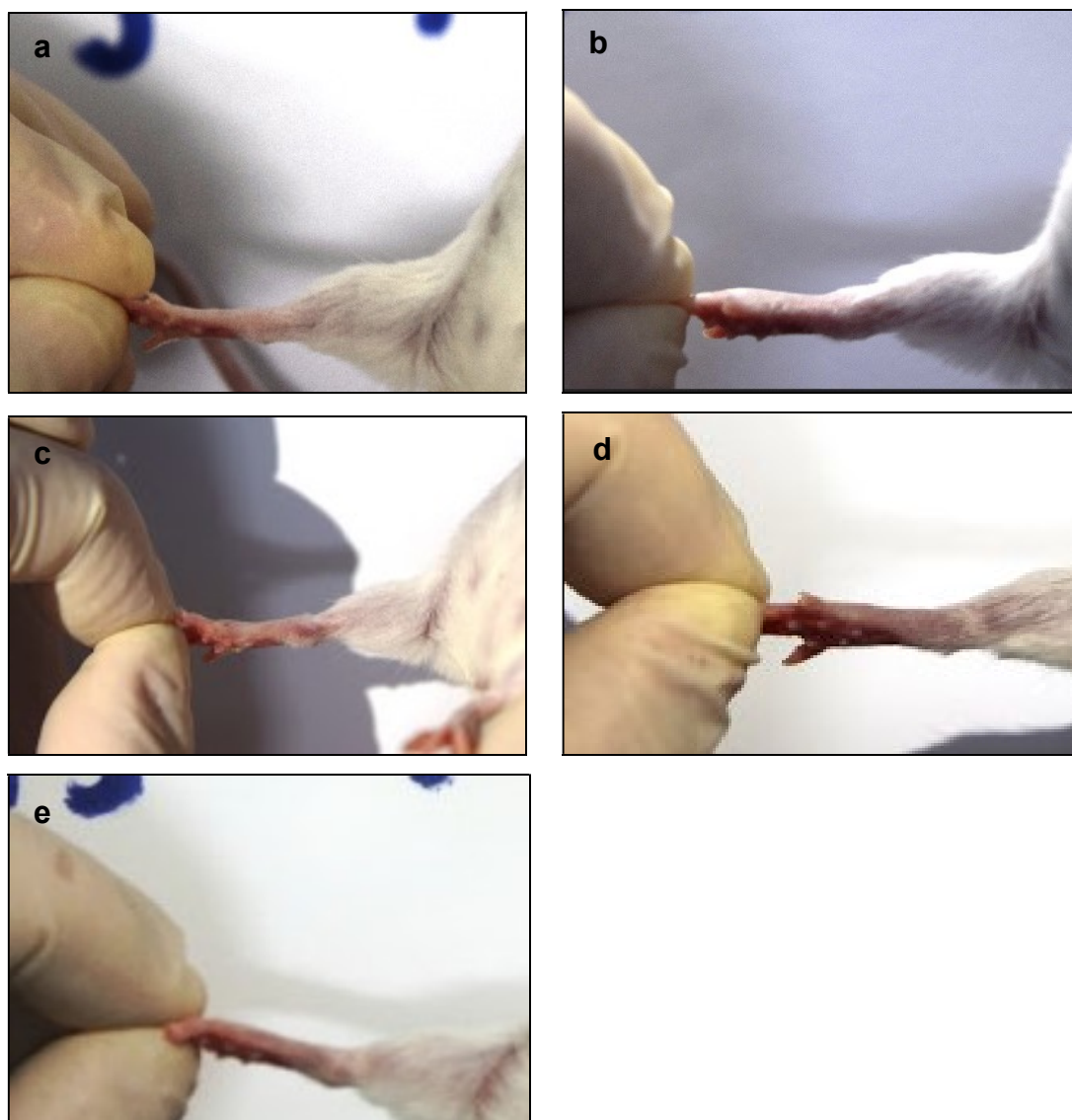
VAN DER LINDEN, M. W. et al. The balance between severe cardiovascular and gastrointestinal events among users of selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 5, p. 668–673, 1 maio 2009.

WANG, Y. et al. Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis? **International Immunopharmacology**, v. 50, p. 345–352, 1 set. 2017.

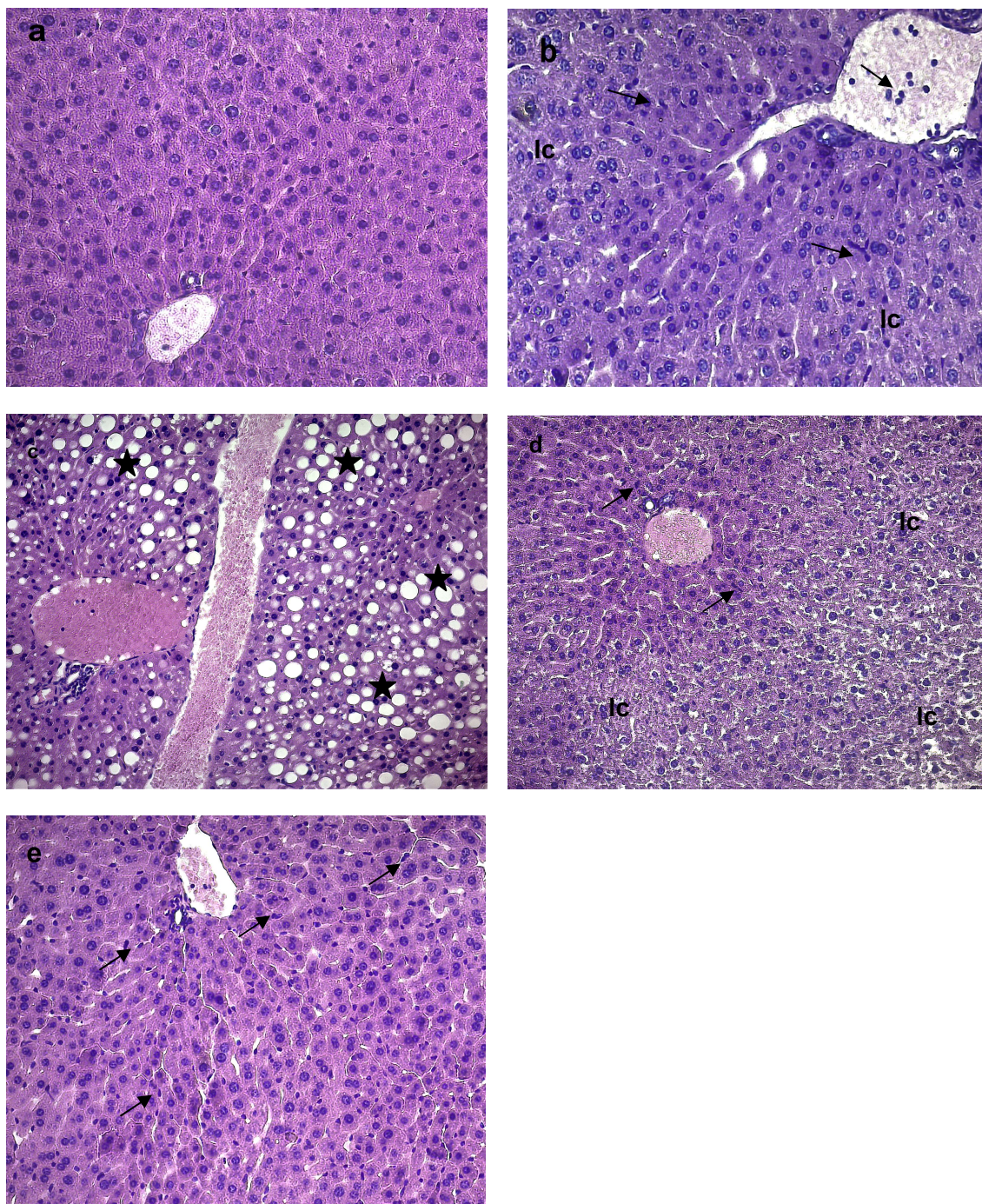
WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, C. W. Carageenan induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544–7.

ZIMMERMANN-FRANCO, D. C. **Investigação dos potenciais anti-inflamatório e antitumoral de análogos do resveratrol**. [Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética)]. 165 p. Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.

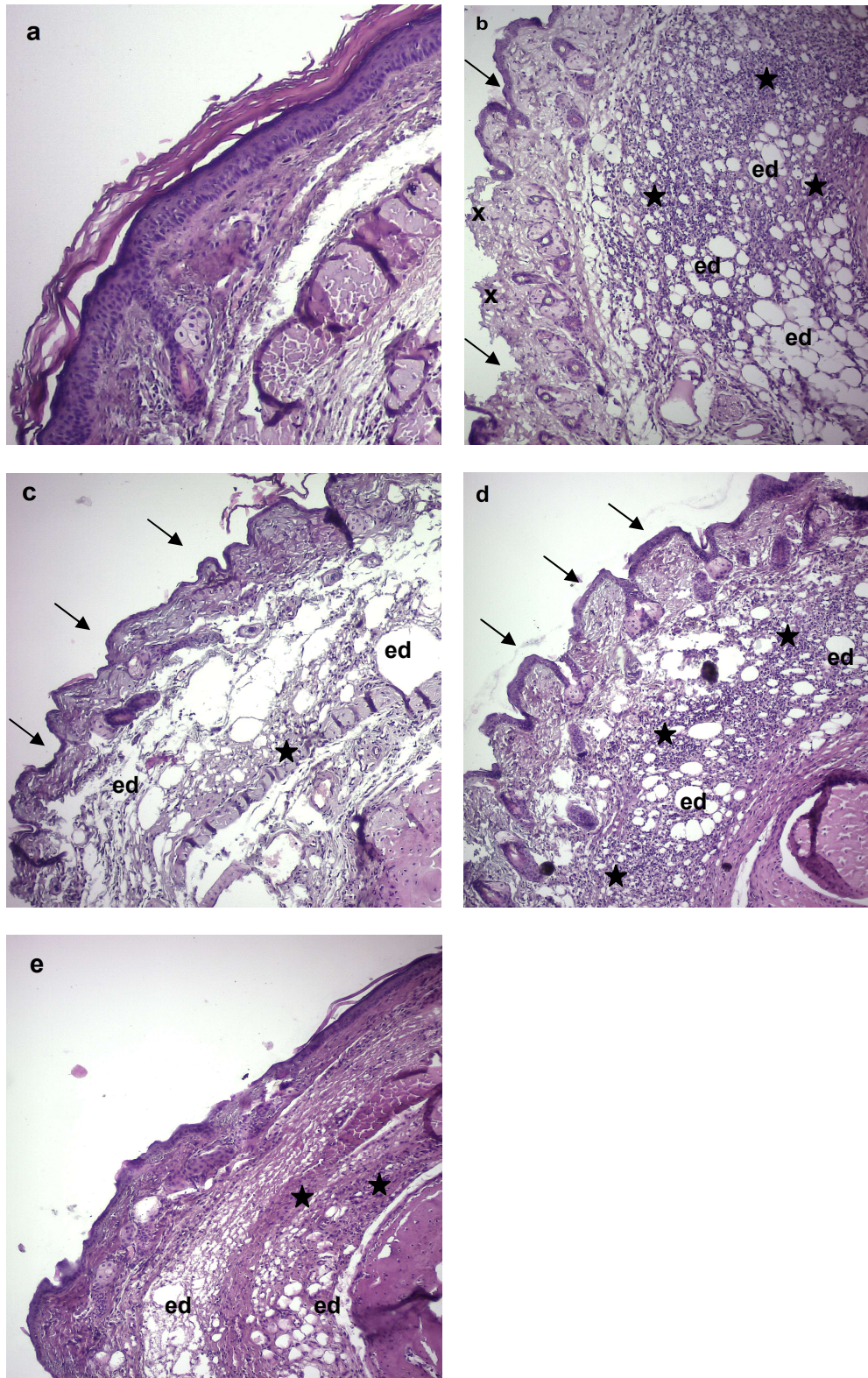
SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Fig. 1 – Photographs of mice's paws on the last day (7th day) of different treatments in arthritics induced by complete Freund's adjuvant. **a**: Control: $\Delta V = 0,003$ mL (no treatment and no stimulus with CFA); **b**: arthritic group: $\Delta V = 0,080$ mL (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); **c**: dexamethasone: $\Delta V = 0,011$ mL (1 mg/kg, p.o.); **d**: thalidomide: $\Delta V = 0,040$ mL (50 mg/kg, p.o.); **e**: LASSBio-596: $\Delta V = 0,027$ mL (50 mg/kg, p.o.).



Supplementary Fig. 2 – Histological evaluation of mice's liver after different treatments in arthritis induced by complete Freund's adjuvant. **a**: Control (no treatment and no stimulus with CFA); **b**: arthritic group (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); **c**: dexamethasone (1 mg/kg, p.o.); **d**: thalidomide (50 mg/kg, p.o.); **e**: LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.). Arrows indicate infiltration of inflammatory cells. The crosses demonstrate áreas with loss of cytoplasm (evidenced in b and d). Stars indicate lipid vacuolizations with corticosteroid treatment (c). Histological changes were determined by HE staining. Magnification in 200x.



Supplemental Fig. 3 – Histopathological study of mice's paws after different subchronic treatments in arthritis induced by complete Freund's adjuvant. a: Normal paw tissue with normal epidermis with preserved keratin layer and deep dermis without alterations (no treatment and no stimulus with CFA); b: arthritic group (vehicle, 10 mL/kg, p.o.); c: dexamethasone (1 mg/kg, p.o.); d: thalidomide (50 mg/kg, p.o.); e: LASSBio-596 (50 mg/kg, p.o.). Stars shows inflammatory cells infiltration; arrows demonstrate loss of keratin layer; ed: areas with edema; x: loss of epithelial cells. Histological changes were determined by HE staining. Magnification in 100x.

4.2 Artigo II - *In vitro* therapeutic potential of thalidomide-hybrid, LASSBio-596, in glioblastoma

ANTICANCER RESEARCH
International Journal of Cancer Research and Treatment

INNS: 1791-7530

Impact-factor: 1.865

***In vitro* therapeutic potential of thalidomide-hybrid, LASSBio-596, in glioblastoma**

Max Denisson Maurício Viana¹, José Clementino Neto¹, Adriana Ximenes da Silva³, Vivaldo Moura Neto⁴, Morgana Vital de Araújo¹, Lídia Moreira Lima², Eliezer Jesus Barreiro², Eliane Aparecida Campesatto¹, Magna Suzana Alexandre-Moreira¹

¹Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LaFI, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió 57072-900, AL, Brasil.

²Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – LASSBio, Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68024, Rio de Janeiro 21944-902, RJ, Brasil.

³Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral - LEMC, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió 57072-900, AL, Brasil.

⁴Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer – IEC, Rio de Janeiro 20231-092, RJ, Brasil.

Abstract: In the current study LASSBio-596, rationally designed as a hybrid of thalidomide, was tested *in vitro* assays to assess its activity on tumor growth and angiogenesis inhibition, representing an important findings about antitumor effects of this analogue on solid tumors. In MTT assay, LASSBio-596 significantly reduced cell viability at all times tested, whose maximum effect was found at the concentration of 100 μ M with higher activity after 72h of treatment, reducing mitochondrial metabolic activity by $52.2 \pm 1.2\%$. PBMC viability, also was reduced with the same treatments, however LASSBio-596 induced a toxicity three times lower compared to thalidomide, and two times lower than TMZ. Whereas the maximum effect for LASSBio-596 was

also statistically lower than TMZ and thalidomide on PBMC demonstrating in fact this hybrid exhibited a greater selectivity in inhibiting tumor cells than PBMC. Although these preliminary promissory results, others *in vitro* studies are necessary for confirmation of mechanism of action of this compound as well the evaluation in animal models in order to confirm the potential of LASSBio-596 in the treatment of glioblastoma.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is known to be one of the most lethal human tumors, once the rapid, diffuse and infiltrative growth, cellular atypias, high mitotic capacity, necrosis and microvascular proliferation which are factors predicting poor survival in patients (median survival rates are in the range of 9-12 months and 2-year survival rates are in the range of 8%-12%) (1-2).

Currently, temozolamide (TMZ) is the standard FDA-approved treatment for GBM (3-4). However, the report of events that describe GBM resistance to this drug in addition to the demonstrated low efficacy, already found in the scientific literature, raises the need for the search for new target therapeutic strategies that may induce less resistance, selective toxicity, more efficacy and safety. Therefore, given the capacity of this tumor to overexpress angiogenic factors, antiangiogenic agents emerge as potential therapies (5).

Thalidomide is the most known angiogenesis inhibitor with immunomodulatory properties (6). It has been widely used for the standard therapies of cancer, including GBM, in monotherapy or associated with other drugs, based not only on its anti-angiogenic and immunomodulatory mechanisms but also on inducing apoptosis (7). Studies like Hassler et al. (2015) suggested use of thalidomide as palliative treatment for advanced secondary GBM, since it was observed an increase in survival of patients in until 57 months, as well a greater normalization of a sleep pattern. In the same way, other researches also reinforce the use of this drug in association with others in phase II clinical studies with tolerable effects (BAUMANN et al., 2004; KESARI et al., 2008).

Thereby, to overcome risks caused by thalidomide, such as teratogenicity and hepatotoxicity, many analogs have been developed with anticancer potential. Previous reports showed that structural alterations in thalidomide could change the

side-effect profile, potentially eliminating them, while still maintaining the desired anticancer activity and demonstrating promising results in clinical trials (8-9)

In the current study, LASSBio-596 {2-[4-(1,4-thiazinan-4-ylsulfonyl) phenylcarbamoyl]} benzoic acid was rationally designed as a hybrid of thalidomide, sildenafil (selective PDE5 inhibitor) and arylsulfonamide (PDE4 selective inhibitory prototype), with important anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiangiogenic properties (10-12).

This thalidomide analog does not have the phthalimide ring (responsible for the teratogenic effect of thalidomide), evidencing the absence of teratogenicity of this new compound (13). In addition, thalidomide analogues with an open phthalimidic structure induced suppression of TNF- α , IL-12 and IL-1 β (14), consistent with the original design as an anti-TNF- α agent.

Thus, LASSBio-596 was tested *in vitro* assays to assess their performance on tumor growth inhibition representing an important findings about antitumor effects of this analogue on solid tumors.

Materials and methods

Cell line. The GBM02 human tumor line was established in the laboratory of Professor Vivaldo Moura Neto, Department of Anatomy of the Biomedical Sciences Institute of the Federal University of Rio de Janeiro, from surgical specimens, with the consent of the Research Ethics Committee of the University Hospital Clementino Fraga Filho, protocol number CEPHUCFF n. 002/01.

Cell viability assays. Cell viability was evaluated using the 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) spectral analysis (Sigma Aldrich). This colorimetric assay measures the reduction of yellow MTT by mitochondrial succinate dehydrogenase to an insoluble, dark purple Formosan product. GBM02 cells were plated at 5×10^3 cells per well in 96-well plates and, 24h after incubation in humidified greenhouse at 37°C and 5% CO₂, the cells were treated with LASSBio-596 or thalidomide at concentrations: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 30, and 100 μ M, and temozolomide in all these concentrations diluted in new Dulbecco's Modified Eagle/F12 medium (DMEM/ F-12) supplemented with 10% fetal serum for 24, 48, and 72 hours. Cells were also cultured in free culture medium of compounds (control

of the growth medium) or with 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) (vehicle control). Next, MTT (50 μ L at 0.5 mg/mL) was added in each well and incubated for 2 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The cells were then lysed to release the purple Formosan product by the addition of DMSO (50 μ L), and they were incubated again at 37°C for 20 minutes, in order to favor the dissolution of the crystals formed (15). The optical density of each well was obtained by spectrophotometry at 530 nm. The concentration able of reducing 50% of the cellular viability (CI 50), at different times, was calculated with based on the concentration able of reducing cell viability by 50% in relation to the control DMSO 0.1% (control of the vehicle at the highest concentration, whose cells were considered 100% viable). The concentration that obtained the best results (for LASSBio-596 and thalidomide) was selected for continue the rehearsals.

Evaluation of viability on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Samples of heparinized human blood (from healthy donors) was collected and PBMC were isolated by a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque at 2837 rpm for 30 min at 26°C. PBMC were washed and resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with PBS (10%, v/v). Then, PBMC were plated in 96-well plates (4x10⁵ cells/well in 50 μ L of medium) and after, 50 μ L of tested compounds (1, 10, 30, and 100 μ M diluted in the same medium plus DMSO) were added to each well and cells were incubated during 72h, at 37°C. After the incubation period, 20 μ L of MTT (Sigma) at 5 mg/mL was added to each well and incubated for 4 hours in an oven under the same conditions as above. 200 μ L of DMSO were added to each well to solubilize the formazan crystal, and reincubated for 20 minutes at the same conditions. To measure the absorbance, an ELISA reader at 550 nm was used.

Results

LASSBio-596 induces death of patient GBM02 cells. In tumor cells it was found that, compared to the control group treated with DMSO 0.1%, whose cells were considered 100% viable, LASSBio-596 and its analogue significantly reduced cell viability at all times tested. The maximum effect of each treatment at 24, 48, and 72 h was found at the concentration of 100 μ M in the 3 times. LASSBio-596 and thalidomide showed higher activity after 72h of treatment, reducing mitochondrial

metabolic activity by $52.2 \pm 1.2\%$ and $46.4 \pm 5.4\%$ ($p < 0.001$), respectively, as shown in Table 1. Compared to DMSO (0.1%), TMZ showed no significant activity. No significant difference was found between DMSO 0.1% and the culture medium, demonstrating that the effects on cell viability occurred exclusively by the compounds activity, and not by the vehicle with which they were diluted.

Treatments	24h		48h		72h	
(μM)	IC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	IC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)	IC ₅₀ ^a	E _{max} ^b (%)
TMZ	>100	NT	>100	NT	>100	NT
Thalidomide	>100	$30.5 \pm 1.3^{***}$	>100	$29.2 \pm 2.4^{***}$	>100	$46.4 \pm 5.4^{***}$
LASSBio-596	>100	$29.4 \pm 3.6^{***}$	>100	$22.8 \pm 3.1^{***}$	97.5 ± 0.9	$52.2 \pm 1.2^{***}$

Table 1. Effect of LASSBio-596 and its analogue thalidomide on the viability of GBM02 lineage glioblastomas in the MTT assay (24, 48, and 72h). The results refer to: ^a50% inhibitory concentration (IC₅₀) calculated by concentration-response curves. ^bMedia $\pm$ standard error of the average of the maximum effect (E_{max}) in triplicates of a representative experiment. Analyzed by ANOVA One-way followed by Dunnett post-test. *** $p < 0.001$ relative to the DMSO group (0.1%). NT: Substance has no activity.

LASSBio-596 and thalidomide causes different levels of inhibition of cell viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Table 2 demonstrates the effects of thalidomide, its analogue and TMZ in PBMC. It could be observed that all three treatments reduced PBMC viability at 72h, so that LASSBio-596 treatment induced a much lower toxicity, with an IC₅₀ ($64,0 \pm 13,9$) three times lower compared to thalidomide ($20,5 \pm 2,5$), and two times lower than standard drug for GBM treatment TMZ ($36,7 \pm 6,4$). Similarly to the maximum effect of each treatment in which at 100 μM , TMZ, thalidomide and LASSBio-596 reducing mitochondrial metabolic activity of PBMC by 84.9 ± 0.5 , 80.1 ± 10.2 , and $54.9 \pm 11.2\%$ ($p < 0.001$), respectively, demonstrating once again that LASSBio-596 exhibited lower toxicity to these cells. No significant difference was found between DMSO 0.1% and the culture medium, demonstrating that the effects on cell viability occurred exclusively by the compounds activity, and not by the vehicle with which they were diluted.

Treatments (μM)	IC ₅₀ ^a ($\mu\text{M} \pm \text{s.e.m.}$) ^a	E _{max} ^b (% $\pm$ s.e.m.)
------------------------------	--	--

TMZ	36.7 ± 6.4	84.9 ± 0.5***
Thalidomide	20.5 ± 2.5	80.1 ± 10.2***
LASSBio-596	64.0 ± 13.9	54.9 ± 11.2***

*Table 2. Inhibition of proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by LASSBio-596 and its analogue thalidomide after 72h at 100μM. The results refer to: ^a50% inhibitory concentration (IC₅₀) calculated by concentration-response curves. ^bMedia ± standard error of the average of the maximum effect (Emax) in triplicates of a representative experiment. Analyzed by ANOVA One-way followed by Dunnett post-test. *** p <0.001 relative to the DMSO group (0.1%).*

Discussion

New strategies are required to treat GBM and recent data suggest that the use of antiangiogenic drugs with immunomodulatory effects emerge as potential therapy to limit cancer progression (9,16). Thalidomide, for example, was the first drug with significant clinical outcomes against multiple myeloma (MM) and due to this potential, chemical modeling of the thalidomide is a source of novel precursors with therapeutic properties, even as its analogues, lenalidomide and pomalidomide, which have also been approved by US FDA for MM therapy with satisfactory and tolerable responses (17-19).

Taking into account structure-activity (SAR) studies, thalidomide analogues and metabolites demonstrate the importance of the pharmacological presence of phthalimide subunit (20-21), because some authors have proposed the synthesis and pharmacological evaluation of N-alkyl-phthalimidic derivatives, planned by structural modification of the glutarimide subunit and the results obtained demonstrated the irrelevance of the glutarimide group in anti-inflammatory activity (i.e. as anti-TNF) (22-23). In addition, it was observed that the open phthalimidic structure induces better antitumor activity besides a greater immunosuppressive effect mainly by the reduction of pro-inflammatory cytokines (14). Thus, analogs with phthalimidic grouping, preferably of open structure, have been commonly employed in the synthesis of drugs with anti-inflammatory, immunomodulatory, antiangiogenic and antitumoral potentials (24-26).

From this perspective, the strategy of molecular hybridization using the phthalimidic group as a pharmacophoric fragment has shown a series of successful results (27).

The discovery of the effectiveness of the arylsulfonamides group against streptococci led to the search for new derivatives that could have cytotoxic effects. Compounds which contain a substituent in place of an N-H of the sulfone group have better chemotherapeutic results and especially when the substituents are heterocyclic rings, from which the activities become potentiated (28). Other study used an indole disulfonamide derivative that showed antitumor activity both *in vitro* and *in vivo*, in addition to being more selective in inhibiting cell growth (29).

Another potential strategy for hybridization is the insertion of groups with anti-PDE5 activity, such as prototype sildenafil, since overexpression of PDE5 is detected in multiple types of cancer, which has also been confirmed in several cell lines originating from breast cancer (MCF-7, HTB-26, MDA-MB-468), prostate cancer (LNCAP, PC3), bladder cancer (HTB-76, HT1376) and colorectal cancer (HT29, HCT116, SW480, T84) (30-34). These findings suggest that PDE5 may play an important role in tumorigenesis and that targeting PDE5 may be a promising anticancer method. Actually, the anticancer effect of sildenafil and other PDE5 inhibitors have been evaluated by several groups. It has been reported that sildenafil and vardenafil could suppress tumor cell growth and induce caspase-dependent apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* (35). The non-specific PDE5 inhibitor exisulind and its analogues selectively induced the apoptosis of various human prostate, colon and breast cancer cells, which was owing to their inhibitory effects on PDE5 expression, thereby enhancing the cGMP-induced activation of PKG (36-44).

Thus, aiming at the synthesis of hybrid compounds by bringing together structural characteristics of distinct bioactive compounds (open phthalimide ring from thalidomide, arylsulfonamide group, and substituted heterocyclic ring from sildenafil with anti-PDE5 activity) in a single new structure, a novel compound to potentiate the therapy and reduce the side effects.

LASSBio-596, 2-[4-(1,4-thiazinan-4-ylsulfonyl) phenylcarbamoyl] benzoic acid, originally designed as an anti-TNF agent and PDE inhibitor (PDE-4 and PDE-5), is an

hybrid from thalidomide, arilsulfonamide and sildenafil (10), which possess pharmacological actions against pulmonary disorders (10-12; 45-46).

So, according to the biological activities described of their precursors, in the current study, we investigated antitumoral effect of LASSBio-596 in human glioblastoma cancer cells in *in vitro* assays.

Initially, viability test through MTT was performed on cells of the GBM02 strain and it was observed that after 72h of LASSBio-596 treatment, mitochondrial metabolic activity was reduced by 52.2 ± 1.2 , over to TMZ and its prototype thalidomide. Furthermore, when we evaluate the effect of these compounds on PBMC, it could be observed (after 72h of treatment) that LASSBio-596 induced a toxicity three times lower compared to thalidomide, and two times lower than TMZ. Whereas the maximum effect for LASSBio-596 was also statistically lower than TMZ and thalidomide on PBMC demonstrating in fact this hybrid exhibited a greater selectivity in inhibiting tumor cells than PBMC.

This greater cytotoxic effect for GBM than PBMC is suggestive and expected of the hybridization of the molecule. These results are promising for some with low or no thalidomide analogue activity in tumor lineages. In the study performed with thalidomide analogues inserting nitro ($-\text{NO}_2$) or carboxy ($-\text{COO}_2$) groups at the *ortho* positions of the phthalimide ring with substitution of the glutarimide group for saturated aliphatic chains of ethyl and propylamines, showed no toxicity to the cells HT-29 (colorectal adenocarcinoma line) or PBMC, as an exception of the analogue with the two groups in the phthalimide unit and ethylamine lateral radical, but at a high concentration of 1600 μM (47).

Similar to the findings have already reported low toxicity of thalidomide analogues in tumor cell lines, including Sarcoma 180, HL-60 and HCT-8 (9). Some authors also tested 16 new phthalimide derivatives for cytotoxicity in tumor cells (CEM, MCF7, and HeLa) and reported that, overall, they did not cause a reduction in cell viability (48).

Thiosemicarbazone was another important pharmacophoric group, with anticancer effects, have been quite promising, acting on cell proliferation and combating chemotherapy resistances. However, cytotoxic analyses of eight phthalimide and thiosemicarbazone analogs were performed by the MTT and Alamar Blue™ assays, revealing weak *in vitro* antitumor activity against tumor cells (49). Thus, the addition of the thiocarbonyl group to the phthalimide ring did not improve the cytotoxic action.

Thus, considering the high mitotic capacity and resistance of the GBM strains to which part of their malignity is attributed, the fact that the molecule of LASSBio-596 is used in these cells and demonstrate an important cytotoxic activity with lower effect on PBMC, compared to its prototype thalidomide and TMZ, suggest it as an important candidate drug prototype for GBM.

Thalidomide, which is composed by phthalimide and glutarimide subunits, is described for some tumoral strains as cytotoxic by its apoptotic action. However, this activity also extends to monocytes in cytochrome c-dependent pathway, activating procaspase-9 and effector caspase-3, promoting the manifestation of classical apoptosis signals in a PBMC assay. In addition, other effects have been observed as action on death-associated receptors, including increased TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) activity, increased apoptosis inducer sensitivity, and increased caspase-8 expression (50-51). In part, this mechanism may explain the greater cytotoxic effect in PBMC cells compared to the hybrid LASSBio-596, and the phthalimide closed ring and the presence of glutarimide at a lower action on the GBM02 tumoral lineage.

This better selectivity pattern of the LASSBio-596 molecule can be attributed to its hybridization, an objective that justifies the use of this structural feature. The incorporation of a side chain with anti-PDE5 activity suggests a higher antitumor activity, since it has already described that sildenafil treatment induced cell arrest at G1 phase and apoptosis with the increasing accumulation of intracellular ROS in the concentration- and time-dependent manners (52). Interestingly, accumulating evidences indicate that cancer cells express the lower levels of PKG in comparison with normal tissue (53-54). The increased activation of PKG by cGMP induced apoptosis and growth arrest in breast cancer cells (55), and the increased expression

of PKG decreased invasiveness and tumor growth of human colon cancer xenograft models in nude mice (54). PDE inhibitor sulindac sulfide specifically inhibited cGMP hydrolysis and activated PKG to produce apoptosis in breast cancer cells, but had no effect on normal human mammary epithelial cells (36). Thus, a better activity of the hybrid LASSBio-596 is justified.

In vitro effects can be not directly extrapolated for *in vivo* models. Thus, evaluating the pharmacological actions of this compound in complete biological systems becomes an obligatory requirement. In order to assess the *in vivo* antitumoral action, it is necessary more studies *in vitro* for comprovation of mechanism of action of this compound as well the evaluation in animal models in order to confirm the potential of LASSBio-596 in the treatment of glioblastoma.

References

- 1 Wesseling P, Kros JM and Jeuken JWM: The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. *Diagn Histopathol* 17, 486-494, 2011.
- 2 Ghosh M, Shubham S, Mandal K, Trivedi V, Chauhan R, Naseera S: Survival and prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. *Indian J Cancer* 54, 362-367, 2017.
- 3 Alifieris C and Trafalis DT: Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 152, 63–82, 2015.
- 4 Frosina G: Limited advances in therapy of glioblastoma trigger reconsideration of research policy. *Crit Rev Oncol Hemat* 96, 257–261, 2015.
- 5 Paolillo M, Boselli C and Schinelli S: Glioblastoma under siege: an overview of current therapeutic strategies. *Brain Sci* 8, 1-13, 2018.
- 6 Kim JH and Scialli AR: Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci* 122, 1-6, 2011.
- 7 Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI and Anderson KC: Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96, 2943-2950, 2000.
- 8 Cook KM and Figg WD: Angiogenesis inhibitors – current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 60, 222-243, 2010.

- 9 Costa PM, Costa MP, Carvalho AA, Cavalcanti SMT, Cardoso MVO, Filho GBO, Viana DA, Fachine-Jamacaru FV, Leite ACL, Moraes MO, Pessoa C and Ferreira PMP: Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chem Biol Interact* 239, 174-183, 2015.
- 10 Lima LM, Fraga CAM and Barreiro EJ: O renascimento de um fármaco: talidomida. *Quim Nova* 24, 683-688, 2001.
- 11 Rocco PRM, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Légora-Machado A, Koatz VLG, Lima LM, Barreiro EJ and Zin WA: Therapeutical potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* 22, 20-27, 2003.
- 12 Campos HS, Xisto DG, Oliveira MBG, Teixeira I, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Lima LM, Barreiro EJ, Faffe DS, Zin WA, Lapa-Silva JR and Rocco PRM: Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. *Braz J Med Biol Res* 39, 283-287, 2006.
- 13 Lima LM and De Lima NM: Contribuição do LASSBio® no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. *Rev Virtual Quim* 1, 35-48, 2009.
- 14 Mazzocchi L, Cadoso SH, Amarante GW, De Sousa MV, Domingues R, Machado MA, de Almeida MV and Teixeira HC: Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. *Biomed Pharmacother* 66, 323-329, 2012.
- 15 Balça-Silva J, Matias D, Do Carmo A, Girão H, Moura-Neto V, Sarmento-Ribeiro AB, Lopes MC: Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1850, 722-732, 2015.
- 16 Xu HU, Bihari F, Whitehead S, Wong E, Schmid S and Hebb MO: In Vitro Validation of Intratumoral Modulation Therapy for Glioblastoma. *Anticancer Res* 36, 71-80, 2016.
- 17 Gras J: Pomalidomide for patients with multiple myeloma. *Drugs Today (Barc)* 49: 555-562, 2013.
- 18 Andhavarapu S and Roy V: Immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 6: 69-82, 2013.
- 19 Chanan-Khan AA, Swaika A, Paulus A, Kumar SK, Mikhael JR, Rajkumar SV, Dispenzieri A and Lacy MQ: Pomalidomide: The new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 3: e143, 2013.
- 17 Kesari S, Schiff D, Henson JW, Muzikansky A, Gigas DC, Doherty L, Batchelor TT, Longtine JA, Ligon KL, Weaver S, Laforme A, Ramakrishna N, Black PM, Drappatz J, Ciampa A, Folkman J, Kieran M, and Patrick Y. Wen: Phase II study of temozolomide, thalidomide and celecoxibe for newly diagnosed glioblastoma in adults. *Neuro-Oncol* 10, 300-309, 2008.

- 18 Hassler MR, Sax C, Flechl B, Ackerl M, Preusser M, Hainfellner JA, Woehrer A, Dieckmann KU, Rössler K, Prayer D, and Marosi C: Thalidomide as palliative treatment in patients with advanced secondary glioblastoma. [Oncol](#) 88, 173-179, 2015.
- 19 Baumann F, Bjeljac M, Kollias SS, Baumert BG, Brandner S, Rousson V, Yonekawa Y, and Bernays RL: Combined thalidomide and temozolomide treatment in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 67, 191-200, 2004.
- 20 Hashimoto Y: Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg Med Chem* 10, 461-479, 2002.
- 21 Hashimoto Y: Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. *Arch Pharm* 341, 536-547, 2008.
- 22 Shibata Y, Shichita M, Sasaki K, Nishimura K, Hashimoto Y, and Iwasaki S: N-alkylphthalimides: structural requirement of thalidomidal action on 12-o-tetradenoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor alpha production by human leukemia HL-60 cells. *Chem Pharm Bull* 43, 177-179, 1995.
- 23 Shibata Y, Sasaki K, Hashimoto Y, and Iwasaki S: Phenylphthalimides with tumor necrosis factor alpha production-enhancing activity. *Chem Pharm Bull* 44, 156-162, 1996.
- 24 Meng XB, Han D, Zhang SN, Guo W, Cui JR, and Li ZJ: Synthesis and anti-inflammatory activity of N-phthalimidomethyl 2,3-dideoxy- and 2,3-unsaturated glycosides. *Carbohydr Res* 342, 1169-1174, 2007.
- 25 Almeida MV, Teixeira FM, Souza MVN, Amarante GW, Alves CCS, Cardoso SH, Mattos AM, Ferreira AP, and Teixeira HC: Thalidomide analogs from diamines: synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. *Chem Pharm Bull* 55, 223-226, 2007.
- 26 [Capitosti SM](#), [Hansen TP](#), and [Brown ML](#): Thalidomide analogues demonstrate dual inhibition of both angiogenesis and prostate cancer. *Bioorg Med Chem* 15, 327-336, 2004.
- 27 Pessoa C, Ferreira PMP, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Cavalcanti SMT, Coelho LL, Hernandez MZ, Leite ACL, Simone CA, Costa VMA, Souza VMO: Discovery of phthalimides as immunomodulatory and antitumor drug prototypes. *Chem Med Chem* 5, 523-528, 2010.
- 28 Araujo CRM, Leite-Filho CA, Santos VLA, Maia GLA, and Gonsalves AD: Drug development by molecular hybridization: a medicinal chemistry practice class using paracetamol and sulfadiazine tablets and the virtual tool SciFinder®, *Quím Nova* 38, 868-873, 2015.
29. Valli M, Betti AH, Danuello A, Pivatto M, Centuriao F, Antonio CB, Rates SMK, and Bolzani VS: Pyridinic analog of the natural product (-)-spectaline as potential

adjuvant for the treatment of central nervous system disorders. *Bioorg Med Chem Lett* 25, 2247-2250, 2015.

30 Bender AT and Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58, 488-520, 2006.

31 Karami-Tehrani F, Moeinifard M, Aghaei M, and Atri M: Evaluation of PDE5 and PDE9 expression in benign and malignant breast tumors. *Arch Med Res* 43, 470-475, 2012.

32 Eggen T, Sager G, Berg T, Nergaard B, Moe BT and Orbo A: Increased gene expression of the ABCC5 transporter without distinct changes in the expression of PDE5 in human cervical cancer cells during growth. *Anticancer Res* 32, 3055-3061, 2012.

33 Zhang X, Yan G, Ji J, Wu J, Sun X, Shen J, Jiang H and Wang H: PDE5 inhibitor promotes melanin synthesis through the PKG pathway in B16 melanoma cells. *J Cell Biochem* 113, 2738-2743, 2012.

34 Zhu B and Strada SJ: The novel functions of cGMP-specific phosphodiesterase 5 and its inhibitors in carcinoma cells and pulmonary/cardiovascular vessels. *Curr Top Med Chem* 7, 437-454, 2007.

35 Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, Binet JL, Delic J and Merle-Beral H: Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 101, 265-269, 2003.

36 Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB, Zhang W, Abadi AH, Reynolds RC, and Piazza GA: Sulindac sulfide selectively inhibits growth and induces apoptosis of human breast tumor cells by phosphodiesterase 5 inhibition, elevation of cyclic GMP, and activation of protein kinase G. *Mol Cancer Ther* 8, 3331-3340, 2009.

37 Zhu B, Vemavarapu L, Thompson WJ, and Strada SJ: Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells. *J Cell Biochem* 94, 336-350, 2005.

38 Whitehead CM, Earle KA, Fetter J, Xu S, Hartman T, Chan DC, Zhao TL, Piazza G, KleinSzanto AJ, Pamukcu R, Alila H, Bunn PA Jr, and Thompson WJ: Exisulind-induced apoptosis in a non-small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol Cancer Ther* 2, 479-488, 2003.

39 Piazza GA, Thompson WJ, Pamukcu R, Alila HW, Whitehead CM, Liu L, Fetter JR, Gresh WE Jr, Klein-Szanto AJ, Farnell DR, Eto I, and Grubbs CJ. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 3961-3968, 2001.

40 Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, and Pamukcu R: Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic

monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 60, 3338-3342, 2000.

41 Whitt JD, Li N, Tinsley HN, Chen X, Zhang W, Li Y, Gary BD, Keeton AB, Xi Y, Abadi AH, Grizzle WE, and Piazza GA: A novel sulindac derivative that potently suppresses colon tumor cell growth by inhibiting cGMP phosphodiesterase and beta-catenin transcriptional activity. *Cancer Prev Res* 5, 822-833, 2012.

42 Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB, Lu W, Li Y, and Piazza GA: Inhibition of PDE5 by sulindac sulfide selectively induces apoptosis and attenuates oncogenic Wnt/beta-catenin-mediated transcription in human breast tumor cells. *Cancer Prev Res* 4, 1275-1284, 2011.

43 Mohamed HA, Girgis NM, Wilcken R, Bauer MR, Tinsley HN, Gary BD, Piazza GA, Boeckler FM, and Abadi AH: Synthesis and molecular modeling of novel tetrahydro-beta-carboline derivatives with phosphodiesterase 5 inhibitory and anticancer properties. *J Med Chem* 54, 495-509, 2011.

44 Tinsley HN, Gary BD, Thaiparambil J, Li N, Lu W, Li Y, Maxuitenko YY, Keeton AB, and Piazza GA. Colon tumor cell growth-inhibitory activity of sulindac sulfide and other nonsteroidal antiinflammatory drugs is associated with phosphodiesterase 5 inhibition. *Cancer Prev Res* 3, 1303-1313, 2010.

45 OLIVEIRA, V. R. et al. Lung and liver responses to 1- and 7-day treatments with LASSBio-596 in mice subchronically intoxicated by microcystin-LR. **Toxicol**, v. 141, p. 1–8, jan. 2018.

46 Padilha GA, Henriques I, Lopes-Pacheco M, Abreu SC, Oliveira MV, Morales MM, Lima LM, Barreiro EJ, Silva PL, Xisto DG, and Rocco PR: Therapeutic effects of LASSBio-596 in an elastase-induced mouse model of emphysema. *Front Physiol* 6, 267, 2015.

47 Pereira IE: Síntese e avaliação da atividade anti-inflamatória de novos análogos da talidomida contendo uma estrutura ftalimida aberta. Dissertação de mestrado – 2017.

48 Lamie PF, Phillopes JN, El-Gendy AO, Rarova L, and Gruz J: Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as *in vitro* Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* 20, 16620-16642, 2015.

49 Beraldo H: Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications. *Quím. Nova* 27, 461-47, 2004.

50 Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, and Baldwin AB: Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *J Biol Chem* 276, 22382-22387, 2001.

51. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi NC, Treon SP, and Anderson KC: Apoptotic signaling induced by

immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 99, 4525-4530, 2002.

52 Mei XL, Yang Y, Zhang YJ, Li Y, Zhao JM, Qiu JG, Zhang WJ, Jiang QW, Xue YQ, Zheng DW, Chen Y, Qin WM, Wei MN, and Shi Z: Sildenafil inhibits the growth of human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Am J Cancer Res* 5, 3311-3324, 2015.

53 Hou Y, Gupta N, Schoenlein P, Wong E, Martindale R, Ganapathy V, and Browning D: An anti-tumor role for cGMP-dependent protein kinase. *Cancer Lett* 240, 60-68, 2006.

54 Yamanaka Y, Mammoto T, Kirita T, Mukai M, Mashimo T, Sugimura M, Kishi Y, and Nakamura H: Epinephrine inhibits invasion of oral squamous carcinoma cells by modulating intracellular cAMP. *Cancer Lett* 176, 143-148, 2002.

55 Fallahian F, Karami-Tehrani F, Salami S, and Aghaei M. Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. *FEBS J* 278, 3360-3369, 2011.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é possível concluir que o análogo da Talidomida LASSBio-596 induziu efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos *in vivo*, bem como demonstrou maior citotoxicidade para linhagem tumoral GBM02 do que para leucócitos comparativamente ao seu protótipo, amplificando a potencialidade deste composto racionalmente planejado como imunossupressor.

REFERÊNCIAS

- AKRAMAS, L. Anti-inflammatory effect of herbal preparations on adjuvant arthritis in rats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 41, p. 748–756, 2017.
- AGGARWAL, B. B.; SUNG, B.; GUPTA, S.C. Inflammation and câncer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 816, p. 76-96, 2014.
- ALBULESCU, R. et al. Cytokine Patterns in Brain Tumour Progression. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 152, p. 63–82, 2015.
- ALMEIDA, M.V. et al. Thalidomide analogs from diamines: synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 223-226, 2007.
- ALONSO, M. M. et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. **Cancer Research**, v. 67, p. 11499-11504, 2007.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatoid**, v. 46, p. 328-46, 2002.
- ANDERSON, E. et al. Randomized Phase III controlled trials of therapy in malignant glioma: where are we after 40 years? **British Journal of Neurosurgery**, v. 22, n. 3, p. 339–349, 2008.
- ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGF-beta activation. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 217–224, 2003.
- ARAUJO, G. L. A. et al. Toxicological *in vitro* and subchronic evaluation of LASSBio-596. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 148-156, 2014.
- ARRIETA, V. A. et al. The possibility of cancer immune editing in gliomas: a critical review. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 7, e-1445451-e-1445459, 2018.
- BANAN, R.; HARTMANN, C. The new WHO 2016 classification of brain tumors-what neurosurgeons need to know. **Acta Neurochirurgica**, v. 159, n. 3, p. 403-418, 2017.
- BARBOSA, M.L.C. et al. Therapeutic approaches for tumor necrosis factor inhibition. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 427-446, 2011.

BARROSO, K. F. P. **Caracterização farmacognóstica, físico-química e ensaios biológicos *in vitro* do extrato bruto e frações de *Struthanthus marginatus* blume (erva-de-passarinho)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

BARTLETT, J. B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 314–322, 2004.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284. 2009.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não-esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 522-529, 2010.

BEAULIEU, P. et al. **Pharmacology of Pain**. 1st edition. Seattle, IASP Press, 2010.

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, p. 151-159, 2007.

BENITEZ, J. A. et al. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-14, 2018.

BJARNASON, I. et al. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**, v. 154, p. 500–514, 2018.

BJORKMAN, S. et al. Enantiomers of thalidomide: Blood distribution and the influence of serum albumin on chiral inversion and hydrolysis. **Chirality**, v. 10, p. 223–228, 1998.

BLECHA, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. **Veterinary Clinics of North America-Food animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 621-633, 2001.

BOISSIER, M. C. et al. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. **Journal of Autoimmunity**, v. 39, n. 3, p. 222-228, 2012.

BORROTO-ESCUELA, D. O. et al. On the G-protein-coupled receptor heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions in the central nervous system:

Focus on their role in pain modulation. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-17, 2013.

BOSMA-DEN BOER, M. M.; VAN WETTEN, M.; PRUIMBOOM, L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, p. 1-14, 2009.

BOTELHO, S. F.; MARTINS; M. A. P.; REIS, A. M. M. Análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde e da carga de doença. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 1, p. 215-228, 2018.

BRADA, M. et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. **Annals of Oncology**, v. 12, p. 259–266, 2001.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 2013.

CALDER, P. C. et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, sup. S1, p. 1-47, 2009.

CAMBRUZZI, E. The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 5, p. 338-344, 2017.

CAMPOS, H. S. et al. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 283-287, 2006.

CARE. **How does the immune system work?** USA: Pudmed Health; 2010 [updated Julho 2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0010386/>.

CARVALHO, G. M. et al. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicon**, v. 56, p. 604-612, 2010.

CASQUILHO, N. V. et al. LASSBio 596 per os avoids pulmonary and hepatic inflammation induced by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 58, p. 195-201, 2011.

CASTRO, R. A. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

CATTANI, V. B. et al. Resumo do 7th **International Congress of Pharmaceutical Sciences**, Ribeirão Preto, Brasil, 2009.

CHAICHANA, K. L. et al. When gross total resection of a glioblastoma is possible, how much resection should be achieved? **World Neurosurgery**, v. 82, n. 1-2, p. e257–e265, 2014.

CHANDRATRE, P. et al. Health-related quality of life in gout: a systematic review. **Rheumatology**, v. 52, n. 11, p. 2031-2040, 2013.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEN, J. et al. Comprehensive evaluation of different Thelper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

CHEN, J.; MCKAY, R. M.; PARADA, L. F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 36-47, 2012.

CHEN, L.; MAO, Y. Gross total resection plays a leading role in survival of patients with glioblastoma multiforme. **World Neurosurgery**, v. 82, n. 1-2, p. e105–e107, 2014.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, suppl 5, p. v3-v11, 2012.

CHUNG, K.F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European Journal of Pharmacology**, v.533, n.1-3, p.110-117, 2006.

CICCHITTI, L.; MARTELLI, M.; CERRITELLI, F. Chronic inflammatory disease and osteopathy: a systematic review. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-18, 2015.

COHEN, A. L.; HOLMEN, S. L.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 5, p. 1-13, 2013.

COLLIN, X. et al. New anti-inflammatory N-pyridinyl(alkyl)phthalimides acting as tumour necrosis factor-alpha production inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 639-649, 2001.

CORRAL, L. G. et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 380-386, 1999.

COSTA, P. M. **Avaliação do potencial antitumoral e antiangiogênico de novos análogos ftalimídicos da talidomida**. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2011.

COSTA, V. S. C. et al. High anti-Inflammatory activity and low toxicity of thalidomide analogs. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 334-339, 2015.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p.1-32, 2009.

DAVIS, M. E. Glioblastoma: overview of disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n. 5, p. S2-S8, 2016.

CRAGG, J. et al. Neuropathic pain, depression, and cardiovascular disease: a national multicenter study. **Neuroepidemiology**, v. 44, p. 130–137, 2015.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DAHER, J. B.; MELO, M. D.; TONUSSI, C. R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 76, n. 20, p. 2349-2359, 2005.

DEGUINE, J. New Flavors in Immunomodulation. **Cell**, v. 173, p. 1553-1555, 2018.

DENNY, B.J. et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. **Biochemistry**, v. 33, p. 9045-9051, 1994.

DIMITROULAS, T. et al. Biologic therapies and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 10, p. 958-966, 2013.

ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, V.; BAMIAS, A.; DIMOPOULOS, M. A. Thalidomide in cancer medicina. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1151-1160, 2004.

ERIKSSON, T. et al. Stereospecific determination, chiral inversion *in vitro* and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. **Chirality**, v. 7, p. 44–52, 1995.

ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 671–680, 2001.

FAUCI, A. S. et al. **Introduction to the immune system**. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: B. F. Haynes, A. S. Fauci, 2005.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line, 2011.

FINNERUP, N. et al. Phenotypes and predictors of pain following traumatic spinal cord injury: a prospective study. **Journal of Pain**, v. 15, p. 40–48, 2014.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FONTANA, A. et al. Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: a role in resistance to immune rejection? **Ciba Foundation Symposium**, v. 157, p. 232–238, 1991.

FORNASARI, D. Pain pharmacology: focus on opioids. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 165-168, 2014.

FRANCO, M. et al. **Patologia: processor gerais**. 5a edição. São Paulo: Atheneu, 2010.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Talidomide. **Lancet**, v. 363, p. 1802–1811, 2004.

FREITAS, T. A. **Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2017.

FROSINA, G. Limited advances in therapy of glioblastoma trigger reconsideration of research policy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 96, p. 257–261, 2015.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

GALCERAN, J. et al. Cancer incidence in Spain, 2015. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, p. 1–27, 2017.

GUANTAI, E.; CHIBALE, K. How can natural products serve as a viable source of lead compounds for the development of new/novel anti-malarials? **Malaria Journal**, v. 10, suppl 1, S1-S8, 2011.

GUINDON, J. A novel inhibitor of endocannabinoid catabolic enzymes sheds light on behind the scene interplay between chronic pain, analgesic tolerance, and heroin dependence. **Neuropharmacology**, v. 114, p. 168-171, 2017.

GUTIERREZ-GUTIERREZ, G. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. **Clinical and Translational Oncology**, v. 12, n. 2, p. 81-91, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011.

HADI, V. et al. Evaluation of *Jatropha isabelli* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 65, p. 376-80, 2013.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 7th. ed. [s.l.]. Editora: Wolters Kluwer, 2012.

HAN, S. J.; SUGHRUE, M. E. The Rise and Fall of “Biopsy and Radiate”: A History of Surgical Nihilism in Glioma Treatment. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 207–214, 2012.

HARDESTY, D. A.; SANAI, N. The value of glioma extent of resection in the modern neurosurgical era. **Frontiers in Neurology**, v. 3, p. 1–8, 2012.

HASSLER, M. R. et al. Thalidomide as palliative treatment in patients with advanced secondary glioblastoma. **Oncology**, v. 88, n. 3, 173-179, 2015.

HASUDUNGAN, A. **Nociceptors - an introduction to pain**, 2013.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 139-147, 2015.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. An overview of treatment approaches for chronic pain management. **Rheumatology International**, v. 37, n. 1, p. 29-42, 2017.

IKEDA, T. et al. Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. **Neuroscience Research**, v. 63, p. 42-46, 2009.

IASP. **INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN** (2012). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/index.aspx>> Access in: 16/07/2018.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.], 2016.

ISAAC, CESAR et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010.

ITO, T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science**, v. 327, n. 5971, p. 1345-1350, 2010.

JACKSON, C. et al. Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma multiforme microenvironment. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-20, 2011.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptor as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 247-264, 2006.

JANEWAY, C.A.J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th ed. New York: Garland Science, 2001.

JIN, Y. et al. Expression and prognostic significance of p53 in glioma patients: a meta-analysis. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 7, p. 1723-1731, 2016.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAKKAR, A. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. **Neurology India**, v. 59, n. 2, p. 254-261, 2011.

KATSETOS, C. D. et al. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme, I-class III beta-tubulin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 3, p. 505-513, 2009.

KAUR, B.; TAN, C.; BRAT, D. J. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. **Journal of Neuro-oncology**, v. 70, n. 2, p. 229-243, 2004.

KENYON, B. M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R. J. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 64, p. 971-978, 1997.

KIM, J. et al. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 33, n. 1, p. 52-59, 2013.

KIRKBRIDE, K. C.; BLOBE, G. C. Inhibiting the TGF-beta signalling pathway as a means of cancer immunotherapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, p. 251-261, 2003.

KRAMER, J. et al. Neuropathic pain following traumatic spinal cord injury: models, measurement, and mechanisms. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p. 1295-1306, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia básica**. 9a edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2013.

KUMARI, K. D. K. P. et al. Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in *Wistar* rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1202-1208, 2014.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.

LAAR, M. V. et al. Pain treatment in arthritis-related pain: beyond NSAIDs. **The Open Rheumatology Journal**, v. 6, p. 320-30, 2012.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n. 4, p. 615-650, 2000.

LAKHAN, S. E.; HARLE, L. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 3, n. 1, p. 87-89, 2009.

LAVETI, D. et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. **Inflammation and Allergy-Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 349-361, 2013.

LEE, E. B. et al. Tofacitinib *versus* methotrexate in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 25, p. 2377-2387, 2014.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes and Diseases**, v. 3, p. 198-210, 2016.

LIMA, L. M.; DE LIMA, N. M. Contribuição do LASSBio® no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 35-48, 2009.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LINDSAY, K. et al. The experience and impact of living with gout: a study of men with chronic gout using a qualitative grounded theory approach. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 17, p. 1-6. 2011.

LINDSTROM, T. M.; ROBINSON, W. H. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 58, n. 8, p. 1565-1575, 2010.

LIPWORTH, B. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 365, n. 9454, p.167-175, 2005.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOPES, S. C. **Atividade antinociceptiva da mangiferina, uma glicosilxantona isolada de *Mangifera indica* L. em camundongos**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2012.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LOWELL, C. A.; MAYADAS, T. N. Overview: studying integrins *in vivo*. **Methods in Molecular Biology**, v. 757, p. 369-397, 2012.

MACHADO, A. L. et al. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1169-1172, 2005.

MACPHERSON, G R. et al. Current status of thalidomide and its role in the treatment of metastatic prostate cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 46, p. S49-S57, 2003.

MAHIMA, A. K. et al. Nutraceuticals from fruits and vegetables at a glance: a review. **Journal of Biological Sciences**, v. 13, p. 38-47, 2013.

MALLEO, G. et al. Effects of thalidomide in a mouse model of cerulein-induced acute pancreatitis. **Shock**, v. 29, n.1, p. 89-97, 2008.

MARRA, J. S. Sobrevida após radioterapia para gliomas de alto grau. Dissertação de Mestrado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2016.

MARTÍNEZ-GARCIA, M. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma. **Clinical Translational Oncology**, v. 20, p. 22-28, 2018.

MAZZOCCOLI, L. et al. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 323-329, 2012.

MCGIRT, M. J. et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. **Journal of Neurosurgery**, v. 110, n. 1, p. 156–162, 2009.

MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 7-8, p. 1489-1499, 2007.

MENDES, R. T. et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 767-782, 2012.

MENDEZ, S. P. et al. Desenvolvimento de uma cartilha educativa para pessoas com dor crônica. **Revista Dor**, v.18, n.3, p. 199-2011, 2017.

MOODY, C. L.; WHEELHOUSE, R. T. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 7, p. 797-838, 2014.

MORI, T. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-14, 2018.

MORO, A.; INVERNIZZI, N. A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e por melhor regulação de medicamentos. **História, Ciências, Saúde**, v. 24, n. 3, p. 603-622, 2017.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

MOTA, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 135-174, 2012.

MOTON, S. et al. Imaging genomics of glioblastoma: biology, biomarkers, and breakthroughs. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 24, p.155-163, 2015.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, p. 871–882, 2010.

NAVRATILOVA, E. et al. Evaluation of reward from pain relief. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1282, p. 1-11, 2010.

NISHIMURA, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. (S)-form of alpha-methyl-N(alpha)-phthalimidoglutaramide, but not its (R)-form, enhanced phorbol ester-induced tumor necrosis factor-alpha production by human leukemia cell HL-60: implication of optical resolution of thalidomidal effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1157-1159, 1994.

NUNES, M. V. O. et al. Comparação do perfil de anticorpos antiimunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 44-50, 2009.

OCEAN, A.; VAHDAT, L. Chemotherapy induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies. **Supportive Care in Cancer**, v. 12, n. 9, p. 619-625, 2004.

OGAWA, K. et al. Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with multiagent chemotherapy (procarbazine, nimustine, and vincristine) for highgrade gliomas: Long-term results. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 82, n. 2, p. 732-738, 2012.

OGECHUKWU, O.E. et al. Immunomodulatory activity of a lupane triterpenoid ester isolated from the eastern Nigeria mistleoe, *Loranthus micranthus* (Linn). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 7, p. 514-522, 2011.

OHBA, S.; HIROSE, Y. Biological significance of mutant isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in gliomagenesis. **Neurologia Medico-Chirurgica**, v. 56, n. 4, p. 170-179, 2016.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 6892-6899, 2004.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

PADILHA, G. A. Therapeutic effects of LASSBio-596 in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 267, p. 1-10, 2015.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 2008.

PATEL, A. P.; et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, p. 1396-1401, 2014.

PAWAR, V. et al. Cartilage targeted chemical delivery of naproxen and ibuprofen for the treatment of arthritis. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, p. S10-S11, 2012.

PEDROSA, M. E. **Efeito imunomodulador das células mesenquimais do estroma em células T na artrite reumatóide**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Aveiro, 2014.

PEÑARANDA-FAJARDO, N. M.; MEIJER, C.; KRUYT, F. A. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 118, p. 1-8, 2016.

PERDIKI, M. et al. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas: relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 295, n. 1, p. 75-83, 2007.

PHILLIPS, C. The cost and burden of chronic pain. **Review Pain**, v. 3, p. 2-5, 2009.

PINHEIRO, R. M.; WANNMACHER, L. **Uso racional de anti-inflamatórios não esteroides**. Brasília: Ministério da Saúde: Editora MS, 2010.

PIRES, L. F. **Investigação comparativa da atividade antinociceptiva do terpinoleno livre e de formulação transdérmica em um modelo de dor neuropática**. Tese de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, 2018.

PIRES, P. A. **Potencial analgésico, anti-edematogênico, antipirético e atividade ulcerogênica de fármacos anti-inflamatórios em roedores**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

QUASTHOFF, S.; HARTUNG, H. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 1, p. 9-17, 2002.

RIBEIRO, J. C. M. L. **Potencial efeito inibitório do LASSBio-596, um análogo da talidomida, na angiogênese inflamatória em córnea de coelho.** Dissertação de Mestrado em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, 2011.

RESENDE, F. C. B. et al. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v. 27, n. 3, p.116-124, 2004.

RIPA, L. et al. Discovery of a novel oral glucocorticoid receptor modulator (AZD9567) with improved side effect profile. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1785-1799, 2018.

RIVA, M. et al. Temozolomide and thalidomide in the treatment of glioblastoma multiforme. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1067-1072, 2007.

ROCCO, P. R. M. et al. Therapeutical potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **European Respiratory Journal**, v. 22, p. 20-27, 2003.

ROCCO, P. R. M. et al. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 10-27, 2010.

RODRIGUES, J. C. et al. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. **Neuro-oncology**, v. 12, p. 351-365, 2010.

ROSMAN, Z.; SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. **BioMed Central Medicine**, v. 11, p. 88-100, 2013.

SANDOVAL, A. C. et al. O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 165-176, 2017.

SANLI, A. M. et al. Unusual manifestations of primary glioblastoma multiforme: a report of three cases. **Surgical Neurology International**, v. 1, p. 87-92, 2010.

SANTACROCE, A. et al. Radiobiology of radiosurgery for the central nervous system. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SANTOS, G. T. **Participação do receptor TRPA-1 em modelos de ataque agudo de gota em roedores.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

SAXNE, T.; WALHEIM, F. A. Cyclosporine A in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Disorders**, v. 62, p. 1121-1126, 2003.

SBED. Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2012. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/publico/index.asp>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

SCARIM, C. B. et al. NSAIDs and natural products interactions: mechanism and clinical implications. **Journal of Immunology and Clinical Research**, v. 4, n. 2, p. 1040-1051, 2017.

SCHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 5th. edition. McGraw Hill: New York, 2005.

SCHETT, G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: osteoclasts. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p.1-6, 2007.

SCHNEIDER, T. et al. Gliomas in adults. **Archives of Deutsches Ärzteblatt International**, v. 107, n. 45, p. 799-807, 2010.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, p. 494-503, 2006.

SÉHÉDIC, D. et al. Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stemlike cells and surviving clones. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, p. 236-252, 2015.

SHARP, J. T. et al. Treatment with leflunomide slows radiographic progression of rheumatoid Arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, p. 495-505, 2000.

SIDDALL, P.; LOESER, J. Pain following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 39, p. 63-73, 2001.

SIDDALL, P. et al. A longitudinal study of the prevalence and characteristics of pain in the first 5 years following spinal cord injury. **Pain**, v. 103, p. 249–257, 2003.

SILVA, J. D. Respiratory and systemic effects of LASSBio596 plus surfactant in experimental acute respiratory distress syndrome. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 821-835, 2016.

SILVA, R. N. F; PEREIRA, L. C. G. O uso de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais no controle da dor e do edema em cirurgia de terceiros molares. **Revista Baiana de Odontologia**, v. 7, n. 1, p. 31-39, 2016.

SINGHAL, S.; MEHTA, J. Thalidomide in cancer: potential uses and limitations. **BioDrugs**, v. 11, p. 163-172, 2001.

SOTTORIVA, A. et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 10, p. 4009-4014, 2013.

SOUZA, F. C. **Eicosanoides como novos alvos terapêuticos no tratamento de glioblastoma humano**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

SOUZA, F. C. B.; SILVA, M. Z. M. Controle do processo inflamatório na odontologia com anti-inflamatórios não esteroidais. **Revista Uningá**, v. 20, n. 2, p. 35-42, 2014.

SOUZA, M. C. P.; LOURENÇO, J. R. F.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R. Imunodulação em modelo experimental de artrite reumatóide submetido ao tratamento de complexo de paládio e natação. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v.11. n. 67, p.439-446, 2017.

STUPP, R. et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 1375-1382, 2002.

STUPP, R. et al. Radiotherapy *plus* concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987-996, 2005.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E. et al. Methotrexate for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Systematic Review**, v. 2, CD000957, 2000.

TANAKA, S. et al. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 14-26, 2013.

TEIXEIRA, F. M. **Avaliação comparativa do efeito de fármacos anti-inflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

TEO, S. K. et al. Chiral inversion of the second generation IMiD (TM) CC-4047 (ACTIMID (TM)) in human plasma and phosphatebuffered saline. **Chirality**, v. 15, p. 348-351, 2003.

TISDALE, M. J. Antitumor imidazotetrazines--XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 457-462, 1987.

TINSLEY, H. N.; PIAZZA, G. A. Novel therapeutics: NSAIDs, derivatives, and phosphodiesterases. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 8, p. 325-330, 2012.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TREEDE, R. D. et al. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TRITSCHLER, I. al. Modulation of TGF-beta activity by latent TGF-beta binding protein 1 in human malignant glioma cells. **International Journal of Cancer**, v. 125, p. 530-540, 2009.

UNICAMP. **Astrocitomas difusos – microscopia e classificação**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/bineuastrocitomamicro.html#classif>>. Acesso em 15 de agosto de 2018.

VELIZ, I. et al. Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 7-21, 2015.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

VIANA, N. L. **Efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* na inflamação crônica induzida por implantes sintéticos em camundongos**. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

VIEIRA, A. C. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Punica granatum* (Romã)**. Dissertação de Mestrado em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, 2014.

VIERCK, C.; YEZIERSKI, R. Comparison of operant escape and reflex tests of nociceptive sensitivity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 223-242, 2015.

VITUCCI, M.; HAYES, D. N.; MILLER, C. R. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. **British Journal of Cancer**, v. 104, p. 545-553, 2011.

WALKER, M. D. et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. **The New England Journal of Medicine**, v. 303, p. 1323-1329, 1980.

WALKER, S. M. Overview of neurodevelopment and pain research, possible treatment targets. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, v. 28, p. 213-228, 2014.

WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WATSON, T. **Soft tissue repair and healing review**. 2012. Disponível em: <<http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review>>. Acesso em: 26 de Julho de 2018.

WESSELING, P.; KROS, J. M.; JEUKEN, J. W. M. The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. **Diagnostic Histopathology**, v. 17, n. 11, p. 486-494, 2011.

WHITTAKER, A.; HOWARTH, G. et al. Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: how are we progressing? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 151, p. 1–12, 2014.

WILSON, C. B. Chemotherapy of brain tumors. **Advances in Neurology**, v. 15, p. 361-367, 1976.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: state of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, v. 8, n. 5, p. 64, 2014.

WISEMAN, A. C. Immunosuppressive Medications. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 332-343, 2016.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3742-3744. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>, 2017. Acesso em: 12 de Julho de 2018.

WNENDT, S. et al. Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. **Chirality**, v. 8, p. 390-396, 1996.

XU, Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 540-545, 2014.

YOUNG, R. M. et al. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 9, p. 121-136, 2015.

YU, Y.C. et al. Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, n. 1, p. 107-113, 2002.

YUNG, W. K. et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal. Brain Tumor. Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 9, p. 2762–2771, 1999.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F.G. ; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance current molecular pharmacology. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 102-114, 2012.

ZHANG, J. M.; An, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHEN, L. et al. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. **Journal of Neuro-oncology**, v. 99, p. 165-176, 2010.

ZHU, Y. J.; LU, T. J. A multi-scale view of skin thermal pain: from nociception to pain sensation. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 521-559, 2010.

ZIMMERMANN-FRANCO, D. C. **Investigação dos potenciais anti-inflamatório e antitumoral de análogos do resveratrol**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.

APÊNDICE A – Ficha de avaliação do 1º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.

1º Dia - 20.03.2018

CONDICIONAMENTO - TESTE DA BARRA GIRATÓRIA

① Grupo SAL

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	12"	240"	180"	42"		NÃO ROLA	
3	96"	240"	240"				
4	16"	240"	240"				
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7	19"	240"	240"				

EXCLUSÃO
Animal 1
caixa 5

Animal 5
caixa 5
SUBST.

② Grupo DZP

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	82"	198"	98"	240"	169"	240"	
3	240"	240"					
4	240"	240"					
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7							

Animal 2
caixa 5

③ Grupo T50

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	240"	240"					
3	240"	231"	240"				
4	15"	240"	240"				
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7							

*
Animal 3
caixa 5

④ Grupo LSD

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	240"	240"					
3	29"	240"	240"				
4	102"	240"	240"				
5	240"	216"	240"				
6	240"	240"					
7							

*
Animal 4
caixa 5

Grupo

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

APÊNDICE B – Ficha de avaliação do 2º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.

2º DIA - 21.03.2018

CONDICIONAMENTO - TESTE DA BARRA GIRATÓRIA

Grupo SAL	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2							
3	240"	240"					
4	240"	240"					
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7	240"	240"					

Animal 1
caixa 5
Animal 2
caixa 5

Grupo DEP	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	240"	240"					
3	240"	240"					
4	240"	240"					
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7							

Animal 2
caixa 5

Grupo T50	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	240"	240"					
3	240"	240"					
4	240"	240"					
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7							

Animal 3
caixa 5

Grupo L50	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	240"	240"					
2	240"	240"					
3	240"	240"					
4	240"	38"	240"				
5	240"	240"					
6	240"	240"					
7							

Animal 4
caixa 5

Grupo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação da atividade imunomodulatória de compostos sintéticos e semissintéticos*”, registrada com o nº 41/2017, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 11.08.2017.

Vigência da autorização	01.10.2017 a 31.03.2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Swiss Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	288 31
Peso/idade	-
Sexo	142 machos e 142 fêmeas 31 fêmeas
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da UFAL / Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI- ICBS-UFAL

Maceió, 18 de agosto de 2017.

Profª. Drª. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL
Profª. Drª. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858