

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**EWERTON ALVES PORTELA DOS SANTOS**

**ESTUDO DO PERFIL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO  
DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS INDÓLICOS HOMÓLOGOS  
DO PROTÓTIPO LASSBio-651**

Rio de Janeiro,  
**2009.**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EWERTON ALVES PORTELA DOS SANTOS**

**ESTUDO DO PERFIL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO  
DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS INDÓLICOS HOMÓLOGOS  
DO PROTÓTIPO LASSBio-651**

Volume único

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Palhares de Miranda.

Rio de Janeiro,  
2009.

## FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Ewerton Alves Portela.

Estudo do Perfil Antinociceptivo e Anti-inflamatório de Derivados *N*-Acilidrazônicos Indólicos Homólogos do Protótipo LASSBio-651 / Ewerton Alves Portela dos Santos. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia/ UFRJ, 2009.

.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador (a): Ana Luísa Palhares de Miranda.

1. Inflamação 2. Nocicepção 3. Química Medicinal 4. Derivados *N*-acilidrazônicos indólicos 5. LASSBio-1248 I. Miranda, A. L. P. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro Ciências Farmacêuticas-Faculdade de Farmácia III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ewerton Alves Portela dos Santos.

ESTUDO DO PERFIL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE  
DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS INDÓLICOS HOMÓLOGOS DO PROTÓTIPO  
LASSBio-651

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Aprovada em

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Luísa Palhares de Miranda, Faculdade de Farmácia- UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Farias Benjamim, Instituto de Ciências Biológicas- UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nelilma Correia Romeiro, Instituto de Química- UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yraima Moura Lopes Cordeiro, Faculdade de Farmácia - UFRJ

Esta dissertação foi elaborada a partir de trabalhos experimentais realizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>), Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Palhares de Miranda e com os auxílios financeiros concedidos pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) – processo: 573.564/2008-6, pelo Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX) - processo: E26/171.532/2006 e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), CNPq.



Dedico esta dissertação aos meus pais pelo amor e ensinamentos e aos meus amigos que me ajudaram a suportar momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por não ter dobrado meus joelhos diante às adversidades;

Ao meu pai pela confiança, dedicação, pelos bons conselhos, além dos ótimos e consistentes momentos de alegria;

A minha mãe pela dedicação, torcida, preocupação, pelo incentivo e seu amor irrestrito;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Luisa Palhares de Miranda pela orientação, pela compreensão de alguns momentos difíceis e pela oportunidade concedida, permitindo a continuidade do meu desenvolvimento acadêmico;

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eliezer de Jesus Lacerda Barreiro, coordenador científico do LASSBio<sup>®</sup>, pelos ensinamentos e pelas contribuições prestadas a este trabalho;

Ao LASSBio<sup>®</sup> pelo ambiente propício para o desenvolvimento científico que possibilitou a complementação da minha qualificação pessoal;

Aos professores doutores: Arthur Kümmerle, Carla Menezes, Carlos Alberto Manssour Fraga, Jorge Tributino, Lídia Moreira Lima, Maurício Sant'Anna e Nelilma Correia Romeiro pelas sugestões dispensadas a este trabalho que contribuíram com o processo de aprendizado;

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima que me apresentou o LASSBio<sup>®</sup> como possibilidade para realização do mestrado e também por participar da banca de acompanhamento deste trabalho, assim como a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yraima Moura Lopes Cordeiro;

Ao aluno de mestrado e amigo Fernando Rodrigues não só pela síntese de todas as substâncias avaliadas, mas também por ter contribuído significativamente para o desenvolvimento deste trabalho e pela paciência em discutir minhas dúvidas;

À aluna de doutorado Marina Vieira Martins pela amizade, pelos conselhos e o sincero incentivo desde o início do mestrado;

À mestre Luciana Maramaldo cuja perseverança durante o mestrado foi um exemplo;

Aos mestrandos e amigos Cleverton Kleiton (KC) e Leandro Louback pela amizade, e discussões diárias, por ensinar e acompanhar o aprendizado dos modelos experimentais, além da ajuda com o prisma;

À aluna de iniciação científica Bruna Lima Roedel por realizar o ensaio de TNF- $\alpha$ ;

À mestranda Mila Fumian e aos alunos de iniciação científica Renata Veloso e Thiago Wilson pela amizade e pelo excelente convívio;



Aos meus amigos: Daniel, Rodrigo e Fabinho que estão ao meu lado nos bons e maus momentos;

À Dirlane Cristina pelas palavras de incentivo e fé durante os momentos de tensão;

Aos colegas do LASSBio: Alexandra Basílio, Aline Guerra, Amanda Miranda, Ana Paula Rodrigues, Carolina Ávila, Cristina Villarinho, Daniel Amaral, Douglas Cunha, Eduardo Mazzeu, Éverton D'Andréa, Givanildo dos Santos, Guilherme Barroso, Isabelle Nunes, Luciana Piovesan, Luisa Rezende, Marcela Oliveira, Maria Letícia, Marina Amaral, Marlon Daniel, Nailton do Nascimento, Raquel de Oliveira, Renata Lacerda, Roberta Tesch, Rodolfo do Couto, Tássia Reis, Thiago Sampaio, Thaís de Andrade, Thaíse Martins, Urös Laban, Vitor Sueth e Zaíra dos Santos;

Aos colegas da UFF: às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup>. Christianne Scaramello, Fernanda Carla de Brito e os mestrandos Cecília Seabra, Nádia Alice Vieira e Rafael Cangemi;

À banca examinadora pelo aceite ao convite;

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPERJ, INCT-INOVAR e PRONEX.

“Cada um de nós pode trabalhar para mudar uma pequena parte dos acontecimentos... A história é feita de inúmeros atos de coragem e crença.”

John Kennedy.

## RESUMO

dos Santos, Ewerton Alves Portela. Estudo do perfil antinociceptivo e anti-inflamatório de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos homólogos do protótipo LASSBio-651.

A inflamação é um complexo processo fisiopatológico, envolvendo interações intercelulares que resulta na liberação de diversos mediadores químicos e, conseqüentemente, na formação dos sinais cardinais. Com o intuito de reduzir efetivamente o impacto causado pelas alterações atribuídas à inflamação, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) utilizou a homologação para otimizar o perfil antinociceptivo e anti-inflamatório do protótipo LASSBio-651 cuja estrutura é composta por dois fragmentos privilegiados, o indol e a *N*-acilidrazona (NAH), passíveis de interagir com mais de um alvo atuante na gênese do processo inflamatório. A maioria dos compostos *N*-acilidrazônicos indólicos avaliados apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorção abdominal. Ademais, os compostos LASSBio-1245, LASSBio-1246, LASSBio-1248 e LASSBio-1249 tiveram efeito quase duas vezes superior que seus análogos de origem, sendo que estes dois últimos apresentaram DE<sub>50</sub> inferior a 10 µmol/kg logo, a *bis*-homologação otimizou o efeito antinociceptivo do protótipo do LASSBio-651. Além disto, o modelo de placa quente indica que o LASSBio-1248 não diminui a nocicepção em alvos localizados a nível central. Já o ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina mostrou que a maioria das substâncias testadas reduziram a formação da resposta edematogênica durante a segunda hora de avaliação. Dentre estes compostos, o LASSBio-1249 destacou-se com potência de aproximadamente 18 µmol/kg e efeito máximo de 51% de inibição comparado ao grupo-controle. Ademais, o ensaio de hipernocicepção térmica indica que o

substituinte 2-furila é um grupamento auxofórico importante para a atividade anti-hipernociceptiva, como o LASSBio-1248 cujo perfil não estatisticamente diferente do derivado LASSBio-651. Dentre outros fatores, os neutrófilos tem função importante na promoção da resposta hipernociceptiva, assim como o TNF- $\alpha$ . A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), mostrou que os derivados NAH indólicos anti-hipernociceptivos avaliados diminuíram a migração de neutrófilos para o tecido inflamado na mesma magnitude do fármaco de referência, a indometacina (Ca. de 50%). Os níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados com o intuito de verificar se os derivados anti-hipernociceptivos seriam capazes de reduzir a produção desta citocina. LASSBio-1248 e LASSBio-1247 diminuíram a produção de TNF- $\alpha$  em níveis 68% e 94% menores que o grupo-controle, respectivamente. Estes dois últimos experimentos permitem sugerir que alguns compostos NAH indólicos atenuam a hipernocicepção por reduzir a migração de neutrófilos e a produção de TNF- $\alpha$ . Ainda, os compostos NAH indólicos não provocam lesões ulcerativas gástricas. Sem mais, o estudo do perfil antinociceptivo e anti-inflamatório de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos homólogos do protótipo LASSBio-651 mostrou que a homologação foi uma estratégia adequada para a obtenção de protótipos de fármaco com melhor perfil antinociceptivo e anti-inflamatório que o protótipo LASSBio-651.

Palavras-chave: Inflamação. Derivados *N*-acilidrazônicos indólicos. Química Medicinal.

## ABSTRACT

dos Santos, Ewerton Alves Portela. Study of antinociceptive and anti-inflammatory profiles of *N*-acilhydrazone indolic compounds homologous from LASSBio-651.

Inflammation is a complex physiopatologic process involving intercellular interactions which trigger the release of several inflammatory mediators that in turn give rise to the initial cardinal sings. Aiming to reduce the impact of the inflammatory process the *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas* (LASSBio®) has used the homologation in order to optimize the antinociceptive and anti-inflammatory effects of lead-compound LASSBio-651. This compound has got two privileged structures the *N*-acilhydrazone (NAH) and indole scaffolds. They might provide useful ligands for diverse receptors, being able to interact to more than one target in the genesis of the inflammatory process. Most of the NAH indolic compounds have demonstrated antinociceptive effect in abdominal constrictions bioassay. In addition, LASSBio-1245, LASSBio-1246, LASSBio-1248 and LASSBio-1249 compounds have shown off almost twice more effective results than their analogues while these two last compounds have ED<sub>50</sub> lower than 10 µmol/kg so, homologation strategy was able to optimize the antinociceptive effect in comparison with LASSBio-651. Furthermore, the hot plate test points out the LASSBio-1248 being not able to reduce the nociceptive response linked with targets at CNS. The rat paw oedema assay evoked by carrageenan has shown us that the most of the compounds reduced the edematogenic process at the second hour of evaluation. Among these compounds, LASSBio-1249 has stood out because its ED<sub>50</sub> is nearly 18 µmol/kg and the maximum effect equivalent to 51% of inhibition comparing with vehicle-group. Besides, thermal hypernociception assay points to 2-furil being an

important auxophoric group for an anti-hypernociceptive activity as in LASSBio-1248 whose anti-hypernociceptive profile has been statistically different from LASSBio-651. Among others, neutrophils have got an important function in hypernociceptive response as well as TNF- $\alpha$  cytokine. The evaluation of MPO activity has shown that NAH indolic anti-hypernociceptive compounds were able to reduce the neutrophil migration in the inflamed paw in the same way that indomethacin, nearly 50%. The TNF- $\alpha$ 's levels were measured in order to check if the anti-hypernociceptive compounds were able to interfere with this cytokine production. So LASSBio-1248 and LASSBio-1247 reduce the production at levels of 68% and 94% lesser than control group, respectively. In addition, NAH indolic compounds do not induce ulcerative gastric injuries. In summary, the evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory profiles of NAH indolic compounds homologous of the lead LASSBio-651 has shown us that homologation was appropriate to gain new leads with better antinociceptive and anti-inflammatory profiles than LASSBio-651 prototype.

Keywords: Inflammation. *N*-acilidrazones indolic compounds. Medicinal chemistry.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	25
1.1.1 A formação do edema.....	26
1.1.2 O processo nociceptivo.....	29
1.1.3 Mediadores químicos inflamatórios .....	31
1.1.3.1 Histamina .....	31
1.1.3.2 5-Hidroxitriptamina (5-HT).....	33
1.1.3.3 Biossíntese de eicosanóides .....	35
1.1.3.3.1 Prostaglandinas.....	38
1.1.4 O evento celular na inflamação.....	39
1.1.4.1 O papel dos neutrófilos na inflamação.....	39
1.1.5 A farmacoterapia da dor e inflamação .....	41
1.1.5.1 Analgésicos opióides.....	41
1.1.5.2 Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs).....	42
1.1.5.3 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) .....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>45</b>
2.1 A QUÍMICA MEDICINAL .....	46
2.2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	47
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
4.1 MATERIAIS.....	54
4.1.1 Reagentes .....	54
4.1.2 Derivados <i>N</i> -acilidrazônicos indólicos.....	55
4.1.3 Soluções .....	55
4.1.3.1 Solução salina 0,9%.....	55

4.1.3.2 Solução goma arábica 5%.....	55
4.1.3.3 Solução de ácido acético 0,1N .....	54
4.1.3.4 Solução de carragenina 1% .....	55
4.1.3.5 Solução de HTAB 0,5%.....	55
4.1.3.6 Solução reveladora .....	56
4.1.3.7 Solução PBS .....	56
4.2 ANIMAIS .....	56
4.3 METODOLOGIAS .....	57
<b>4.3.1 Contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.2 Ensaio de placa quente .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.3 Edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3.4 Ensaio de hipernocicepção térmica (teste de placa quente modificado) .</b>	<b>59</b>
<b>4.3.5 Determinação das potências (DE<sub>50</sub>) antinociceptiva e antiedematogênica.</b>	<b>60</b>
.....	60
<b>4.3.6 Potencial ulcerogênico .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.7 Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.8 Dosagem de TNF-<math>\alpha</math> em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS.....</b>	<b>62</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS .....	64
<b>5.1.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N em camundongos. ....</b>	<b>64</b>
<b>5.1.2 Ensaio da placa quente em camundongos .....</b>	<b>71</b>
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS. ....	74
<b>5.2.1 Ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....</b>	<b>74</b>
5.3 ATIVIDADE ANTI-HIPERNOCICEPTIVA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS	78
<b>5.3.1 Ensaio de hipernocicepção térmica (teste de placa quente modificado) .</b>	<b>79</b>
5.4 POTENCIAL ULCEROGÊNICO .....	83
5.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	83
5.6 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS COM LPS. ....	84



<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do rearranjo do citoesqueleto celular, ocasionando o aumento da permeabilidade vascular (JE: junção estreita; JA: junção aderente; AF: adesão focal). .....	28
<b>Figura 2:</b> Sensibilização de nociceptores periféricos a partir de mediadores químicos liberados em virtude de uma lesão tecidual. ....	29
<b>Figura 3:</b> Ativação de nociceptores periféricos e transmissão do impulso nervoso a partir de uma injúria tecidual. ....	30
<b>Figura 4:</b> Estrutura química da $\beta$ -aminoetilimidazol (histamina). ....	32
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da 5-Hidroxitriptamina elucidada por Rapport e colaboradores em 1948 .....	33
<b>Figura 6:</b> Formação dos prostanóides a partir do ácido araquidônico .....	38
<b>Figura 7:</b> Fármacos AINEs inibidores da enzima COX.....	44
<b>Figura 8:</b> Estrutura do protótipo LASSBio-651 .....	49
<b>Figura 9:</b> Efeito antiedematogênico temporal dos derivados NAH indólicos - Série C2 no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%. ....	75
<b>Figura 10:</b> Efeito antiedematogênico temporal dos derivados NAH indólicos - Série C3 no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%. ....	76
<b>Figura 11:</b> Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos compostos LASSBio-651 e LASSBio-1290 no ensaio de hipernocicepção térmica. ....	79
<b>Figura 12:</b> Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos derivados NAH indólicos da Série C2 no ensaio de hipernocicepção térmica. ....	81
<b>Figura 13:</b> Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos derivados NAH indólicos da Série C3 no ensaio de hipernocicepção térmica. ....	82

## LISTA DE GRÁFICOS

Página

<b>Gráfico 1:</b> Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C1 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	50
<b>Gráfico 2:</b> Atividade antiedematogênica de 3ª hora dos derivados NAH indólicos - Série C1 e da indometacina no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%. ....	50
<b>Gráfico 3:</b> Atividade de MPO na pata de rato induzida pela administração de salina e de carragenina. ....	61
<b>Gráfico 4:</b> Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C2 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	65
<b>Gráfico 5:</b> Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C3 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	65
<b>Gráfico 6:</b> Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1248 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	67
<b>Gráfico 7:</b> Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1249 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	68
<b>Gráfico 8:</b> Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1246 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	69
<b>Gráfico 9:</b> Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1245 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. ....	70
<b>Gráfico 10:</b> Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1245 (100 µmol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos. ....	71
<b>Gráfico 11:</b> Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1246 (100 µmol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos. ....	72
<b>Gráfico 12:</b> Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1248 (100 µmol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos. ....	72

<b>Gráfico 13:</b> Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1249 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de placa quente em camundongos.....	73
<b>Gráfico 14:</b> Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1249 durante a segunda hora no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....	78
<b>Gráfico 15:</b> Efeito sobre a atividade da MPO provocada pela indometacina e pelos derivados NAH indólicos anti-hipernociceptivos. ....	84
<b>Gráfico 16:</b> Efeito da talidomida e dos derivados NAH indólicos anti-hipernociceptivos na produção de TNF- $\alpha$ em macrófagos peritoneais de camundongos suíços estimulados por LPS.....	85

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1:</b> Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1248 (0,3- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	67
<b>Tabela 2:</b> Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1249 (0,3- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	68
<b>Tabela 3:</b> Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1246 (1- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	69
<b>Tabela 4:</b> Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1245 (1- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	70
<b>Tabela 5:</b> Efeito antiedematogênico do derivado LASSBio-1248 (10- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) durante a segunda hora do modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....	78
<b>Tabela 6:</b> Efeito antiedematogênico do derivado LASSBio-1249 (10- 300 $\mu\text{mol/kg}$ ) durante a segunda hora do modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....	78
<b>Tabela 7:</b> Potência da indometacina dos compostos NAH indólicos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N.....	90

## LISTA DE ESQUEMA

Página

<b>Esquema 1:</b> Planejamento estrutural e identificação dos fragmentos privilegiados .....	48
<b>Esquema 2:</b> Cronologia do experimento de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1N.....	57
<b>Esquema 3:</b> Cronograma de avaliação do ensaio de placa quente.....	58
<b>Esquema 4:</b> Cronograma do experimento de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.....	59
<b>Esquema 5:</b> Cronograma do experimento de hipernocicepção térmica induzido por carragenina 1%.....	60

## LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1:</b> Atividade antinociceptiva dos análogos NAH indólicos no modelo de contorção abdominal induzidas por ácido acético 0,1N.....	89
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ -m-5-HT=  $\alpha$ -metil-5-Hidroxitriptamina;
- 5-HT= 5-Hidroxitriptamina;
- AA= ácido araquidônico;
- AINEs= anti-inflamatórios não-esteroidais;
- ASC= área sob a curva
- $[Ca^{+2}]_i$ = concentração intracelular de cálcio;
- COX= cicloxigenase;
- DE<sub>50</sub>= dose eficaz para cinquenta por cento do efeito máximo;
- DMSO= dimetilsulfóxido;
- EPM= erro padrão da média;
- HTAB= Hexadeciltrimetil amônio;
- I.P.= intraperitoneal;
- I.PI.= intraplantar;
- IP3= 1,4,5-Trifosfato inositol;
- LASSBio<sup>®</sup>= Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas;
- LPS= lipopolissacarídeo;
- MLC= cadeia leve de miosina;
- MLCK= quinase da cadeia leve de miosina;
- MPO= mieloperoxidase;
- NAH= *N*-acilidrazona;
- OPD= ortofenilenodiamina;
- PAF= fator de ativação plaquetária;
- PGE<sub>2</sub>= prostaglandina E<sub>2</sub>;
- PGG<sub>2</sub> = prostaglandina G<sub>2</sub>;
- PGH<sub>2</sub>= prostaglandina H<sub>2</sub>;
- PGHS= prostaglandina H sintase;
- PGI<sub>2</sub>= prostaciclina;
- PGs= prostaglandinas;
- PLA<sub>2</sub>= fosfolipase A<sub>2</sub>;
- RNA= ácido ribonucléico;
- RNA-m= ácido ribonucléico-mensageiro;

SNC= sistema nervoso central;

TNF- $\alpha$ = fator de necrose tumoral- $\alpha$ ;

TpH= triptofano hidrolase;

TX= tromboxana;

UMPO= unidade de mieloperoxidase;

V.o.= via oral.



## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é uma reação complexa que acontece em humanos e em outros vertebrados, induzido por agentes nocivos de origem endógena, como fratura ou tecidos em necrose; ou exógena como infecções (bacterianas, virais ou parasitárias), trauma (contuso ou penetrante), agentes físicos (queimaduras ou congelamento) e químicos (radiação e algumas substâncias químicas ambientais) (RAJAKARIAR *et al.*, 2006; ROBBINS & COTRAN, 2004).

Fisiologicamente, estas reações são caracterizadas pela migração das proteínas séricas e leucócitos presentes no sangue para o tecido extravascular. Este movimento é coordenado por diversos mediadores químicos como aminas vasoativas, eicosanóides e citocinas que contribuirão para o surgimento dos sinais cardinais da inflamação. Estes sinais foram descritos primeiramente por Celsus no século I depois de Cristo e são tipicamente mais proeminentes no processo inflamatório agudo que no crônico e representam o (a): rubor, calor, edema, dor e perda da função. O surgimento destes sinais é ocasionado pela vasodilatação local que aumenta o fluxo sanguíneo na área inflamada (rubor e calor) e, concomitantemente, aumenta a permeabilidade vascular (edema). A inflamação aguda tem início rapidamente após o estímulo nocivo e pode ter duração de minutos a alguns dias, que além dos fatos mencionados, envolve o recrutamento celular, principalmente, de neutrófilos (LAWRENCE *et al.*, 2002; SERHAN *et al.*, 2008).

Este conjunto de alterações fisiológicas que caracteriza a inflamação é um sistema de reparo cujo objetivo consiste em isolar e remover o agente causador do desequilíbrio local e restaurar a função do tecido afetado durante a fase de reparação (CLAUDINO *et al.*, 2006).

A tentativa de curar e reparar o local danificado começa nas fases iniciais da inflamação que é caracterizada pela substituição do tecido afetado por células parenquimatosas nativas regeneradas, pelo preenchimento com tecido fibroso (cicatrização) ou pela combinação destes dois processos, que geralmente é finalizado depois da neutralização da influência nociva (ROBBINS & COTRAN, 2004).

### 1.1.1 A formação do edema

O endotélio vascular tem um papel importante na manutenção da função normal vascular secretando fatores anticoagulantes, respondendo e participando do processo inflamatório, prevenindo a perda de volume do sangue e seus constituintes e regulando o tônus vascular. Além do mais, forma a interface entre o sangue e os tecidos subjacentes, controlando o extravasamento de solutos, macromoléculas e células brancas do plasma entre os dois ambientes (SURAPISITCHAT *et al.*, 2007; van HINSBERGH & AMERONGEN, 2002). Esta barreira é dinâmica e altamente suscetível a diversos estímulos fisiopatológicos.

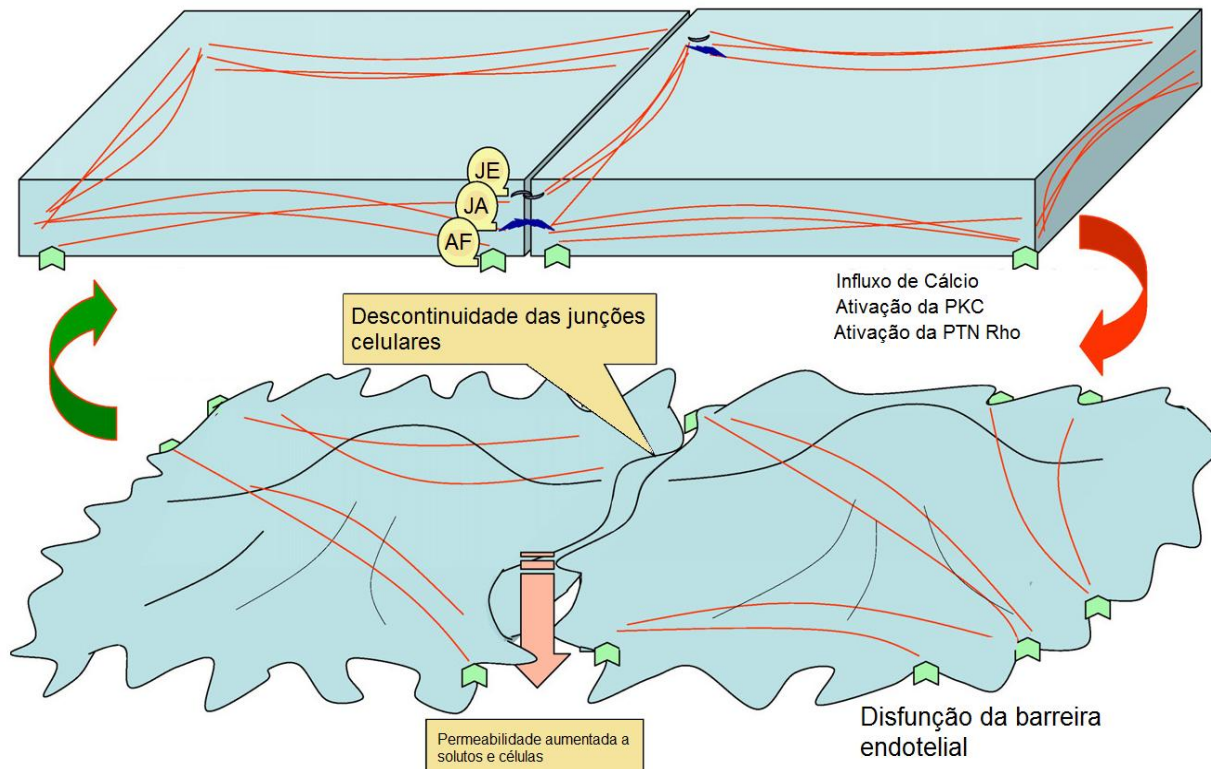
Contudo, em condições patológicas associadas à inflamação, o endotélio torna-se mais permeável a macromoléculas graças à formação de pequenos espaços entre ou através das células no local da injúria (van HINSBERGH & AMERONGEN, 2002).

A princípio, existe um tênue equilíbrio entre forças centrípetas, forças que garantem o espalhamento das células e aquelas opostas ao colapso celular. O primeiro evento culmina na contração da actina e miosina e resultará na tensão das fibras. Ainda, muitos fatores desencadeiam a reorganização do fenótipo celular e são considerados característicos para o estado de contratilidade ativado. Um destes fatores, a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), depende da ativação da MLC quinase (MLCK) a qual é regulada pela cálcio-calmodulina. (BOGATCHEVA & VERIN, 2009). A elevação da concentração do  $\text{Ca}^{+2}$  no citossol contribui para a reorganização do citoesqueleto celular através da contração dependente de MLC (TIRUPPATHI, *et al.*, 2003).

O  $\text{Ca}^{+2}$  é um segundo mensageiro essencial nas células dos mamíferos. Alguns mediadores inflamatórios ao interagir com seus receptores acoplados a proteína G promovem aumento da permeabilidade vascular por elevar a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ), através de uma variedade de eventos bioquímicos. A indução do aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  pode ocorrer de duas maneiras: pela liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular armazenado e a outra pela entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  na célula do meio extracelular através de canais de  $\text{Ca}^{+2}$  existente nas membranas (TIRUPPATHI, *et al.*, 2003).

O 1,4,5-trifosfato inositol (IP3) é o produto da reação de hidrólise do fosfatidil inositol 4,5-bifosfato de membrana que interage com receptores específicos localizados na membrana do retículo endoplasmático. A ativação destes é dependente do IP3 e do  $\text{Ca}^{+2}$  e resulta na liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  para o citoplasma intermediado por um processo passivo. Além disto, existe a possibilidade dos receptores de IP3 acoplarem-se a canais de  $\text{Ca}^{+2}$  da membrana que podem ser abertos gradualmente por um processo chamado de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  induzida por  $\text{Ca}^{+2}$ . Ainda, há uma terceira possibilidade de liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  contido no retículo endoplasmático que ocorre através da ação do próprio cátion sobre os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  (FOSKETT *et al.*, 2007).

Estudos mostram que a descontinuidade da integridade da camada simplificada das células endoteliais ocorre em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios e produtos de neutrófilos ativados, resultando na formação de pequenas aberturas (BOUEIZ & HASSOUN, 2009). Logo, o extravasamento em vasos sanguíneos de pequeno calibre pode variar de acordo com a abertura local transiente das junções endoteliais, permitindo a saída de leucócitos que constituem um importante instrumento para a formação do edema (Figura 1) (GARCIA, 2009). A integridade das junções das células forma a principal barreira para o extravasamento de fluidos e proteínas plasmáticas que ocorre de forma aguda e crônica em tecidos inflamados (MICHEL & CURRY, 1999). Este mecanismo é completamente reversível e pode restaurar ou aumentar a organização das junções e alterar a propriedade da permeabilidade de solutos (ALEXANDER & ELROD, 2002).



**Figura 1:** Representação esquemática do rearranjo do citoesqueleto celular, ocasionando o aumento da permeabilidade vascular (JE: junção estreita; JA: junção aderente; AF: adesão focal) (Adaptado de: BOGATCHEVA & VERIN, 2009).

A permeabilidade do tecido alterada pode ser provocada por mediadores presentes no local da injúria, tais como a (s): bradicinina, histamina, serotonina e citocinas (MICHEL & CURRY, 1999).

Entretanto, o aumento da permeabilidade vascular não é o único fator que favorece a instauração do processo edematogênico. Estudos mostram que pressão hidrostática aumentada nos capilares também contribui para a formação do edema (GUYTON & HALL, 2002).

Dentre outros fatores, estas duas alterações vasculares constituem a base para a formação do edema em fases aguda e crônica de diversas doenças, como por exemplo: diabetes, hipertensão, artrite reumatóide, isquemia, sepse e doenças respiratórias agudas (MICHEL & CURRY, 1999; ALEXANDER & ELROD, 2002).

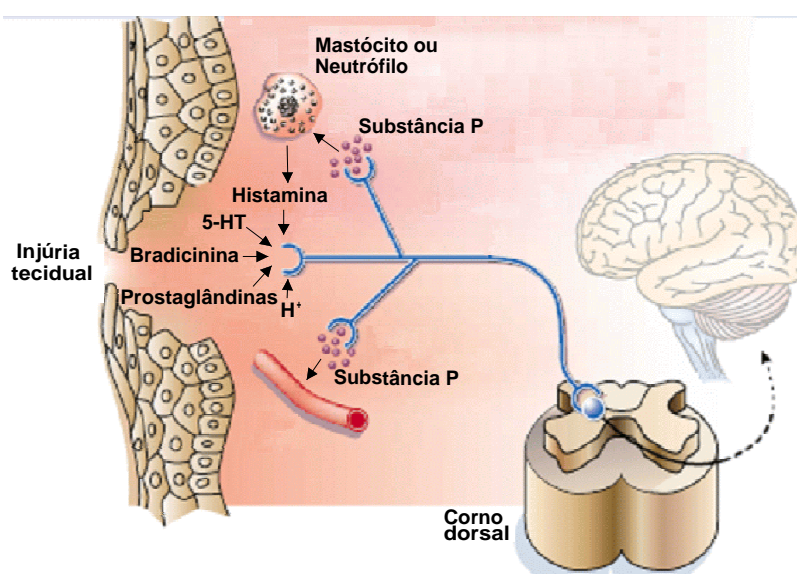
### 1.1.2 O processo nociceptivo

A dor é uma experiência complexa que envolve não só a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também processos cognitivos e emocionais (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Segundo Le Bars e colaboradores (2001), uma das funções da dor/nocicepção consiste em alertar o indivíduo da eminência ou existência de uma lesão tecidual.

Há aproximadamente um século, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário sensibilizado por fatores mecânicos, químicos e pela temperatura. Estes estímulos são capazes de causar injúria tecidual e, conseqüentemente, liberar mediadores inflamatórios provenientes de células não-neuronais, como neutrófilos, mastócitos e plaquetas (Figura 2) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

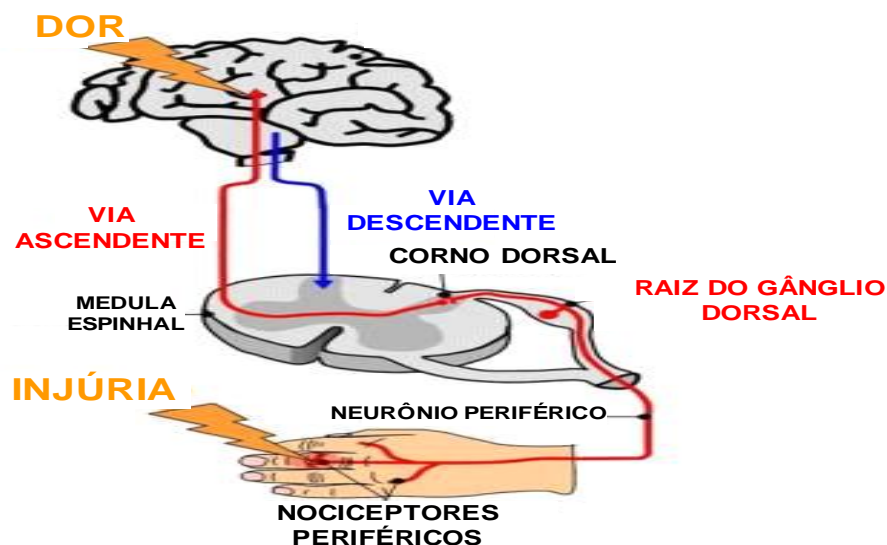
Os neurônios aferentes primários que enervam os tecidos possuem funções como: detectar um estímulo nocivo e transformá-lo em potencial de membrana (transdução do sinal); promover a passagem do impulso proveniente das terminações periféricas para a medula espinhal (condução) e; realizar a sinapse do impulso nervoso com neurônios dentro de lâminas específicas no corno dorsal (KIDD & URBAN, 2001; GOLD & FLAKE, 2005).



**Figura 2:** Sensibilização de nociceptores periféricos a partir de mediadores químicos liberados em virtude de uma lesão tecidual (adaptado de: JULIUS & BASBAUM, 2001).

Os neurônios primários aferentes são as vias de entrada de informações obtidas de tecidos periféricos para a transmissão à medula espinhal e ao cérebro. Ainda, os corpos celulares das fibras sensoriais que enervam a cabeça e o corpo estão localizados no ganglio trigêmeino e na raiz do corno dorsal, respectivamente (MANTYH *et al.*, 2002).

Atualmente, três tipos de fibras são descritas, sendo duas delas responsáveis pela condução do estímulo doloroso (A $\delta$  e polimodal C). Outrossim, as fibras responsáveis pela condução dos potenciais de ação formados pela ativação dos nociceptores possuem características peculiares. As fibras A $\delta$ , por exemplo, são neurônios de calibre mediano, levemente mielinizada e respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos. A estimulação deste tipo de neurônio confere uma sensação pontual e bem localizada, constituindo uma característica importante porque permite a retirada rápida e precisa em decorrência da exposição localizada ao estímulo nocivo. Em comparação, as fibras polimodais C possuem menor calibre, são amielínicas e por isso conduzem o impulso nervoso mais lentamente que as fibras A $\delta$ . O terceiro tipo de fibra, fibras A $\beta$ , são responsáveis pelas transmissões de informações táteis não-dolorosas e sensoriais e caracterizadas por ter grande calibre e ser altamente mielinizada, favorecendo a condução rápida do potencial de ação das terminações periféricas ao sistema nervoso central (SNC) (Figura 3) (LAWSON, 2002; D'MELLO & DICKENSON, 2008).



**Figura 3:** Ativação de nociceptores periféricos e transmissão do impulso nervoso a partir de uma injúria tecidual.

Seguido a lesão tecidual e o surgimento da inflamação, há a sensibilização dos nociceptores e, estímulos suaves quando os nociceptores encontravam-se inativos, tornam-se dolorosos. Esta primeira sensibilização em humanos é denominada hiperalgesia, ou seja, o indivíduo apresenta uma resposta aumentada frente a estímulos dolorosos e a alodínia, termo que refere-se à dor provocada por estímulos normalmente inócuos. Contudo, na observação das respostas obtidas a partir da sensibilização dos nociceptores em modelos experimentais com animais é indicado o emprego do termo hipernocicepção, já que os componentes emocionais da resposta dolorosa não podem ser quantificados (VERRI *et al.*, 2006).

A dor neuropática foi definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor; do inglês International Association for the Study of Pain) como uma dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso que, dependendo da origem, pode ser considerada periférica ou central. Além disto, a injúria no neurônio pode ter diversas etiologias, das quais se inclui: infecção, trauma, anormalidades metabólicas, quimioterapia, cirurgia, neurotoxinas, compressão dos neurônios, infiltração tumoral e inflamação (DWORKIN, 2002).

Frequentemente, a dor neuropática é caracterizada pela percepção anormal ou persistência da dor, como alodínia e a hiperalgesia.

Diante do exposto, percebe-se que a noção existente de uma classe de fármacos que pode reduzir intrinsecamente toda a dor é obsoleta já que esta é heterogênea com relação aos fatores etiológicos, às características temporais e aos mecanismos envolvidos na transdução, condução e interpretação dos sinais (SCHOLZ & WOOLF, 2002).

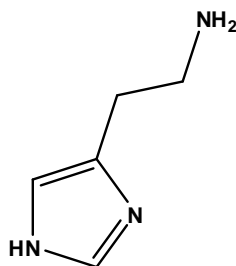
### **1.1.3 Mediadores químicos inflamatórios**

#### **1.1.3.1 Histamina**

O  $\beta$ -aminoetilimidazol é uma amina primária hidrossolúvel cuja estrutura química consiste em um grupamento amina e um imidazol que são separados por dois grupamentos metileno (Figura 4). Em virtude de experimentos realizados durante 1972, Best e colaboradores isolaram a referida substância do fígado e pulmão humano e sugeriram ser uma amina originada de tecidos. Por esta razão,



utilizaram o prefixo grego *histos* (tecidos) e denominaram-na como histamina (SKIDGEL & ERDÖS, 2006).



**Figura 4:** Estrutura química do  $\beta$ -aminoetilimidazol (histamina).

A histamina é sintetizada a partir do aminoácido L-histidina que é catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase e é produzida por diversas células, incluindo neurônios do sistema nervoso central e células da parede gástrica, além de linfócitos, mastócitos e basófilos, sendo estas últimas com importância reconhecida como a principal fonte de histamina em reações alérgicas (YATSUNAMILG, *et al.* 1994; OHTSU, 2008).

Ainda, há relatos indicando que esta amina atue como um agente importante no controle da atenção, da cognição, do ciclo do sono, apetite e ganho de peso corpóreo, além de estimular a secreção de ácido gástrico, aumentar a produção de citocinas inflamatórias em células T e inibir a produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos (SANDER, *et al.* 2008; ESBENSHADE, *et al.* 2006; KROUWELS *et al.*, 1998; VANNIER, *et al.* 1991; apud GUTZMER *et al.*, 2002).

Estudos prévios permitiram a elucidação das atividades fisiopatológicas da histamina. Seus efeitos são em decorrência da interação com receptores acoplados à proteína G expressos na superfície celular, que são classificados em quatro subclasses: de receptores H<sub>1</sub> a H<sub>4</sub>. Os receptores H<sub>1</sub> são acoplados à proteína G<sub>q</sub> pela via de hidrolase do fosfoinositol, enquanto os receptores H<sub>2</sub> estão acoplados a proteína G<sub>s</sub> e associado à ativação da adenilato ciclase. Já os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> são acoplados à proteína G<sub>i</sub> e inibe a via de sinalização da adenilato ciclase (OHTSU, 2008).

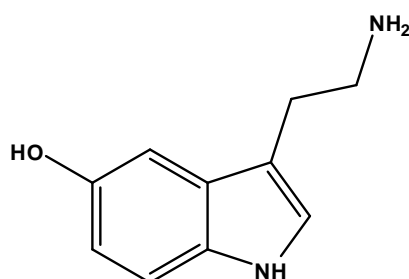
Segundo relatos, a histamina pode provocar contração do músculo liso, vasodilatação e, conseqüentemente, o aumento na permeabilidade das vênulas pós-capilares por menos de vinte segundos ou um efeito transiente que perdure entre cinco a dez minutos (van HINSBERGH & AMERONGEN, 2002).

Através do modelo de formalina, Cannon e colaboradores mostraram que o agonismo no tipo 3 de receptor histaminérgico atenua a resposta nociceptiva a nível supraespinhal e a formação edematogênica em tecidos periféricos, ambos associados à dor inflamatória. Ademais, existem trabalhos que implicam a participação dos receptores H<sub>1</sub> como promotores do aumento da permeabilidade endotelial, além de intermediar a nocicepção (CANNON *et al.*, 2007).

### 1.1.3.2 5-Hidroxitriptamina (5-HT)

A 5-HT (serotonina) foi descrita pela primeira vez no século passado, na década de trinta, por Erspamer e Vialli que descobriram que células enterocromafins presentes na mucosa gastrointestinal continham uma substância que causava contração do músculo liso de útero de ratos (apud NICHOLS & NICHOLS, 2008; LINDER, 2007).

No fim da década seguinte, a sua estrutura foi elucidada e estabelecida por Rapport *et al.* e denominada 5-Hidroxitriptamina. A partir de então, sabe-se que sua estrutura é composta por um núcleo indólico hidroxilado na posição cinco e um grupamento amino de caráter básico separados por dois grupos metílenos (Figura 5) (NICHOLS, 2008).



**Figura 5:** Estrutura da 5-Hidroxitriptamina elucidada por Rapport e colaboradores em 1948.

A 5-HT é sintetizada, predominantemente, nas células enterocromafins situadas na mucosa intestinal e armazenada no mesmo tipo celular além de plaquetas e, nos casos de roedores, em mastócitos também (GERSHON, 2007). Uma menor taxa de serotonina é sintetizada nas células neuro-endoteliais do pulmão e no núcleo da Rafe, no cérebro (LINDER *et al.*, 2007).

Atualmente, sabe-se que a serotonina é um autacóide de ação periférica e central, cujas atividades contribuem com a regulação do tônus vascular, a nocicepção e a inflamação, entre outras importantes funções fisiológicas. Suas ações são atribuídas à interação a receptores acoplados a proteína G e ao receptor de canal iônico que são classificados em sete famílias e divididos subtipos estruturalmente distintos, conhecidos até o momento (FINK & GÖTHERT, 2007).

Em tecidos inflamados, substâncias como imunoglobulina E e fator de ativação plaquetária (PAF) induzem a ativação das plaquetas circulantes no sangue, provocando a agregação plaquetária e a rápida liberação de serotonina em concentração micromolar (CLOËZ-TAYARANI & CHANGEUX, 2007).

A contribuição da serotonina no início do processo inflamatório é com relação a sua ação direta nas células endoteliais de capilares vasculares, acarretando no aumento da permeabilidade vascular (SOGA *et al.*, 2006).

Cole e colaboradores (1995) demonstraram que a 5-HT foi capaz de induzir a formação do edema proporcionalmente à sua concentração, uma hora após a sua administração na pata traseira do rato, com moderada infiltração de neutrófilos. Antagonistas serotoninérgicos foram mais efetivos na redução do edema, enquanto anti-inflamatórios clássicos foram pouco ativos, como o piroxicam, ou inativos, assim como o ácido acetil salicílico e a indometacina. O edema induzido por esta amina parece ser mediado por uma via  $Ca^{+2}$ -dependente no músculo liso (COLE *et al.*, 1995).

O papel dos receptores serotoninérgicos na nocicepção foi demonstrado em estudos com roedores mutantes que não expressavam receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> ou 5-HT<sub>3</sub>. Animais deficientes em receptores do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub> foram 25-35% mais sensíveis que o grupo de animais selvagens no ensaio da placa quente. Eles também apresentaram nocicepção alterada tanto na fase da dor neurogênica quanto na dor inflamatória no teste de formalina. Em animais 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> ou 5-HT<sub>3</sub><sup>-/-</sup>, a resposta nociceptiva foi reduzida durante a segunda fase, indicando a participação destes receptores na dor inflamatória periférica (KAYSER *et al.*, 2007). Por outro lado, ao nível central, o agonismo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> estaria envolvido com um efeito antinociceptivo (SASAKI *et al.*, 2003).

Apesar de estudada intensamente, a função fisiológica da serotonina ainda não fora elucidada completamente (GERSHON & TACK, 2007).

### 1.1.3.3 Biossíntese de eicosanóides

Os eicosanóides são mediadores lipídicos derivado de ácidos graxos. Sua nomenclatura é proveniente do grego *eicosi* (vinte) em decorrência dos vinte átomos de carbono presente nas estruturas de suas moléculas (HUANG & PETERS-GOLDEN, 2008).

Os eicosanóides são potentes agentes biologicamente ativos tanto em condições fisiológicas quanto fisiopatológicas devido a interações com receptores específicos que iniciam o evento de transdução dos sinais que conduzem a respostas celulares coordenadas a um estímulo específico (FOLCO & MURPHY, 2006; MILLER, 2006).

Os eicosanóides medeiam respostas do processo inflamatório como febre, dor, permeabilidade vascular, além da quimiotaxia de neutrófilos.

As fosfolipases formam um grupo de enzimas que possuem a propriedade de hidrolizar um substrato comum, os fosfolipídios (WILTON, 2008). A degradação dos fosfolipídios pela fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) resulta na hidrólise de compostos da membrana, como ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico (AA), que podem ser metabolizados em PAF e eicosanóides, os quais são potentes mediadores da inflamação, de processos alérgicos e do câncer (ADIBHATLA & HATCHER, 2008).

Atualmente, vinte e duas isoformas da  $PLA_2$  foram identificadas em uma variedade de tecidos de mamíferos e são classificadas em três famílias com base no requerimento de cálcio para a realização de sua atividade catalítica: os tipos citossólica e secretória-dependentes de cálcio e as formas cálcio-independente (ADIBHATLA & HATCHER, 2008). Diversos estudos mostram que a  $PLA_2$  pode ser ativada por um amplo espectro de estímulos extracelulares, tais como fatores de crescimento, mitógenos e citocinas. (KRAMER & SHARP, 1997).

Sob condições normais, uma fração do AA liberado das membranas plasmáticas através da atividade da  $PLA_2$  citossólica é subsequentemente metabolizado pelas enzimas lipoxigenase e cicloxigenase que geram uma variedade de eicosanóides, incluindo os leucotrienos, as prostaglandinas e a tromboxana, enquanto uma parte maior do AA é reincorporada nos fosfolipídeos de membrana (KIM *et al.*, 2008; FAROOQUI *et al.*, 2006).

As Cicloxigenases (COX), também conhecidas como prostaglandina H Sintase (PGHS) ou prostaglandina Endoperóxido Sintase, são enzimas pertencentes à família das mieloperoxidases que oxigenam os ácidos graxos e, por isso, constituem uma etapa limitante na produção de prostaglandinas (PGs) (CHANDRASEKHARAN & SIMMONS, 2004).

A COX através de suas funções catalíticas de cicloxigenase e peroxidase transforma o AA nos endoperóxidos cíclicos, a PGG<sub>2</sub> e a PGH<sub>2</sub>, respectivamente. Este intermediário é essencial para a ação das prostaglandinas isomerases, a tromboxana e a prostaciclina sintases, e resulta na formação das PGs e tromboxana através da isomerização e das reações de oxidação e redução. As isoformas da COX tem curto tempo de atividade catalítica e frequentemente apresentam velocidade máxima de um a dois minutos em testes *in vitro*, devido a autoinativação através de mecanismos ainda desconhecidos (CHANDRASEKHARAN & SIMMONS, 2004).

Dentre as isoformas cientificamente relatadas, a COX-1 é constituída de 576 aminoácidos e expressa em altos níveis em determinadas células, como monócitos e plaquetas e alguns tecidos como mucosa gástrica, túbulos coletores renais e nas vesículas seminais. Contudo, apesar de existentes, os estudos de regulação da transcrição genética da PGHs-1 são difíceis porque esta enzima é expressa constitutivamente em níveis semelhantes na maioria dos tecidos de animais adultos (SMITH *et al.*, 2000).

Em estudos pioneiros realizados em 1991, Xie *et al.* codificou o RNA-m de uma proteína e, comparando-os com resultados existentes na literatura, sugeriu a existência de uma segunda isoforma da COX.

Atualmente, sabe-se que a homologia existente entre os aminoácidos das isoformas 1 e 2 é de 61% (KOSAKA *et al.*, 1994). Pequenas diferenças nas estruturas de COX-1 e COX-2 conferem importantes particularidades tanto biológicas quanto farmacológicas. Uma destas alterações pode ser exemplificada pela substituição do aminoácido isoleucina pela valina na posição 434, o que favorece a um aumento relativo do volume do sítio ativo para a COX-2 em quase 20%. O conhecimento da diferença entre o tamanho dos sítios ativos das duas isoformas foi um dos fatores que impulsionou o desenvolvimento de inibidores seletivos para a COX-2 (MORITA, 2002; RAO & KNAUS, 2008).

A COX-2 é altamente induzida em resposta a estímulos proinflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e mitógenos, em uma ampla variedade de células e tecidos, tais como as células endoteliais, monócitos e macrófagos. Entretanto esta isoforma também pode ser expressa constitutivamente em alguns neurônios do prosencéfalo, assim como no córtex e no hipocampo. Sua expressão é igualmente constitutiva na mácula densa do sistema justa-glomerular e na vasculatura renal (RAJAKARIAR *et al.*, 2006; RAO & KNAUS, 2008).

A participação da isoforma 1 no processo inflamatório agudo é importante. Através do modelo experimental de inflamação cutânea em resposta ao AA (edema de orelha) em animais deficientes de COX, Goulet e colaboradores mostraram que a resposta inflamatória apresentada por camundongos deficientes na expressão de COX-1 foi pequena, enquanto que não houve redução do peso da orelha em animais COX-2-deficientes estimulada pelo mesmo agente inflamatório em comparação ao grupo controle de animais selvagens (GOULET *et al.*, 2004).

Outrossim, há tempos suspeitava-se de uma terceira isoforma da família da COX (SCHWAB *et al.*, 2003).

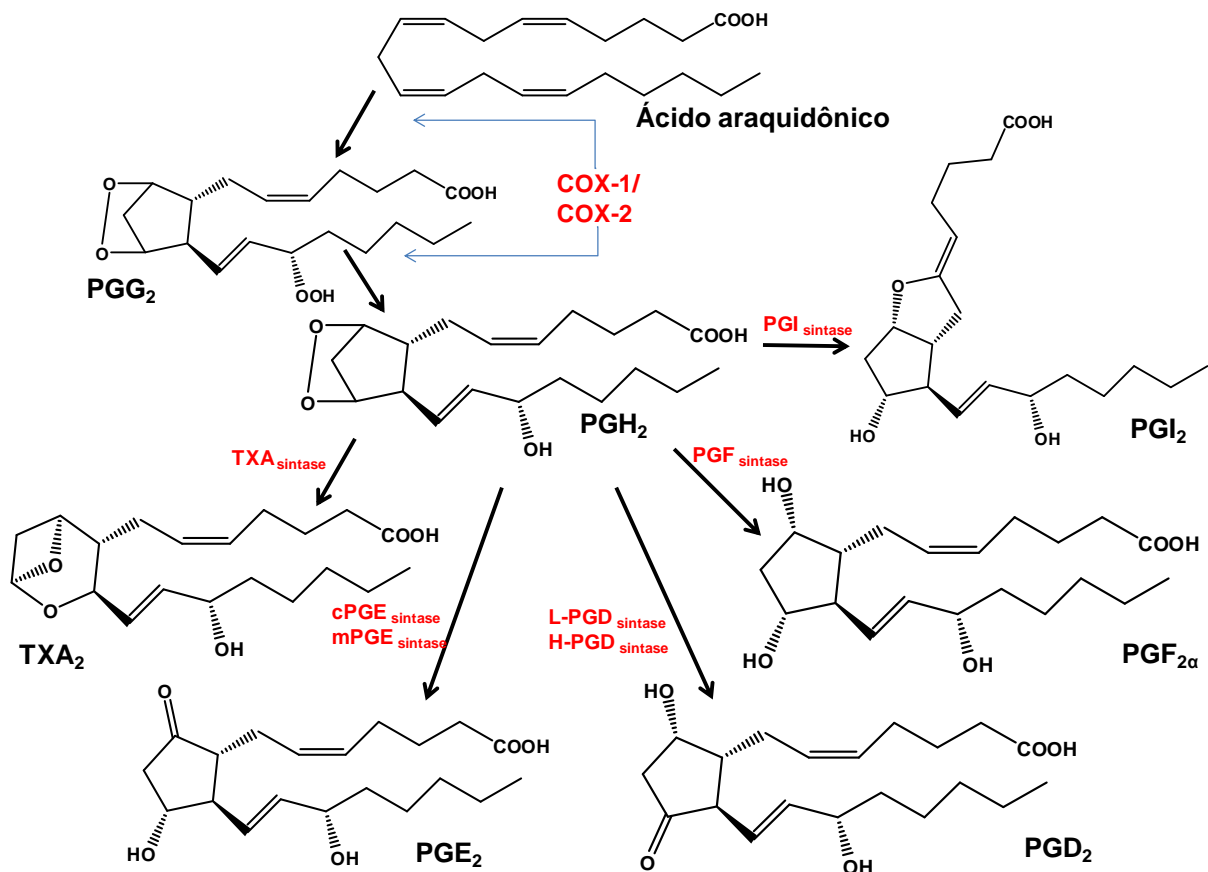
A COX-3 é produzida a partir do gene da COX-1 e contém toda a sua sequência de aminoácidos, porém retém o íntron 1 no seu RNA-m. Esta diferença poderia alterar a conformação e afetar o sítio ativo da enzima. A avaliação dos níveis de RNA mensageiro em tecidos humanos indicam altos níveis de COX-3 no cérebro e coração (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Apesar de Chandrasekharan e colaboradores mostrarem que em altas concentrações de AA a COX-3 fora inibida pelo acetaminofeno, além de ter sido a isoforma mais sensível a este fármaco, estudos recentes realizados em camundongos selvagens e deficientes do gene da PGHS-1 (-/-) indicam que a COX-3 não está envolvida na hipotermia provocada pelo acetaminofeno e que os níveis de PGE<sub>2</sub>, mediador cuja participação na febre é relevante, tem o mesmo perfil nos dois tipos de animais (LI *et al.*, 2008).

Entender a estrutura e as funções das isoformas da COX tem sido foco de diversos estudos porque, principalmente as duas primeiras isoformas constituem alvos dos fármacos anti-inflamatório não-esteroidais (GARAVITO *et al.*, 2002).

### 1.1.3.3.1 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) são autacóides que contêm um anel ciclopentano em suas estruturas, uma dupla ligação *trans* entre os carbonos treze e quatorze, além da presença de uma hidroxila na posição quinze. As letras seguintes a sigla PG indicam a natureza e a localização dos substituintes que contêm oxigênio no referido anel. O mesmo sistema de letras também é utilizado para determinar as tromboxanas (TX). Já os números subscritos indicam a quantidade de ligações duplas entre carbonos na cadeia lateral (Figura 6) (SMITH & MURPHY, 2008).



**Figura 6:** Formação dos prostanoídeos a partir do ácido araquidônico (Adaptado de: SMYTH *et al.*, 2006).

A biossíntese de PGs ocorre frente a uma ampla variedade de estímulos e é aumentada significativamente em tecidos inflamados. Desta forma, estes mediadores químicos lipídicos contribuem para a sinalização e a progressão do processo inflamatório agudo e de diversas doenças como o câncer e a asma

(WYMAN & SCHENEIDER, 2008; ROLIN *et al.*, 2006). Além do mais, há relatos que tanto a PGE<sub>2</sub> quanto a PGI<sub>2</sub> intensificam de modo notável a formação do edema e a infiltração de leucócitos devido à exacerbação do fluxo sanguíneo na região inflamada. Vale ressaltar que ambas foram relacionadas com a diminuição do limiar de ativação dos nociceptores, induzindo um comportamento de hipersensibilidade a estímulos que normalmente não são dolorosos (SMYTH *et al.*, 2006; MEVES, 2006).

Para verificar qual dos receptores de PGE<sub>2</sub> participa do processo inflamatório agudo, foi realizado um experimento em animais deficientes de cada um dos quatro subtipos de receptores deste prostanóide e a redução do edema de orelha foi significativamente reduzida somente nos animais que não expressavam os receptores EP<sub>3</sub> (GOULET *et al.*, 2004).

A administração de L826266, um antagonista seletivo de receptores EP<sub>3</sub>, corrobora com Goulet e colaboradores. Em experimento realizado com injeção de PGE<sub>2</sub> cuja formação do edema é dose e tempo-dependente, a co-administração do antagonista de receptor EP<sub>3</sub> a 10 nmol/pata inibiu a formação do edema de pata e a administração de antagonistas de receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> não alterou a resposta inflamatória significativamente. Apesar de não apresentado, os autores afirmam que o antagonista seletivo de EP<sub>3</sub> também inibe o edema induzido por carragenina (CLAUDINO *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 O evento celular na inflamação**

##### **1.1.4.1 O papel dos neutrófilos na inflamação**

O processo inflamatório é caracterizado pelo recrutamento de leucócitos circulantes no sangue para o local da injúria, sendo que os neutrófilos polimorfonucleares são o tipo de leucócito mais comum nos vasos sanguíneos. A migração de neutrófilos para o tecido inflamado é um dos sinais mais pragmáticos desta resposta fisiológica, já que contribui com a destruição de agentes nocivos e produção de mediadores químicos que colaboram com a formação dos sinais cardinais.



Existe uma grande quantidade de neutrófilos maduros na medula óssea e estas células podem ser rapidamente mobilizadas durante processos infecciosos e inflamatórios (FURZE & RANKIN, 2008).

Os agentes causadores de lesão são encontrados pelas células fagocíticas inflamatórias, primeiramente por neutrófilos, graças à diapedese. Este fenômeno consiste na passagem da referida célula do sistema imune inato presente nas vênulas pós-capilares para os tecidos (SERHAN *et al.*, 2008).

Através de um mecanismo desconhecido, os neutrófilos ativados são capazes de produzir no meio extracelular, fibras sensíveis constituídas de proteínas provenientes de grânulos azurofílicos, como a elastase e a mieloperoxidase (MPO), além de outras proteínas originadas de grânulos secundário e terciário, cujas principais funções consistem em destruir bactérias e degradar seus fatores de virulência, inclusive *in vivo*, antes mesmo dos microorganismos serem fagocitados pelos próprios neutrófilos. Essas fibras também participam do controle de infecções e ainda podem funcionar como uma barreira física que impedirá o alastramento das bactérias (BRINKMANN *et al.*, 2004).

Na década de 20 do século passado havia trabalhos que relatavam a liberação da MPO dos grânulos durante a fagocitose. Estudos indicaram que a MPO também pode ser liberada no meio extracelular antes do completo desenvolvimento do fagossomo. Já no final dos anos 60, Klebanoff descobriu que esta enzima está envolvida na produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e propôs ser uma substância antimicrobiana importante gerada dentro dos neutrófilos (DALE *et al.*, 2008; KLEBANOFF, 2005).

Os níveis de MPO no tecido são utilizados como marcadores de infiltração de neutrófilos e tem sido claramente correlacionado com a gravidade da doença. O edema de pata provocado pela carragenina promove alterações em alguns fatores bioquímicos e celulares. Em um trabalho realizado para verificar a infiltração celular através dos níveis da atividade de MPO, os autores observaram que o pico máximo de liberação desta enzima é alcançado entre a sexta e a vigésima quarta hora após a administração do estímulo flogístico (POSADAS *et al.*, 2004).

Em experimentos de peritonite aguda induzida pela administração intraperitoneal de tioglicolato em murinos foi verificado que camundongos pré-tratados com anticorpos monoclonais anti-CXCL1 e MIP-2 reduzem o número de

neutrófilos circulantes, indicando a participação destas quimiocinas na mobilização de neutrófilos provenientes da medula óssea (FURZE & RANKIN, 2008).

Zhang e colaboradores (1992) utilizaram o ensaio de reação passiva de Arthus como modelo de inflamação para avaliar a liberação e a função do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Ao tratar os animais com anticorpos monoclonais desta citocina, os autores observaram que TNF- $\alpha$  reduziu em 40% a concentração de neutrófilos, oito horas após o desafio. Além disto, camundongos tratados com um inibidor da síntese de leucotrienos (A-63162) e o anticorpo para TNF- $\alpha$  diminuíram significativamente a mobilização de neutrófilos para o peritônio em comparação a situação observada anteriormente, sugerindo que tanto TNF- $\alpha$  e leucotrienos atuam em conjunto e que são agentes quimiotáticos necessários para a chegada de neutrófilos ao local da infecção.

### **1.1.5 A farmacoterapia da dor e inflamação**

#### **1.1.5.1 Analgésicos opióides**

Atualmente, as substâncias desta classe são indicadas para a terapêutica de dores consideradas moderada a grave, ou seja, sugeridas para aquelas situações em que diversas terapias foram empregadas e não houve o controle efetivo da sensação algésica ou, ainda, quando os benefícios do tratamento superam os efeitos adversos (PASSIK, 2009).

A morfina foi isolada pela primeira vez em 1804 pelo farmacologista Sertürmer que a nomeou em alusão a Morfeu, o deus do sono. Os efeitos deste opióide ocorrem a partir de interações com receptores acoplados a proteína G, localizados nas terminações pré-sinápticas das fibras nociceptivas polimodais C e A $\delta$ , em diferentes níveis de afinidade. Destes, o receptor mu ( $\mu$ ) é responsável pela analgesia ao nível supraespinal e espinal, neste caso, como os receptores kappa ( $\kappa$ ) que também permitem a sedação do paciente. Todavia, estes receptores estão associados com o surgimento de efeitos indesejados menos graves que aqueles mediados pelos receptores  $\mu$ , como constipação, retenção urinária e depressão respiratória. Há ainda, um terceiro tipo clássico de receptor opióide nomeado pela letra grega  $\delta$  (delta), onde a ação de agonistas não-peptídicos proporcionaram baixa

atividade antinociceptiva sem apresentar outros efeitos característicos aos agonistas opióides (TRESCOT *et al.*, 2008; GUTSTEIN & AKIL, 2006; JUTKIEWICZ, 2006).

Além dos efeitos colaterais descritos, existem outras manifestações indesejadas provenientes do uso de opióides. Uma delas pode surgir a partir da retirada abrupta do fármaco desta classe culminando em crises de abstinências. Ademais, a morfina e seus congêneres podem induzir a ocorrência de tolerância, que refere-se a diminuição da eficácia do fármaco mediante a sua repetida administração, podendo ser creditada a dessensibilização ou internalização dos receptores (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

#### 1.1.5.2 Anti-inflamatórios esteroidais (AIEs)

Os fármacos desta classe, como a prednisona, a hidrocortisona e a dexametasona, são amplamente utilizados para tratar uma variedade de doenças inflamatórias, constituindo uma das terapias mais efetivas para aquelas crônicas (BARNES, 2006).

Diversos estudos indicam que os AIEs, também conhecidos como corticóides, suprimem a inflamação por múltiplos fatores dos quais podem ser citados a inibição da produção de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e as prostaglandinas provenientes de células do sistema imune inato e adaptativo, além de provocarem redução na migração leucocitária para a área da lesão. Ainda, seus efeitos anti-inflamatórios são mediados pela ativação de receptores de glicocorticóides presentes em células responsivas do sistema imune que, direta ou indiretamente, regulam a transcrição de alguns genes (BARNES, 2006b). Segundo Morrow e Roberts (2001), o efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides em doses terapêuticamente eficazes podem estar mais estreitamente relacionados com a supressão da expressão gênica da COX-2 do que a inibição da fosfolipase.

Contudo, os pacientes podem apresentar resistência ao uso de medicamentos desta classe e são mais suscetíveis aos efeitos colaterais em virtude da necessidade da utilização de altas doses e por isso, a terapia com AIEs constitui uma importante barreira para o tratamento de algumas doenças inflamatórias crônicas, como a asma (BARNES & ADCOCK, 2009).

### 1.1.5.3 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)

Atualmente, os AINEs representam uma das classes terapêuticas mais utilizadas devido as suas propriedades, já que podem ser prescritas como antitrombótico, antipirético, anti-inflamatório e analgésico (SIMONS *et al.*, 2004; BERTRAND *et al.*, 1999).

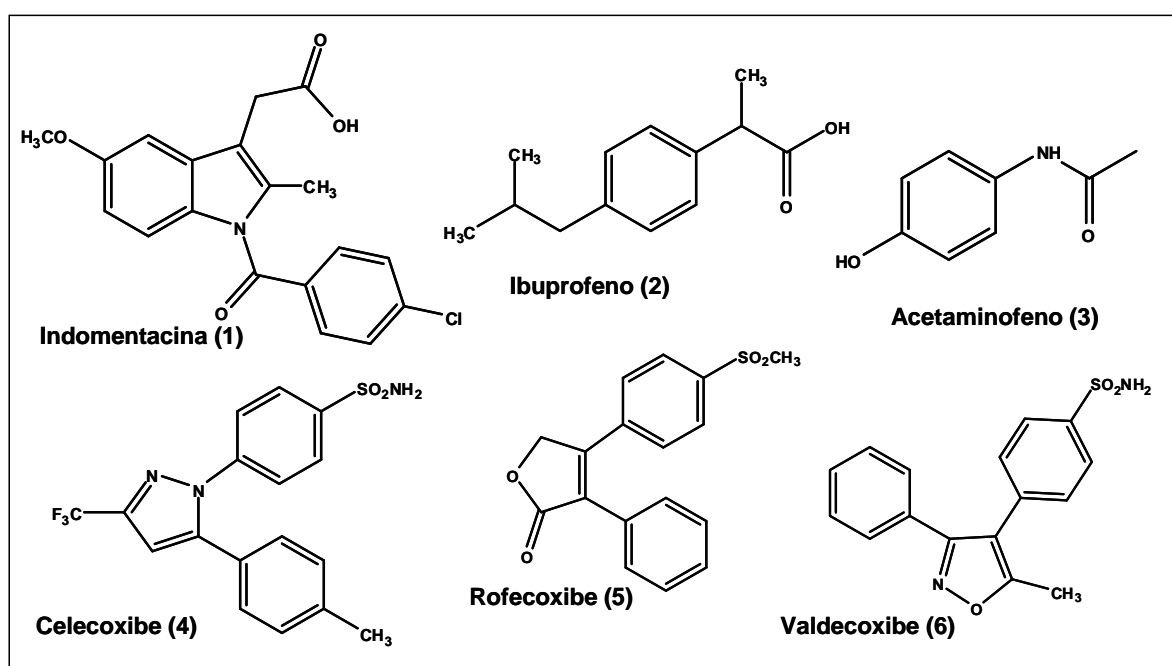
O mecanismo de ação desta classe de medicamentos foi elucidado somente nos anos 70 por John Vane. Apesar da eficácia terapêutica deste tipo de fármaco ser incontestável, o tratamento prolongado com AINEs acarreta no surgimento de efeitos gastrointestinais indesejáveis, como alterações superficiais na mucosa, gastrite erosiva, úlcera péptica e complicações ulcerativas (sangramento no trato gastrointestinal superior e perfuração), atribuídos a inibição da síntese de PGs produzidas via COX-1 expressa constitutivamente no estômago (RAO & KNAUS, 2008; SCHLANSKY & HWANG, 2009).

A indometacina (1) é um AINE clássico cujo núcleo indólico constitui parte de sua estrutura (Figura 7). Suas atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética foram descritas em 1963 e foi lançada como fármaco no mercado americano em 1965. Assim como o ibuprofeno (2) e o acetaminofeno (3), os efeitos anti-inflamatório e analgésico da indometacina estão relacionados a inibição não-seletiva da COX e de maneira competitiva com seu substrato o AA, tendo como consequência a interrupção da produção de prostanoídes. Contudo, além dos efeitos gastrointestinais indesejados, há a intolerância dos pacientes frente ao uso deste fármaco em virtude do surgimento de tonturas, vertigem, delírios e confusão mental, podendo limitar seu uso (BURKE *et al.*, 2006).

No final do século 20, cientistas focaram no planejamento de inibidores seletivos de COX-2 com atividade analgésica e anti-inflamatória superior aos AINEs tradicionais e com expectativa de reduzir o surgimento de sérios efeitos colaterais associados a inibição não-seletiva da enzima COX, como as ulcerações no trato gastrointestinal superior, que limitam a utilização clínica em tratamentos de longo período, como exige a terapia para a dor do câncer e da artrite reumatóide. Com isso, a Searle e a Pfizer, atualmente Pfizer Inc., lançou o celecoxibe (4) (Celebra<sup>®</sup>), seguido pelo rofecoxibe (5) (Vioxx<sup>®</sup>) da Merck (RUOFF & LEMA, 2003).

Entretanto, estudos conclusivos demonstraram que o uso de inibidores seletivos da isoforma 2 da COX provoca um desequilíbrio entre as concentrações naturais do eicosanóide protrombótico  $TXA_2$ , proveniente das plaquetas, e da  $PGI_2$  originada das células endoteliais, potencializando o surgimento de problemas cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio. Tal fato justifica a suspensão e a recomendação, pelo órgão regulatório de uso de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América (*Food and Drug Administration- FDA*), de interromper a comercialização do Vioxx<sup>®</sup> e do Bextra<sup>®</sup> (valdecoxibe (6)), respectivamente (RAO & KNAUS, 2008).

Logo, o desenvolvimento de um AINE eficiente e desprovido de efeitos colaterais potencialmente graves continua sendo um desafio para o planejamento de fármacos (RAO & KNAUS, 2008).



**Figura 7:** Fármacos AINEs inibidores da enzima COX.

## **2. JUSTIFICATIVA**

## 2.1 A QUÍMICA MEDICINAL

Segundo especialistas reunidos pela Química Medicinal da IUPAC (União internacional de química pura e aplicada; do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry), a química medicinal é uma disciplina baseada na química, mas que também inclui aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, cujo interesse está relacionado a invenção, descoberta, desenho, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, além da interpretação dos seus mecanismos de ação e interações a nível molecular, a construção de suas relações entre a estrutura e a atividade farmacológica, além do estudo de seu metabolismo. (BARREIRO, 2009).

Esta difícil tarefa engloba múltiplos fatores provenientes da complexidade do sistema biológico responsáveis pela resposta desejável do composto, sendo impossíveis de obtê-los de maneira aleatória. Para obter um composto que pode representar um novo candidato a fármaco, deve-se eleger o melhor alvo farmacológico, considerar os conhecimentos estruturais disponíveis para a interação com este biorreceptor e estabelecer a estratégia ideal com relação à construção da arquitetura molecular do novo ligante (FRAGA & BARREIRO, 2006).

Mais ainda, o emprego de técnicas computacionais e estratégias de modificação molecular clássicas da química medicinal, tais como a homologação e o bioisosterismo, são aplicadas durante o planejamento molecular no processo de invenção de um protótipo. Compreende, ainda, determinar as atividades farmacológicas do ligante, que uma vez ativo *in vivo* é denominado como protótipo (LIMA, 2007).

Na química medicinal, o termo “série homóloga” fora definido, assim como aquele introduzido por Gerhardt na química orgânica, como sendo a diferença existente entre moléculas proporcionada pela inserção de um benzeno, uma ligação vinílica ou grupamento(s) metileno (WERMUTH, 2008).

No caso da inserção de grupamentos metileno, há estudos realizados por diversos cientistas mostrando que a resposta biológica de uma substância está relacionada com o número de grupamento deste tipo adicionado à sua estrutura, podendo variar aleatoriamente em virtude desta modificação molecular, otimizando-as ou não. Mais ainda, a resposta biológica dos compostos homólogos pode: aumentar de acordo com a quantidade de grupamentos metileno inseridos, sem que

haja uma regra particular, ou atingir um platô; alternar conforme o número de átomos de carbono ou; em outras séries, diminuir regularmente (WERMUTH, 2008).

O bioisosterismo também é uma estratégia da química medicinal utilizada para o planejamento de novos fármacos baseada na modificação molecular de *lead compounds* e, inclusive, é uma abordagem adotada pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de análogos que possuam atividade terapêutica semelhante a de outros já existentes com o intuito de aumentar a seletividade a determinado receptor ou isoforma enzimática e melhorar a atividade farmacológica com simultânea redução dos efeitos adversos, ou seja, um processo de otimização do composto protótipo (LIMA & BARREIRO, 2005).

## 2.2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

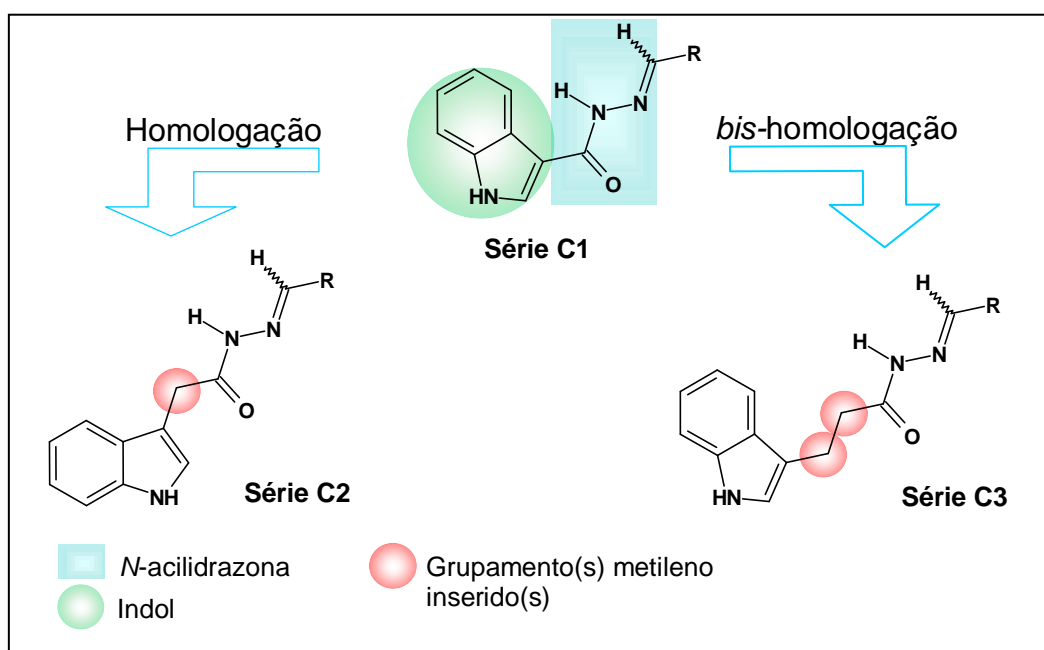
O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, o LASSBio<sup>®</sup>, planejou e sintetizou uma série de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos com o objetivo de atuarem na gênese da inflamação, com o intuito de inibir a enzima COX e interagir com biorreceptores serotoninérgicos que contribuam com o desenvolvimento do processo inflamatório para amenizar seus sintomas. Segundo Barreiro, alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem, por suas características, sugerir a necessidade de desenhar bioligantes ou protótipos onde se incluam, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas duplas, tornando-o capaz de ser reconhecido pelos dois biorreceptores. Ademais, quando os dois alvos eleitos pertencem a rotas bioquímicas diferentes, a molécula é denominada como simbiótica (BARREIRO & FRAGA, 2008).

As moléculas resultantes do referido planejamento são constituídas de duas subunidades principais em suas estruturas: a *N*-acilidrazona (NAH) e o indol e entre estes fragmentos fora inserido um ou dois grupamentos metileno, originando a Série C2 e a Série C3, respectivamente. Além disto, substituintes com diferentes características físico-químicas foram adicionados separadamente à estrutura dos derivados NAH indólicos (Esquema 1) (Anexo I).

A NAH e o indol são fragmentos moleculares conhecidos como estruturas privilegiadas (Esquema 1) (de SÁ ALVES *et al.*, 2009). Inicialmente, este termo foi dito para aquelas estruturas comuns a diversos fármacos ou protótipos capazes de fornecer pontos ligantes a mais de um tipo de biorreceptor (EVANS *et al.*, 1988).



Contudo, vale ressaltar que alguns autores acreditam que a ausência de seletividade para um determinado alvo pode proporcionar interações com alvos indesejados. Porém, o mesmo grupo destaca a importância desta característica, já que a seletividade pode ser obtida através de integrações suplementares de grupos substituintes apropriados (auxofóricos ou outras subunidades) às estruturas privilegiadas, constituindo uma excelente ferramenta para o planejamento de compostos semelhantes (DUARTE *et al.*, 2007; SCHNUR *et al.*, 2006).



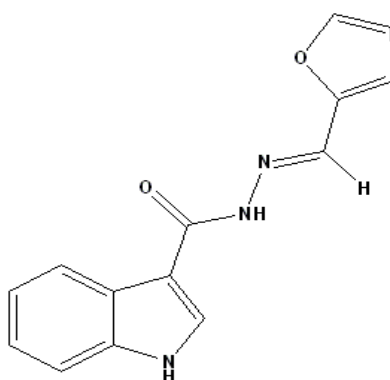
**Esquema 1:** Planejamento estrutural e identificação dos fragmentos privilegiados.

Os indóis provavelmente são os compostos heterociclos mais amplamente distribuídos na natureza, presente, por exemplo, no aminoácido triptofano, o precursor da 5-HT (JOULE *et al.*, 1998). O fragmento indólico representa uma das subunidades estruturais mais importante para a descoberta de novos candidatos a fármacos ou ferramentas para ensaios farmacológicos, independente se o planejamento tenha sido fundamentado em produtos naturais ou a partir da química combinatória (DE SÁ ALVES *et al.*, 2009).

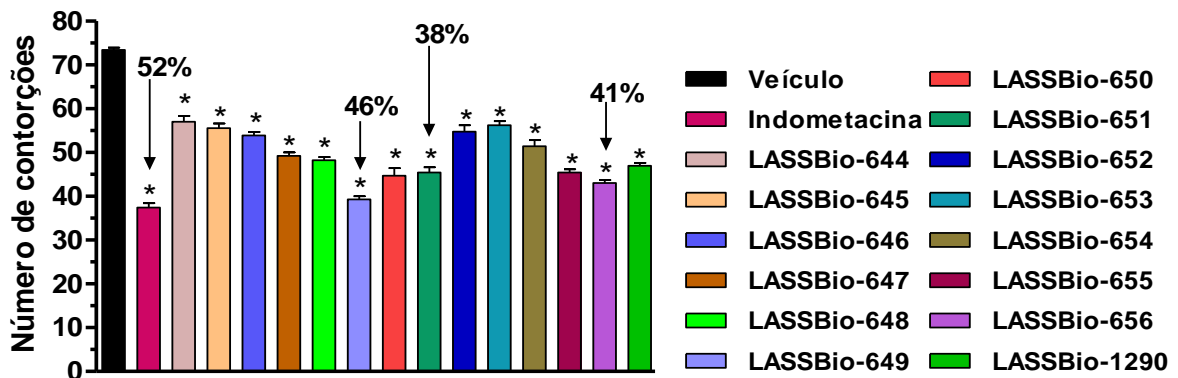
Os derivados NAH indólicos da Série C1, que fundamentaram o planejamento das Séries C2 e C3, foram testados no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N e no edema de pata de rato induzido por carragenina a 1%, para avaliar a nocicepção e a formação do edema, respectivamente. Os resultados obtidos por Silva (2002) exibiram moléculas com atividade antinociceptiva e outras somente com atividade antiedematogênica. Contudo, apenas o derivado LASSBio-

651 (Figura 8) destacou-se porque apresentou perfil pronunciado nos dois modelos empregados, sendo capaz de reduzir em 38% as contorções abdominais e 57,5% a formação do processo edematogênico, quando comparados ao grupo-controle (Gráficos 1 e 2 ), sem induzir a formações de lesões ulcerativas gástricas. O fato de LASSBio-651 ter sido o único derivado da série a apresentar ambas as atividades, a determinação do perfil deste composto prosseguiu com a obtenção da sua potência antinociceptiva no modelo de contorção abdominal apresentando uma  $DE_{50}$  de  $40,0 \mu\text{mol/kg}$  e uma potência antiedematogênica de  $9,81 \mu\text{mol/kg}$  (SILVA *et al.*, 2002).

Com o intuito de compreender seu perfil farmacológico, este composto NAH indólico foi selecionado para dosagem de mediadores lipídicos que contribuem com o desenvolvimento da inflamação. No exsudado inflamatório provocado por carragenina no modelo de *air pouch* constatou-se que o LASSBio-651 inibiu a produção de  $\text{PGE}_2$  em 65,9 %, e a  $100 \mu\text{M}$  inibiu em 99,5% a produção de  $\text{TXB}_2$  em plaquetas estimulada com colágeno, através da dosagem deste produto lipídico. Logo, estes resultados permitiram sugerir que o referido protótipo pode interferir na ação das isoformas da COX (resultados não-publicados).

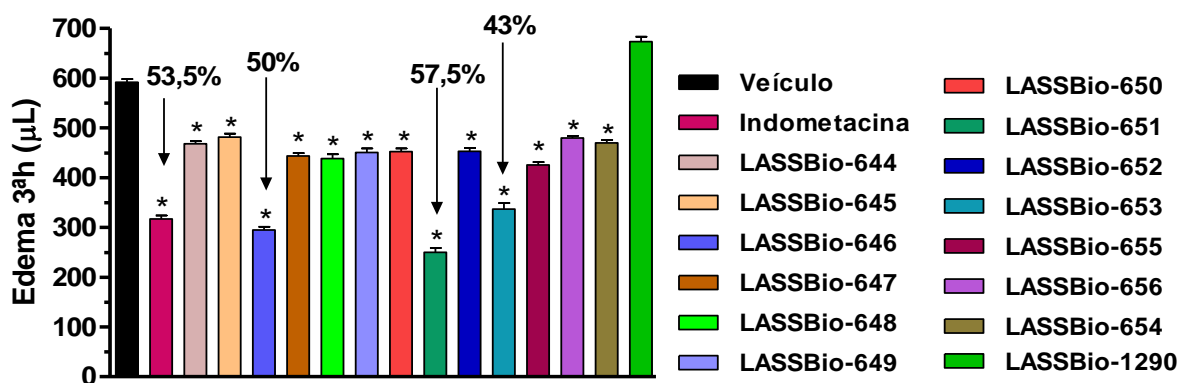


**Figura 8:** Estrutura do protótipo LASSBio-651.



**Gráfico 1:** Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C1 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução das contorções na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; n = 10 animais/grupo. \* $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Bonferroni).



**Gráfico 2:** Atividade antiedematogênica de 3ª hora dos derivados NAH indólicos - Série C1 e da indometacina no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução do edema na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados são expressos em média de volume ( $\mu\text{L}$ )  $\pm$  EPM; n = 5-10 animais/grupo; \* $p < 0,05$  (ANOVA two-way, Bonferroni).

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

A partir do paradigma da química medicinal e do desafio imposto pela complexidade do processo inflamatório, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, o LASSBio<sup>®</sup>, tem focado na descoberta e no desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos (LIMA & DE LIMA, 2009) anti-inflamatórios e antinociceptivos (FRAGA & BARREIRO, 2006).

Diante de resultados expressivos de algumas substâncias da série de derivados NAH indólicos obtidos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N e na avaliação de terceira hora da formação do edema de pata de rato induzido por carragenina a 1%, principalmente do LASSBio-651, o objetivo principal deste trabalho consiste na otimização das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do composto LASSBio-651 para obter um novo protótipo de fármaco com melhor perfil farmacológico que o análogo citado.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender as contribuições farmacológicas resultantes da homologação da série precursora que originou a Série C2 e C3;
- Avaliar as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-hipernociceptiva em modelos experimentais *in vivo* das novas séries de derivados NAH indólicos homologados;
  - Determinar a potência antinociceptiva e antiedematogênica dos compostos mais ativos e seus respectivos potenciais de irritabilidade gástrica;
  - Determinar o caráter anti-inflamatório, através da migração celular verificada pela dosagem da atividade de MPO, daqueles compostos selecionados a partir da triagem farmacológica no modelo de hipernocicepção térmica induzido por carragenina;
    - Dosar a produção de TNF- $\alpha$  proveniente de macrófagos de camundongo;
    - Avaliar a relação entre a estrutura e a atividade dos derivados NAH indólicos homologados.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Reagentes

Acetona, P. A.	REAGEN
Ácido acético (GLACIAL)	REAGEN
Carragenina	CIAGENK
Cloreto de Sódio	REAGEN
Cloreto de potássio	REAGEN
DMSO	SIGMA
Estreptomicina	GIBCO
Fosfato de Potássio Monobásico	REAGEN
Fosfato de Potássio Bibásico	GRUPO QUÍMICA
Goma Arábica	SIGMA
Hexadeciltrimetil amônio, mínimo 99% (HTAB)	SIGMA
Indometacina	SIGMA
LPS	SIGMA
Morfina	CRISTÁLIA
OPD	ACRO
Penicilina	GIBCO
Peróxido de hidrogênio	VETEC
Kit de dosagem de TNF- $\alpha$ :	BDBIOSCIENCE
Anticorpo de hamster anti-TNF- $\alpha$ (camundongo e rato)	
Anticorpo biotilado de coelho (anti-TNF- $\alpha$ camundongo)	
Estreptavidina	
Substrato TMB	
RPMI	SIGMA
Soro fetal bovino inativado	GIBCO
Tioglicolato de sódio	SIGMA

#### 4.1.2 Derivados *N*-acilidrazônicos indólicos

Os derivados *N*-acilidrazônicos indólicos avaliados (Anexo I) foram sintetizados no LASSBio<sup>®</sup> pelo aluno de mestrado Fernando Rodrigues de Sá Alves.

#### 4.1.3 Soluções

##### 4.1.3.1 Solução Salina 0,9%

NaCl	0,9 g
Água destilada	q.s.p. 100 ml

##### 4.1.3.2 Solução de Goma Arábica 5%

Goma arábica	5 g
Água destilada	q.s.p. 100 ml

##### 4.1.3.3 Solução de ácido acético 0,1N

Ácido acético glacial	0,6 ml
Água destilada	q.s.p 100 ml

##### 4.1.3.4 Solução de carragenina 1%

Carragenina	1 g
Solução salina	q.s.p. 100 ml

##### 4.1.3.5 Solução HTAB 0,5%

###### 1ª etapa

A- Fosfato de potássio monobásico	0,00671 g
Água destilada	q.s.p. 100 ml



B-	Fosfato de potássio bibásico	0,1044 g
	Água destilada	q.s.p. 100 ml

#### 2ª etapa

	Solução A	98,8 ml
	Solução B	1,2 ml
	HTAB	500 mg

#### 4.1.3.6 Solução reveladora

Esta solução é composta por um tablete de OPD triturado em um recipiente protegido de luminosidade contendo 10,8 ml de água destilada e 1,2 ml de solução tampão fosfato.

#### 4.1.3.7 Solução PBS

	Fosfato de sódio monobásico	0,83 g
	Fosfato de sódio bibásico	1,8 g
	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Água mili-Q	q.s.p. 1,0 L

O pH da solução deve ser ajustado para 7,4.

## 4.2 ANIMAIS

Os camundongos suíços e os ratos *wistar* utilizados no presente trabalho foram mantidos no biotério do LASSBio<sup>®</sup>, situado no Centro de Ciências e Saúde (CCS) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com livre acesso a água e ração, em condições de temperatura ambiente variando de 25 a 28 °C, com ciclo de claro e escuro de 12 horas.

Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa, estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

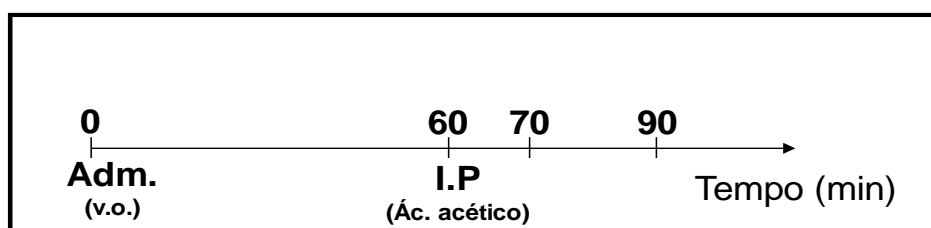
(COBEA) e pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-UFRJ).

### 4.3 METODOLOGIAS

#### 4.3.1 Contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N (COOLIER, *et al.*, 1968)

Para a triagem farmacológica da atividade antinociceptiva dos novos compostos *N*-acilidrazônicos indólicos, o modelo de contorções abdominais estabelecido por Coolier e colaboradores fora adotado. Neste protocolo, camundongos suíços machos e fêmeas pesando entre 18 e 25 gramas (g) são mantidos em jejum por 8 horas (h) com livre acesso à água antes da realização do experimento. O método consiste na administração da substância teste diluída em goma arábica a 5% por via oral a 100  $\mu\text{mol/kg}$  (tempo 0h) e após 1h o ácido acético é injetado por via intraperitoneal. Em seguida, há um intervalo de 10 minutos (min) para o completo estabelecimento das contorções abdominais e, a partir deste momento, a contagem é realizada por um período de 20 min (Esquema 2).

O estímulo induzido pelo ácido acético consiste em provocar uma sequência de contorções e extensões ao longo da parede abdominal, acompanhada por contrações do tronco e alongamento dos membros posteriores do animal.



**Esquema 2:** Cronologia do experimento de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1N.

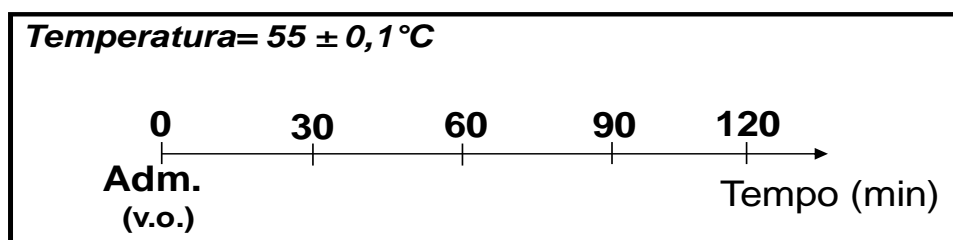
#### 4.3.2 Ensaio de placa quente (KURASHI *et al.*, 1983)

Este ensaio consiste em colocar o camundongo em uma superfície metálica à temperatura de  $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e cronometrar o tempo de permanência que o animal suporta sob influência do estímulo nocivo. O tempo de reação do murino frente à

temperatura da placa é medido pela observação de comportamentos relativamente estereotipados: a lambida da pata e o pulo. Ambas as reações são consideradas respostas supra-espinhais (LE BARS *et al.*, 2001).

No ensaio de placa quente, camundongos suíços, machos e fêmeas pesando mais de 25g, são mantidos em jejum por 8h com livre acesso à água antes da realização do experimento. O presente modelo é empregado para avaliar a existência de atividade antinociceptiva central daqueles compostos selecionados da triagem nas contorções abdominais, cujo efeito tenha sido superior ou equivalente a 40% de inibição, comparados ao grupo-controle.

A primeira leitura é realizada 30min antes da administração via oral do composto a 100  $\mu\text{mol/kg}$  em suspensão de goma arábica 5% (tempo: -30min) para que haja a adaptação do animal a placa aquecida. Em seguida, a leitura do tempo 0h é realizada e o composto é administrado por via oral. A sequência das leituras é aferida em intervalos de trinta minutos em um tempo total de duas horas (tempos: 30, 60, 90, 120 min) (Esquema 3).

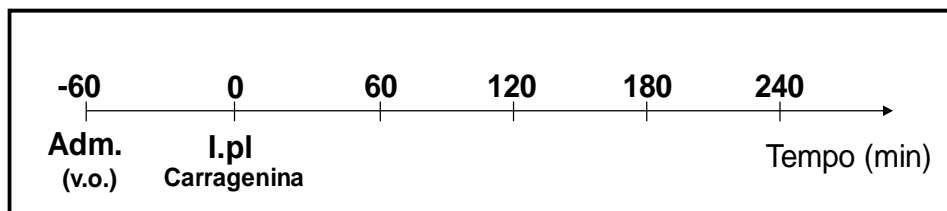


**Esquema 3:** Cronograma de avaliação do ensaio de placa quente.

#### 4.3.3 Edema de pata de rato induzido por carragenina 1% (FERREIRA, 1979)

O modelo experimental de edema de pata de rato induzido por carragenina 1% fora utilizado para fazer a triagem da atividade antiedematogênica dos novos compostos *N*-acilidrazônicos indólicos. Neste protocolo, ratos *wistar*, machos e fêmeas pesando entre 120 a 200 g, são mantidos em jejum por 8 h com livre acesso à água antes da realização do experimento. O método consiste na administração da substância em solução de goma arábica a 5% por via oral a 100  $\mu\text{mol/kg}$  e a carragenina é administrada por via intraplantar (I.PI.) na pata traseira direita do animal 1h depois da primeira etapa, assim como a solução de NaCl 0,9% (salina) administrada em sua pata esquerda, ambas em um volume de 100  $\mu\text{l}$ , de maneira

que não haja sangramento. Em seguida, através de um pleitismômetro acoplado em uma bomba peristáltica, o edema é medido a cada hora em um período total de quatro horas (Esquema 4) e obtido pela diferença de volume de solução deslocado pelas patas tratadas com carragenina e salina.



**Esquema 4:** Cronograma do experimento de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

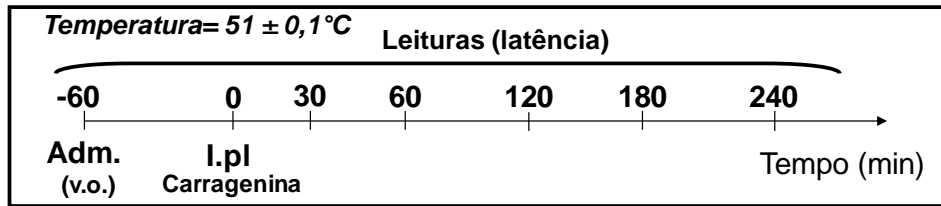
#### 4.3.4 Ensaio de hipernocicepção térmica: teste de placa quente modificado (LAVICH *et al.*, 2005)

Este ensaio farmacológico é realizado em concomitância com o modelo edematogênico descrito por Ferreira e consiste em verificar a atividade anti-hipernociceptiva dos compostos NAH indólicos homologados.

Os ratos *wistar* são colocados individualmente em uma placa quente com a temperatura ajustada a  $51 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . A primeira leitura é aferida 30 min antes da administração do composto para que haja a adaptação do animal ao estímulo térmico. A segunda leitura é realizada antes da administração por via oral da substância em uma solução de goma arábica a 5% e denominada como leitura de tempo 0h.

Uma hora depois, a carragenina a 1% foi injetada na pata traseira direita do animal e a salina administrada em sua pata esquerda, ambas em um volume de 100  $\mu\text{l}$  e de maneira que não haja sangramento. Em seguida, a medição da resposta hipernociceptiva é determinada 30, 60, 120, 180 e 240 min após a administração do agente flogístico.

A latência de resposta da retirada de pata é obtida pela diferença entre as respostas aferidas nos tempos depois da administração da carragenina e o tempo 0h. O tempo máximo permitido para que o rato permaneça na placa quente é de vinte segundos.



**Esquema 5:** Cronograma do experimento de hipernocicepção térmica induzido por carragenina 1%.

#### 4.3.5 Determinação das potências (DE<sub>50</sub>) antinociceptiva e antiedematogênica.

As potências antinociceptiva e antiedematogênica, isto é, os valores de DE<sub>50</sub> (dose capaz de produzir 50% do efeito máximo para estas atividades) foram obtidas para os compostos mais ativos na etapa de triagem farmacológica. A determinação da DE<sub>50</sub> ocorreu a partir da administração oral de diferentes doses das substâncias a grupos de animais independentes para a construção de curvas dose-resposta. A faixa de doses empregada foi de 0,3-300 µmol/kg. Os valores de DE<sub>50</sub> foram obtidos através de regressão não-linear sigmoidal através do programa Graph Pad Prism v. 5.0 e a seguinte equação de regressão não-linear:

$$Y = \text{bottom} + \frac{\text{top} - \text{bottom}}{1 + 10^{(\log \text{CE50} - X)}}$$

**X = log da Concentração**

#### 4.3.6 Potencial ulcerogênico (Adaptado de: Chi-Chung *et al.*, 1995)

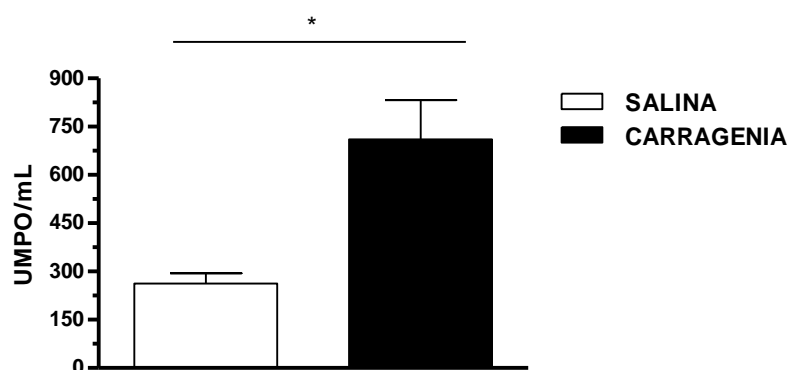
O potencial ulcerogênico foi avaliado através da dissecação dos estômagos dos ratos utilizados no ensaio de edema de pata de rato. Os estômagos foram abertos ao longo de sua curvatura maior. Após, a mucosa gástrica foi lavada com solução fisiológica e examinada macroscopicamente para identificar lesões pontuais ou francas hemorragias.

#### 4.3.7 Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) (Adaptado de: POSADAS *et al.*, 2004)

A dosagem da atividade de MPO foi realizada com o intuito de determinar o caráter anti-inflamatório dos derivados NAH indólicos em patas de rato inflamadas pela administração da carragenina, já que este agente flogístico aumenta a atividade de MPO no tecido afetado (Gráfico 3).

Neste ensaio, as patas inflamadas dos ratos são retiradas seis horas após a administração I.PI. da carragenina. O material retirado deve ser pesado, fracionado em tamanho menor e homogeneizado em 1 ml de solução de HTAB para cada 50 mg de tecido retraído. Após a homogeneização desta solução com o uso do Turrax no quinto nível de intensidade por 180 segundos, uma alíquota do sobrenadante é retirada e centrifugada a 13.000 rotações por minuto (r.p.m.) durante 120 segundos. Em seguida, 100 µl de solução reveladora são acrescentados a 100 µl deste homogenato e agitado por 15 min para que posteriormente o nível da atividade de MPO fosse dosado em um aparelho de ELISA à 450 nm.

O cálculo da unidade de MPO (UMPO) ocorre em função de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já que 1 µMOL desta substância promove um incremento de  $1,13 \times 10^{-2}$  na absorbância da amostra.



**Gráfico 3:** Atividade de MPO na pata de rato induzida pela administração de salina e de carragenina.

A carragenina 1% e a salina foram administradas por via intraplantar e as patas retiradas 6h após suas administrações; os resultados são expressos em UMPO/mL  $\pm$  EPM; número de animais (n)= 6. \*p<0,05 (one-way, ANOVA).

#### **4.3.8 Dosagem de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS. (GALLILY *et al.*, 1997)**

Camundongos suíços pesando entre 25g a 30g foram estimulados com uma solução de tioglicolato 3% administrada por via intraperitoneal. Depois de 3 dias, os macrófagos foram coletados por lavagem do peritônio com RPMI, as células foram então contadas e a concentração foi ajustada para 100.000 células/mL. Posteriormente, 300 $\mu$ L desta suspensão de células foram semeados em placa de 96 poços e incubados por 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, temperatura 37°C, umidade 80-90%) para permitir a adesão dos macrófagos à superfície dos poços. Após este período, os poços foram lavados por 2 vezes com PBS para a retirada das células que não aderiram, para que 300 $\mu$ L de RPMI suplementado com soro fetal bovino inativado, estreptomicina e penicilina incubando com DMSO e as substâncias teste por 1 hora fosse adicionado nas mesmas condições citadas acima. Após, os macrófagos foram estimulados com LPS por 24 horas.

Após 24 horas de estímulo, o sobrenadante foi coletado e o TNF- $\alpha$  dosado por ensaio imunoenzimático, utilizando o material apropriado e seguindo as instruções do fabricante.

## **5. RESULTADOS**



## 5 RESULTADOS

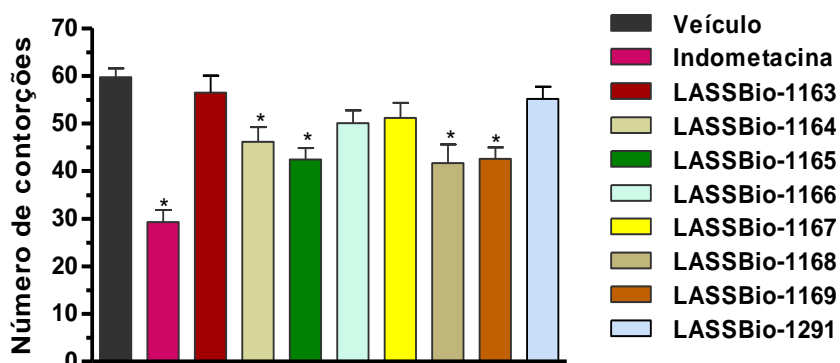
### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS

#### 5.1.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N em camundongos

Os novos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos foram testados no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1N, já que este ensaio permite avaliar o efeito antinociceptivo das moléculas em questão. Os resultados mostraram que grande parte das moléculas avaliadas possui atividade antinociceptiva.

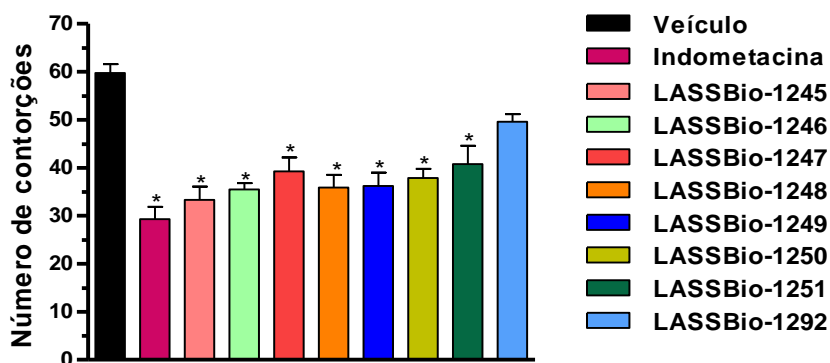
Os derivados testados compõem as duas novas séries de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos provenientes da homologação da série precursora. A Série C2 foi originada a partir da inserção de um grupo metileno entre os fragmentos indol e a *N*-acilidrazona (Anexo I). De um modo geral, as moléculas desta série apresentaram baixa atividade antinociceptiva no modelo de contorção quando comparadas ao fármaco de referência, a indometacina, cujo efeito foi de 52% (TRIBUTINO, 2002) (Gráfico 4). O composto mais ativo da série C2 neste modelo foi o LASSBio-1168 que, na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ , inibiu as contorções abdominais em 30%, comparando-o ao grupo-controle.

Já a Série C3 saturada composta pelos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos que contem dois grupos metileno inseridos entre seus grupamentos (Anexo I), mostrou maior atividade antinociceptiva em comparação à Série C2. O composto NAH indólico fenil substituído, LASSBio-1245, foi o composto mais ativo da série porque inibiu o efeito nociceptivo provocado pelo ácido acético em 44%. Este efeito foi de mesma magnitude que a indometacina. A triagem farmacológica exibiu outros três compostos NAH indólicos com atividade semelhante àquela do LASSBio-1245. As substâncias LASSBio-1246, LASSBio-1248 e LASSBio-1249 reduziram as contorções abdominais em 40,5%, 40% e 39%, respectivamente. Excetuando o LASSBio-1292 cujo resultado verificado não foi significativo, os compostos LASSBio-1247, LASSBio-1250 e LASSBio-1251 tiveram atividade inibitória do estímulo nociceptivo mediana em torno de 35% (Gráfico 5).



**Gráfico 4:** Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C2 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução das contorções na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; n = 6-15 animais/grupo. \* $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Bonferroni).



**Gráfico 5:** Efeito antinociceptivo dos derivados NAH indólicos - Série C3 e da indometacina no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução das contorções na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; n = 7-15 animais/grupo. \* $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Bonferroni).

Após a triagem farmacológica, prosseguiu-se a avaliação das moléculas que apresentaram efeito inibitório sobre as contorções abdominais superior a quarenta por cento para a obtenção da potência antinociceptiva no mesmo modelo utilizado. A determinação foi realizada através da construção de curvas dose-resposta, gerando

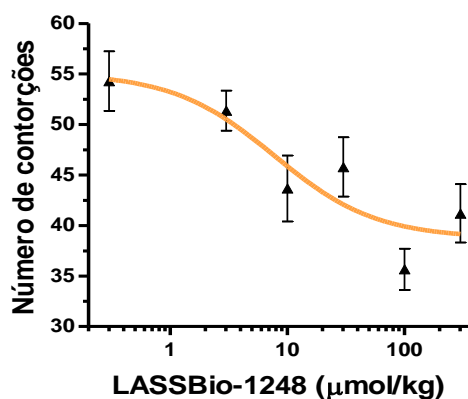
os valores de  $DE_{50}$ . As doses variaram de 0,3 a 300  $\mu\text{mol/kg}$ , administradas a grupos de animais independentes.

Nesta avaliação, os derivados LASSBio-1248 e LASSBio-1249 foram os mais potentes, apresentando valores de  $DE_{50}$  de 7,7 e 8,7  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente (Tabelas 1 e 2, Gráficos 6 e 7), cerca de 4 a 6 vezes mais potentes que os outros derivados. LASSBio-1246 (Tabela 3, Gráfico 8) apresentou uma  $DE_{50}$  de 30,4  $\mu\text{mol/kg}$  e LASSBio-1245 de 59,7  $\mu\text{mol/kg}$  (Tabela 4, Gráfico 9). Todos estes derivados apresentaram eficácias semelhantes (efeito máximo) em torno de 40%. Neste modelo, a indometacina apresentou efeito máximo de 62% e  $DE_{50}$  equivalente a 56,2  $\mu\text{mol/kg}$  (LEDA, 1999).

**Tabela 1:** Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1248 (0,3- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	n° contorções	% inibição
LASSBio-1248	0,3	7	54,3 $\pm$ 2,9	9,1
LASSBio-1248	3,0	8	51,4 $\pm$ 2,0	13,9
LASSBio-1248	10,0	6	43,7 $\pm$ 3,3	26,9
LASSBio-1248	30,0	5	45,8 $\pm$ 2,9	23,3
LASSBio-1248	100,0	9	35,7 $\pm$ 2,0	40,2
LASSBio-1248	300,0	5	41,2 $\pm$ 2,9	31,0

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = animais/grupo.



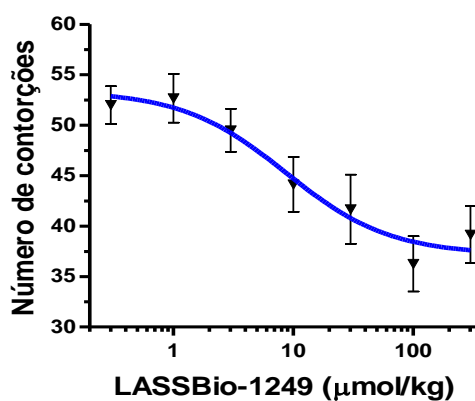
**Gráfico 6:** Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1248 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

LASSBio-1248 foi administrado em diferentes doses (0,3- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ), por via oral, uma hora antes da indução da contorção. Os resultados são expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; curva sigmoideal obtida por regressão não-linear ( $R^2 = 0,8194$ ).

**Tabela 2:** Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1249 (0,3- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	n° contorções	% inibição
LASSBio-1249	0,3	5	52,0 $\pm$ 1,9	12,9
LASSBio-1249	1,0	6	52,7 $\pm$ 2,4	11,8
LASSBio-1249	3,0	6	49,5 $\pm$ 2,1	17,1
LASSBio-1249	10,0	7	44,1 $\pm$ 2,7	26,2
LASSBio-1249	30,0	6	41,7 $\pm$ 3,4	30,2
LASSBio-1249	100,0	8	36,3 $\pm$ 2,7	39,2
LASSBio-1249	300,0	6	39,2 $\pm$ 2,8	34,4

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = animais/grupo.



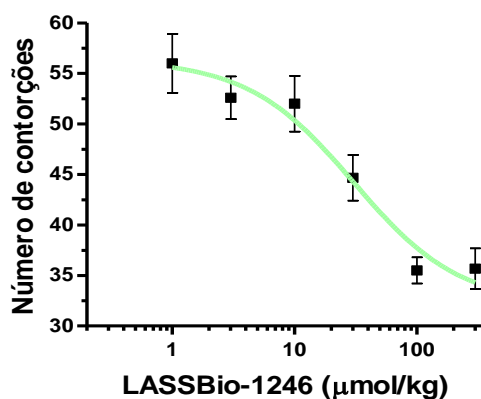
**Gráfico 7:** Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1249 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

LASSBio-1249 foi administrado em diferentes doses (0,3- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ), por via oral, uma hora antes da indução da contorção. Os resultados são expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; curva sigmoide obtida por regressão não-linear ( $R^2 = 0,9598$ ).

**Tabela 3:** Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1246 (1- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	n° contorções	% inibição
LASSBio-1246	1,0	5	56,0 $\pm$ 2,9	6,2
LASSBio-1246	3,0	5	52,6 $\pm$ 2,1	11,9
LASSBio-1246	10,0	5	52,0 $\pm$ 2,8	12,9
LASSBio-1246	30,0	6	44,7 $\pm$ 2,3	25,2
LASSBio-1246	100,0	10	35,5 $\pm$ 1,3	40,6
LASSBio-1246	300,0	9	35,7 $\pm$ 2,0	40,2

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = animais/grupo.



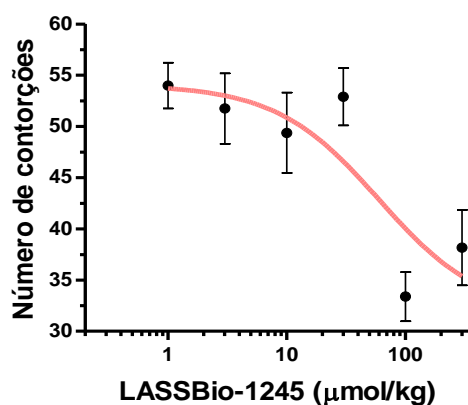
**Gráfico 8:** Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1246 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

LASSBio-1246 foi administrado em diferentes doses (1- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ), por via oral, uma hora antes da indução da contorção. Os resultados são expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; curva sigmoide obtida por regressão não-linear ( $R^2 = 0,9689$ ).

**Tabela 4:** Efeito antinociceptivo do derivado LASSBio-1245 (1- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	n° contorções	% inibição
LASSBio-1245	1,0	5	54,0 $\pm$ 2,2	9,6
LASSBio-1245	3,0	8	51,8 $\pm$ 3,4	13,3
LASSBio-1245	10,0	8	49,4 $\pm$ 3,9	17,3
LASSBio-1245	30,0	10	52,9 $\pm$ 2,8	11,4
LASSBio-1245	100,0	8	33,4 $\pm$ 2,4	44,1
LASSBio-1245	300,0	12	38,2 $\pm$ 3,7	36,0

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n = animais/grupo.



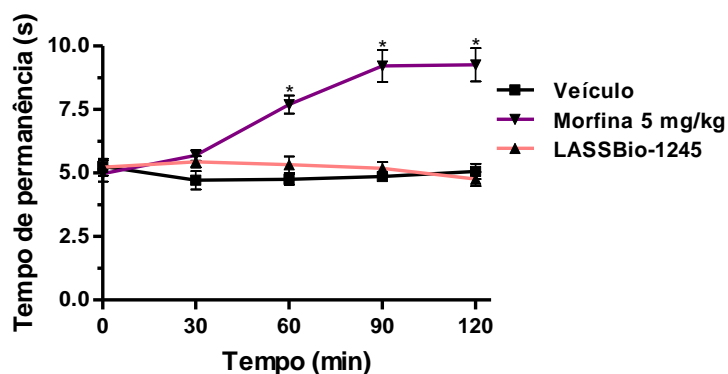
**Gráfico 9:** Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1245 no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.

LASSBio-1245 foi administrado em diferentes doses (1- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ), por via oral, uma hora antes da indução da contorção. Os resultados são expressos em número de contorções abdominais  $\pm$  EPM; curva sigmoide obtida por regressão não-linear ( $R^2 = 0,7439$ ).

### 5.1.2 Ensaio da placa quente em camundongos

Visando ampliar a caracterização do perfil antinociceptivo, considerando ainda a presença do anel indólico em substâncias com ação a nível central, a exemplo da serotonina, os derivados NAH indólicos mais ativos foram avaliados no ensaio da placa quente, um modelo experimental para estudo da nocicepção central a base de um estímulo térmico a 55 °C. A morfina, substância padrão utilizada no ensaio, é capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência dos camundongos sobre a placa quente desde a primeira avaliação da resposta nociceptiva, devido sua ação nos receptores opióides presentes no SNC e nas vias descendentes do estímulo doloroso.

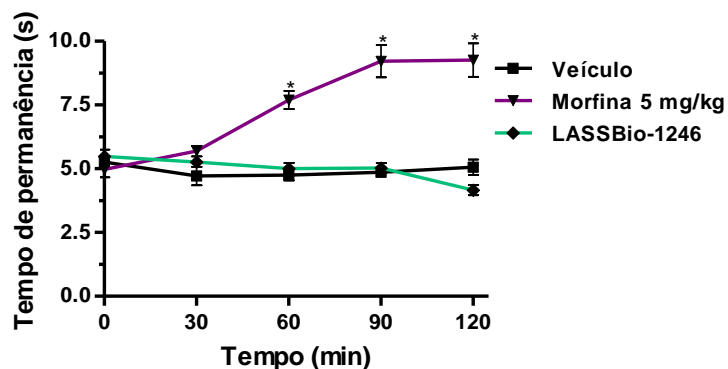
Nenhum dos derivados avaliados apresentou um perfil de ação antinociceptica central relevante (Gráficos 10-13). Entretanto, o derivado LASSBio-1249 (Gráfico 13) apresentou uma inibição estatisticamente significativa em torno de 25% no tempo de avaliação equivalente a 60 min, porém este efeito não é mantido ao longo do tempo.



**Gráfico 10:** Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1245 (100 µmol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos.

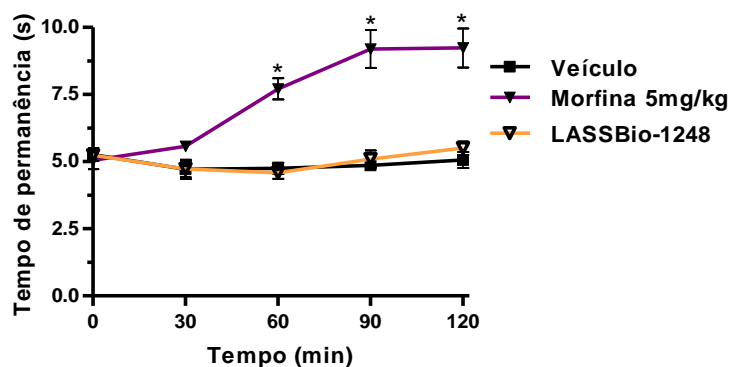
Os resultados são expressos em tempo de permanência, em segundos (s), dos animais sobre a placa quente  $\pm$  EPM; n = 8-10 animais/grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo controle (ANOVA two-way, Bonferroni).





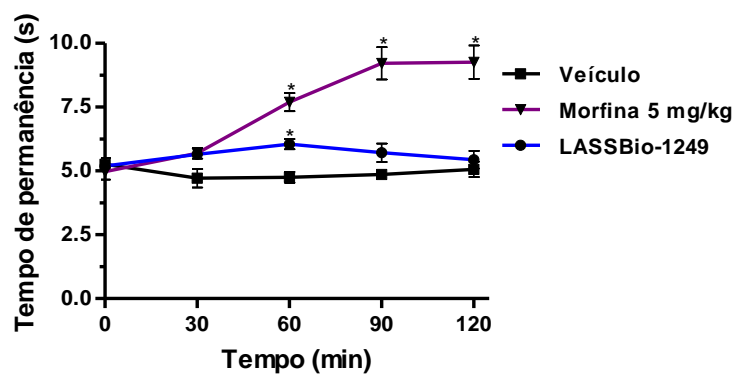
**Gráfico 11:** Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1246 (100  $\mu$ mol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos.

Os resultados são expressos em tempo de permanência, em segundos (s), dos animais sobre a placa quente  $\pm$  EPM; n = 8-10 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA two-way, Bonferroni).



**Gráfico 12:** Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1248 (100  $\mu$ mol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos.

Os resultados são expressos em tempo de permanência, em segundos (s), dos animais sobre a placa quente  $\pm$  EPM; n = 8-10 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA two-way, Bonferroni).



**Gráfico 13:** Efeito antinociceptivo central do derivado LASSBio-1249 (100 µmol/kg) no ensaio de placa quente em camundongos.

Os resultados são expressos em tempo de permanência, em segundos (s), dos animais sobre a placa quente  $\pm$  EPM;  $n = 8-10$  animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA two-way, Bonferroni).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS.

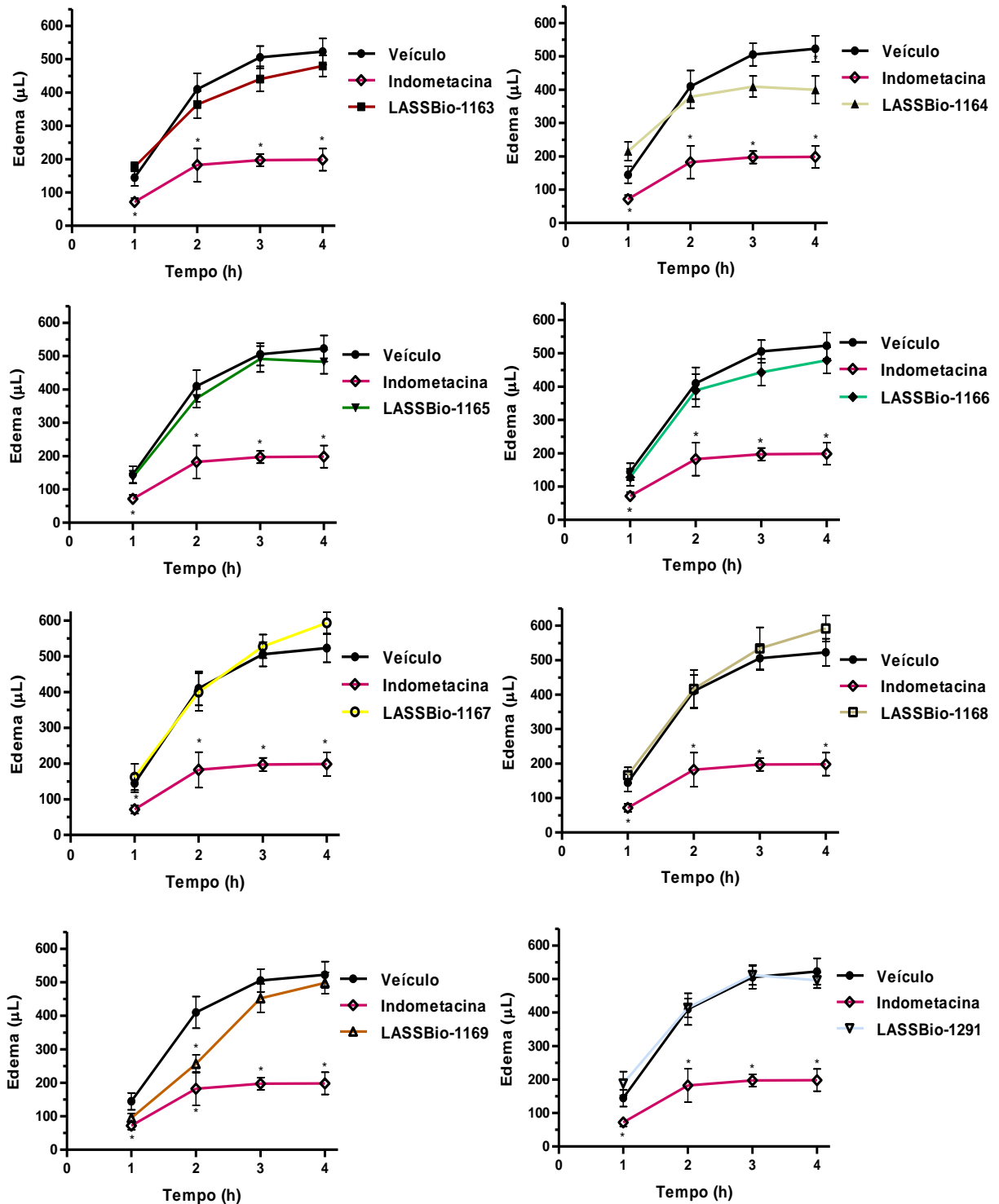
### 5.2.1 Ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%

A maioria dos compostos NAH indólicos da Série C2 não diminuiu a formação temporal do edema de maneira significativa, já que seus efeitos inibitórios, quando presente, foram inferiores a 20% comparados ao grupo-controle (Figura 9).

O derivado LASSBio-1169, cujo substituinte é o 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil, foi o único que apresentou uma atividade antiedematogênica significativa em torno de 37% na segunda hora do edema, contudo uma atividade inferior ao composto padrão, a indometacina. Todavia, esta atividade não foi observada nas horas seguintes do experimento. Observamos também uma atividade estatisticamente significativa para o derivado LASSBio-1164, com uma inibição de 23% na quarta hora após a administração da carragenina (Figura 9).

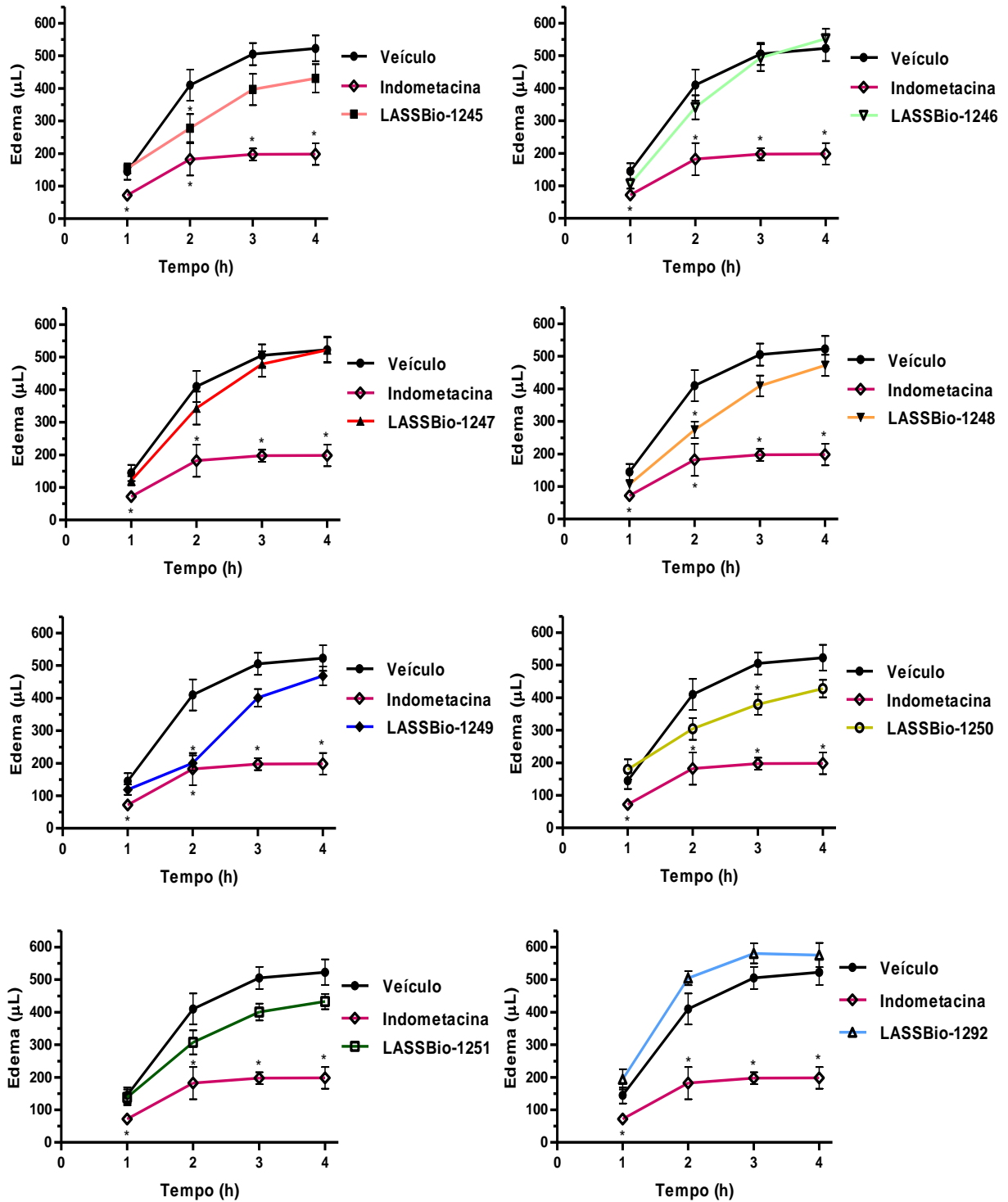
Assim como observado para o efeito antinociceptivo, a atividade antiedematogênica dos derivados NAH indólicos da Série C3 foi maior que a dos análogos da Série C2.

De um modo geral, estes derivados também só foram capazes de inibir a formação do edema de forma significativa na segunda hora. Destacamos aqui os derivados LASSBio-1245, LASSBio-1248, LASSBio-1249, LASSBio-1250 e LASSBio-1251 com 33%, 32%, 51%, 26% e 24 % de inibição (Figura 10). Ademais, LASSBio-1250 foi o único que manteve um efeito estatisticamente significativo na hora seguinte. Contudo, podemos observar que estes derivados mantêm uma inibição constante em torno de 20% nas horas seguintes, demonstrando a capacidade dos mesmos de controlar o efeito edematogênico de forma diferenciada dos demais derivados da mesma série assim como dos derivados da série C2, ainda que de forma estatisticamente não significativa. Cabe ressaltar que a atividade apresentada pelo derivado LASSBio-1249 foi semelhante à observada pela indometacina na segunda hora do experimento (Figura 10).



**Figura 9:** Efeito antiedematogênico temporal dos derivados NAH indólicos - Série C2 no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução do edema na dose de 100 µmol/kg. Os resultados são expressos em média de volume ± EPM; n = 6-12 animais/grupo; \*p<0,05 (ANOVA two-way, Bonferroni).



**Figura 10:** Efeito antiedematogênico temporal dos derivados NAH indólicos - Série C3 no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados por via oral uma hora antes da indução do edema na dose de 100 µmol/kg. Os resultados são expressos em média de volume ± EPM; n = 6-12 animais/grupo; \*p<0,05 (ANOVA two-way, Bonferroni).

Considerando que os derivados LASSBio-1248 e LASSBio-1249 foram os que apresentaram maior potência antinociceptiva, decidimos também determinar a potência antiedematogênica, ou seja, constatar se o efeito antiedematogênico também seria dependente da dose, nos tempos de duas e três horas após a injeção de carragenina . Além disso, o derivado LASSBio-1248 é análogo direto do protótipo LASSBio-651 por apresentar o mesmo substituinte 2-furila.

A resposta antiedematogênica do derivado LASSBio-1248 não variou com o aumento da dose, dessa forma não permitindo estabelecer uma relação dose-resposta e conseqüentemente a determinação da  $DE_{50}$  para a atividade antiedematogênica (Tabela 5). LASSBio-1248 também não apresentou efeito inibitório significativo ( $< 10\%$ ) na terceira hora do edema quando testado a  $300 \mu\text{mol/kg}$ .

Por outro lado, o derivado LASSBio-1249 foi capaz de inibir de forma dose-dependente a formação do edema e exibiu potência antiedematogênica com uma  $DE_{50}$  de  $18,6 \mu\text{mol/kg}$  (Tabela 6, Gráfico 14).

**Tabela 5:** Efeito antiedematogênico do derivado LASSBio-1248 (10- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) durante a segunda hora do modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

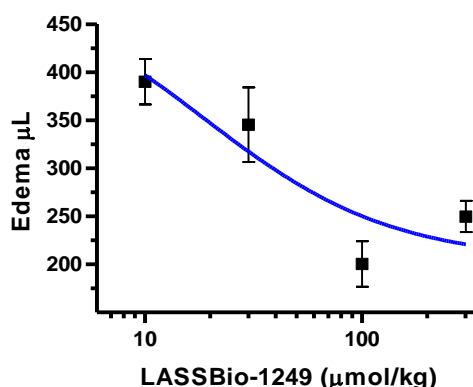
SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	EDEMA ( $\mu\text{L}$ )	% inibição
LASSBio-1248	10,0	10	398,0 $\pm$ 39,3	2,9
LASSBio-1248	30,0	7	324,8 $\pm$ 23,2	20,8
LASSBio-1248	100,0	11	273,80 $\pm$ 25,2	33,2
LASSBio-1248	300,0	8	343,1 $\pm$ 22,8	16,3

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n= n° de animais.

**Tabela 6:** Efeito antiedematogênico do derivado LASSBio-1249 (10- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) durante a segunda hora do modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

SUBSTÂNCIA	DOSE ( $\mu\text{mol/kg}$ )	n	EDEMA ( $\mu\text{L}$ )	% inibição
LASSBio-1249	10,0	5	390,0 $\pm$ 23,5	4,9
LASSBio-1249	30,0	5	308,1 $\pm$ 14,0	24,9
LASSBio-1249	100,0	9	200,4 $\pm$ 23,7	51,1
LASSBio-1249	300,0	5	249,8 $\pm$ 16,2	39,1

Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão; n= n° de animais.



**Gráfico 14:** Curva dose-resposta do derivado LASSBio-1249 durante a segunda hora no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina 1%.

LASSBio-1249 foi administrado em diferentes doses (10- 300  $\mu\text{mol/kg}$ ), por via oral, uma hora antes da administração da carragenina 1%. Os resultados são expressos em volume do edema em  $\mu\text{L}$   $\pm$  EPM; número de animais (n)= 5-9; curva sigmoide obtida por regressão não-linear ( $R^2 = 0,8162$ ).

### 5.3 ATIVIDADE ANTI-HIPERNOCEPTIVA DOS DERIVADOS NAH INDÓLICOS

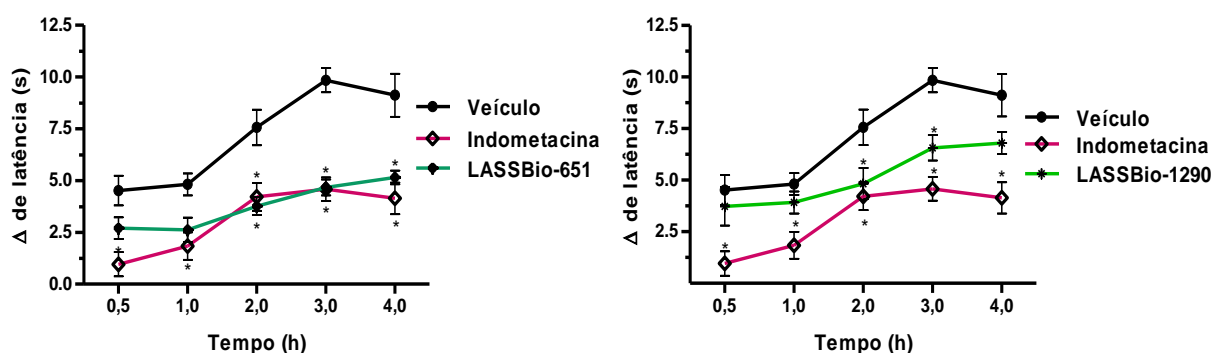
#### 5.3.1 Ensaio de hipernocicepção térmica (teste de placa quente modificado)

O ensaio de placa quente modificado foi utilizado para averiguar o potencial anti-hipernociceptivo dos compostos NAH indólicos das Séries C2 e C3 administrados por via oral a 100  $\mu\text{mol/kg}$ .

O protótipo LASSBio-651 e o derivado LASSBio-1290, recém-sintetizado da Série C1, também foram avaliados neste modelo para fins de comparação. LASSBio-651 já havia sido avaliado no modelo de hipernocicepção induzida por formalina, apresentando uma  $DE_{50}$  de 37,8  $\mu\text{mol/kg}$  na inibição da 2ª fase do ensaio de formalina, isto é, da fase inflamatória, porém sua atividade no modelo empregado neste trabalho ainda não havia sido caracterizada.

LASSBio-651 apresentou efeito anti-hipernociceptivo significativo no modelo de hipernocicepção térmica, aumentando o tempo de latência a partir da segunda hora em torno de 50% até quatro horas após o estímulo inflamatório e hipernociceptivo (Figura 11).

Já o derivado LASSBio-1290 foi menos ativo que LASSBio-651, apresentando uma atividade anti-hipernociceptiva significativa em torno de 35% nos tempos de 120 e 180 min (Figura 11).



**Figura 11:** Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos compostos LASSBio-651 e LASSBio-1290 no ensaio de hipernocicepção térmica.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados nas doses de 100 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, por via oral, uma hora antes da administração da carragenina 1%. Os resultados são expressos em variação ( $\Delta$ ) do tempo de latência em segundos (s)  $\pm$  EPM; n = 6- 11 animais. \* $p < 0,05$  (ANOVA- twoway, Bonferroni).



Quando os derivados da Série C2 foram avaliados (Figura 12), podemos observar que somente o derivado LASSBio-1166 apresentou um efeito anti-hipernociceptivo significativo, aumentando o tempo de latência dos animais sobre a placa quente em 47% a partir da 2ª hora do ensaio, um efeito da mesma magnitude da indometacina. Já o LASSBio-1169 apresentou um efeito significativo de 34% no tempo 120 min, mas esta atividade não foi mantida (Figura 12).

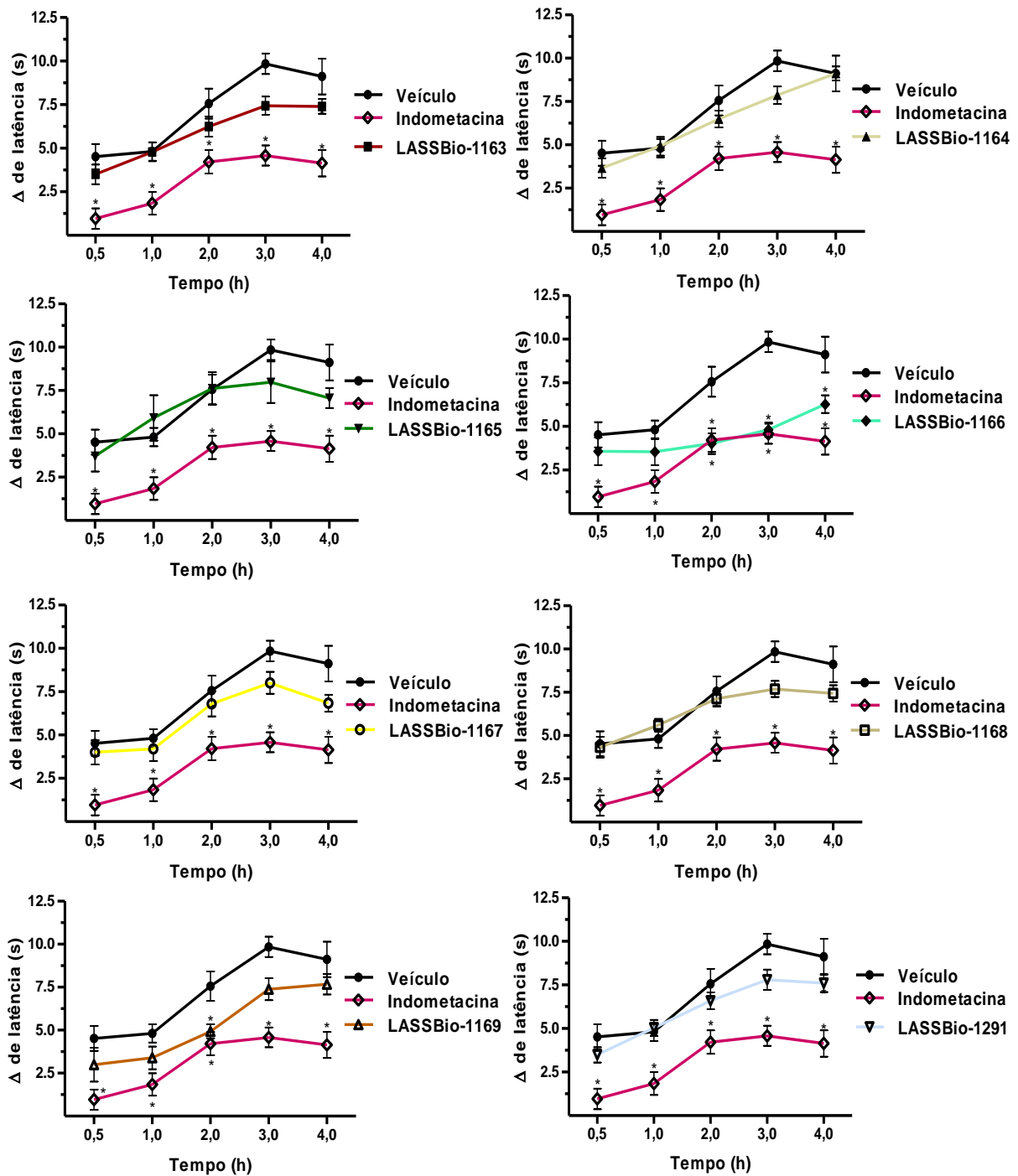
Todos os derivados da Série C3 foram avaliados no modelo de hipernocicepção térmica. Em geral, os compostos desta série foram mais ativos que aqueles da Série C2, assim como nos outros modelos. Contudo, o derivado LASSBio-1245 foi o único composto que não apresentou efeito anti-hipernociceptivo (Figura 13).

Podemos destacar os efeitos anti-hipernociceptivos dos derivados LASSBio-1247, LASSBio-1248 e LASSBio-1249, que ao contrário do observado para o efeito antiedematogênico, apresentaram efeitos pronunciados em todos os tempos estudados após o estímulo inflamatório e hipernociceptivo.

LASSBio-1247 foi capaz de inibir a hipernocicepção desde os primeiros 30 min de forma bastante significativa, aumentando o tempo de latência global em 55%, demonstrando uma pequena diminuição na quarta hora do ensaio. LASSBio-1248 também exerce efeito anti-hipernociceptivo expressivo desde os primeiros 30 min, mantendo uma inibição global em torno de 50%, sendo semelhante ao observado para a indometacina. LASSBio-1249, diferentemente de LASSBio-1247 e LASSBio-1248, apresentou um efeito bem menos pronunciado nos primeiros momentos do ensaio, exercendo uma ação hipernociceptiva global em torno de 36% (Figura 13).

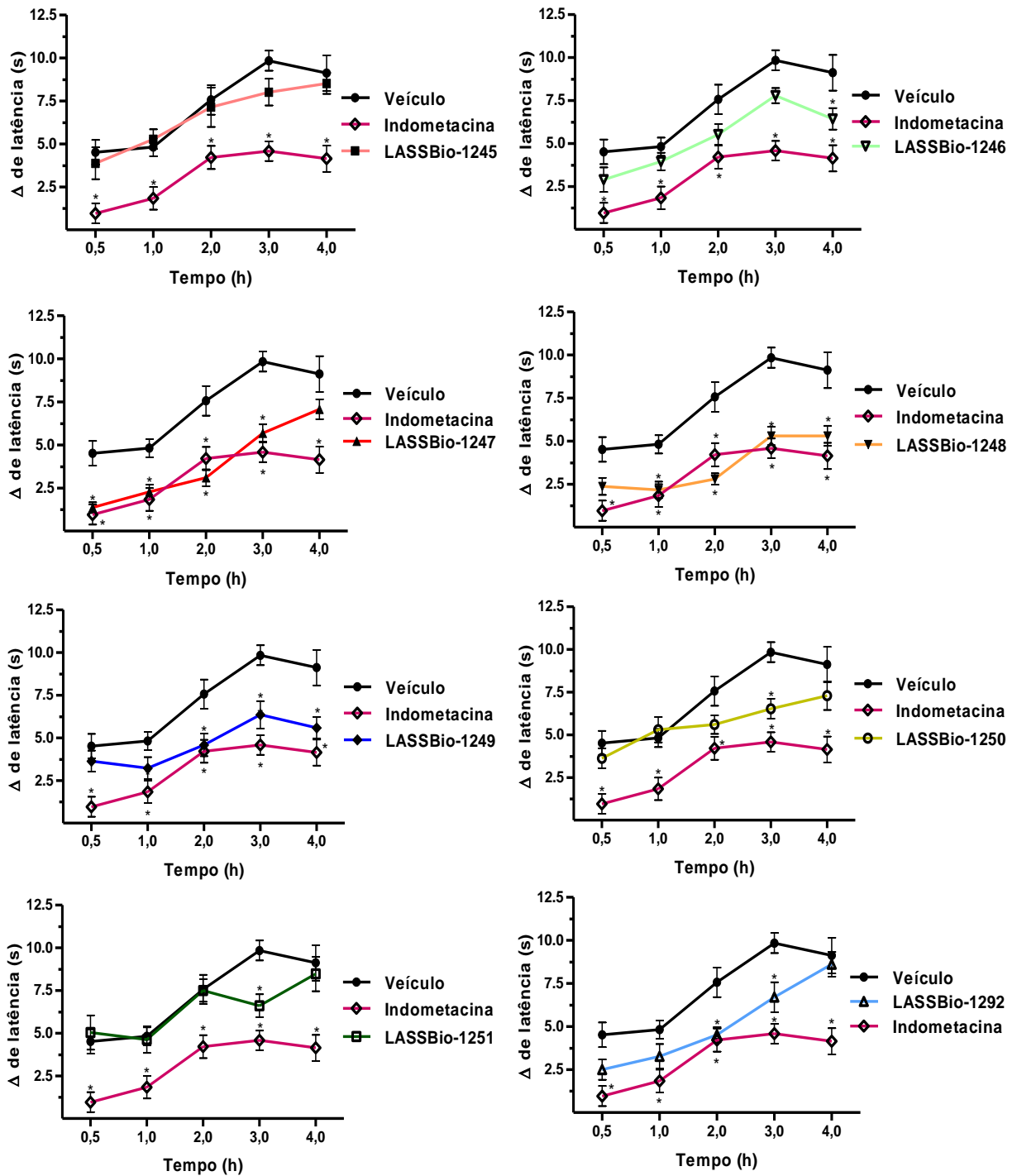
Cabe destacar também que o efeito apresentado pelo derivado LASSBio-1292 aumenta o tempo de latência de forma estatisticamente significativa nos tempos de 120 e 180 min, em torno de 35%, perdendo o efeito na quarta hora do experimento (Figura 13).

Os demais derivados LASSBio-1246, LASSBio-1250 e LASSBio-1251 não apresentaram um perfil de atividade anti-hipernociceptiva relevante comparado com os demais (Figura 13).



**Figura 12:** Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos derivados NAH indólicos - Série C2 no ensaio de hipernocicepção térmica.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados nas doses de 100 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, por via oral, uma hora antes da administração da carragenina 1%. Os resultados são expressos em variação ( $\Delta$ ) do tempo de latência em segundos (s)  $\pm$  EPM; n = 5- 11 animais. \* $p < 0,05$  (ANOVA- twoway, Bonferroni).



**Figura 13:** Atividade anti-hipernociceptiva da indometacina e dos derivados NAH indólicos - Série C3 no ensaio de hipernocicepção térmica.

Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados nas doses de 100 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, por via oral, uma hora antes da administração da carragenina 1%. Os resultados são expressos em variação ( $\Delta$ ) do tempo de latência em segundos (s)  $\pm$  EPM;  $n = 5$ - 13 animais. \* $p < 0,05$  (ANOVA- twoway, Bonferroni).

#### 5.4 POTENCIAL ULCEROGÊNICO

A determinação do potencial ulcerogênico dos derivados NAH indólicos das Séries C2 e C3 foi obtida através da dissecação dos estômagos dos ratos utilizados nos modelos de edema de pata e hipernocicepção térmica para avaliar a possibilidade destes compostos provocarem lesões ulcerativas gástricas, sabendo ser um efeito colateral dos fármacos AINEs tradicionais (BURKE *et al.*, 2006). A análise macroscópica da mucosa do estômago dos animais realizada sete horas após a administração por via oral dos derivados na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$  mostrou que nenhum deles induziu a formação de lesões pontuais ou hemorrágicas como aquelas provocadas pela indometacina. Ainda, os animais tratados com LASSBio-1248 e LASSBio-1249 na dose de 300  $\mu\text{mol/kg}$  também não apresentaram lesões ulcerativas no estômago.

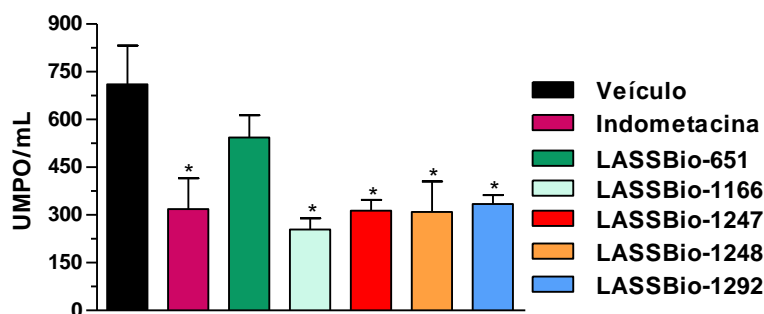
#### 5.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Dentre outros fatores, o recrutamento de neutrófilos circulantes na corrente sanguínea contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório. A quantificação da infiltração de neutrófilos para a pata afetada pela carragenina pode ser realizada através da avaliação dos níveis de MPO, já que sua atividade funciona como um marcador da migração deste tipo celular para os tecidos. Para isto, a região subplantar da pata dos ratos foi retirada após seis horas a administração do estímulo flogístico (POSADAS *et al.*, 2004).

Em virtude do derivado LASSBio-651 ser o composto NAH indólico protótipo dos derivados homologados, o efeito sobre a atividade da MPO também foi averiguado. LASSBio-651 reduziu em 23% a migração de neutrófilos na pata do rato inflamada pela carragenina, mas de forma estatisticamente não-significativa. Por outro lado, seu análogo direto da Série C2, LASSBio-1166, apresentou atividade estatisticamente significativa equivalente a 64% (Gráfico 15).

Outrossim, a determinação da atividade de MPO mostrou que os compostos da Série C3 testados no referido modelo exibiram efeito semelhante àquele do LASSBio-1166. Quando comparados ao grupo-controle, LASSBio-1247, LASSBio-1248 e LASSBio-1292 reduziram a infiltração de neutrófilos na pata inflamada em

aproximadamente 55%. Vale ressaltar que o efeito destas substâncias foi da mesma magnitude que o fármaco de referência utilizado no experimento, a indometacina (Gráfico 15). Este ensaio permitiu observar que a estrutura NAH indólica homologada pode favorecer a redução da migração celular.



**Gráfico 15:** Efeito sobre a atividade da MPO provocada pela indometacina e pelos derivados NAH indólicos anti-hipernociceptivos.

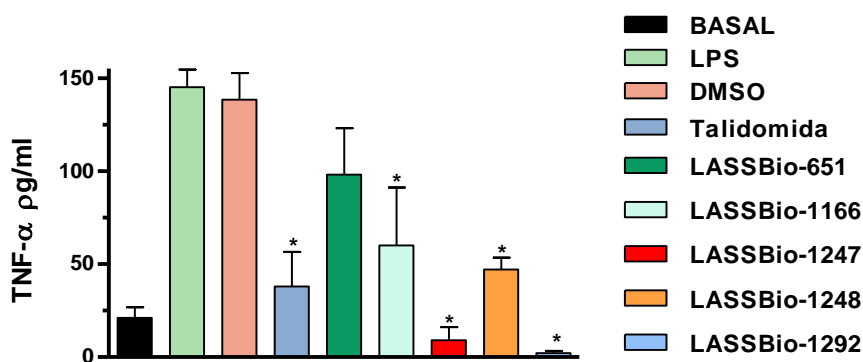
Os derivados NAH indólicos e a indometacina foram administrados nas doses de 100 e 30  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, por via oral, uma hora antes da administração da carragenina 1%; a região subplantar da pata foi retirada 6h após a injeção do estímulo flogístico. Os resultados são expressos em porcentagem da redução da unidade de MPO/ml (UMPO/ml)  $\pm$  EPM para número de animais (n)= 4- 6\*. \* $p < 0,05$  (teste "t" de Student).

## 5.6 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS COM LPS

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma potente citocina pró-inflamatória produzida em grandes quantidades por macrófagos, que contribui com o desenvolvimento da dor inflamatória por intermédio de outras citocinas e a partir da sensibilização de nociceptores, além de mediar à migração de neutrófilos para tecidos inflamados (VERRI *et al.*, 2006).

Com isso, os derivados NAH indólicos que apresentaram atividade anti-hipernociceptiva foram avaliados no modelo *in vitro* de dosagem da produção de TNF- $\alpha$  proveniente de macrófagos peritoneais de camundongos suíços estimulados por LPS. Neste ensaio, os derivados LASSBio-1248, LASSBio-1247 e LASSBio-1292 destacaram-se por inibir a produção desta citocina em 68%, 94% e 98%, respectivamente, comparados ao grupo-controle (Gráfico 16). O derivado-protótipo

LASSBio-651 não apresentou efeito significativo, sendo capaz de inibir somente em 30% a produção de TNF- $\alpha$  na concentração de 100  $\mu$ M (Gráfico 16).



**Gráfico 16:** Efeito da talidomida e dos derivados NAH indólicos anti-hipernociceptivos na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais de camundongos suíços estimulados por LPS.

Os derivados NAH indólicos foram testados a 100  $\mu$ M e a talidomida a 300  $\mu$ M; os resultados são expressos picogramas/ml de produção de TNF- $\alpha$   $\pm$  EPM para número de animais (n)= 3-4\*; substâncias testadas a 100  $\mu$ M e Talidomida a 300  $\mu$ M; \*p<0,05 (ANOVA-Oneway).

## **6. DISCUSSÃO**

## 6 Discussão

Diante do desafio imposto pelas etapas de invenção e identificação de novos compostos biologicamente ativos, além da complexidade inerente ao sistema biológico, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, o LASSBio<sup>®</sup>, tem desenvolvido e sintetizado moléculas com a subunidade NAH para obter protótipos de fármacos com perfil analgésico e anti-inflamatório.

Assim como a NAH, o fragmento indólico compõe a estrutura das moléculas avaliadas no presente trabalho que foram originadas a partir da homologação do derivado LASSBio-651 ((*E*)-*N'*-(2-furanil metileno)-1*H*-indol-3-carbohidrazida), já descrito pelo grupo de pesquisa do LASSBio<sup>®</sup> com relevante propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória. Ambas as subunidades são consideradas estruturas privilegiadas por estarem contidas em vários derivados com funções terapêuticas diversificadas, inclusive em moléculas biologicamente ativas que atenuam o desenvolvimento do processo inflamatório (DUARTE *et al.*, 2007; de SÀ ALVES *et al.*, 2009). Ainda, a estratégia de homologação gerou duas novas séries análogas de derivados que foram objetos do presente estudo.

Inicialmente, os compostos foram avaliados no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, um modelo onde a nocicepção é estimulada por diversos mediadores químicos, como as PGs, e por isso constitui uma metodologia importante para a realização da triagem farmacológica de compostos antinociceptivos. A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético pode ser reduzida por inibidores da recaptção de noradrenalina e de 5-HT, AINEs e narcóticos (COLLIER *et al.*, 1968; GRAY *et al.*, 1998).

O modelo de contorção abdominal mostrou que as moléculas NAH indólicas da Série C2 foram menos ativas que aquelas da Série C3. Tal situação é evidente na equivalência entre os efeitos do composto mais ativo da Série C2 (LASSBio-1168; 30% de inibição) com o menos ativo da Série C3 (LASSBio-1251; 32% de inibição), excetuando o derivado LASSBio-1292. Ademais, todas as moléculas obtidas a partir da inserção de um grupo metileno entre o núcleo indólico e a NAH também foram menos ativas que seus respectivos análogos da Série C1, série que o derivado-protótipo LASSBio-651 pertence, indicando que este tipo de homologação não constituiu uma estratégia de sucesso na obtenção de análogos mais ativos.



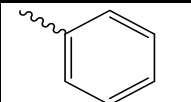
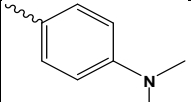
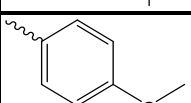

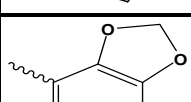
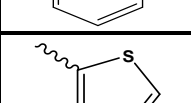
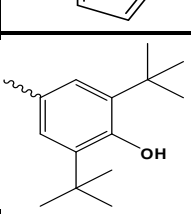
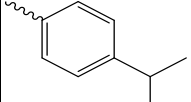
Contudo, a homologação com a inserção de dois grupos metileno permitiu a obtenção de análogos ativos quando comparamos o perfil antinociceptivo dos derivados protótipos com seus respectivos análogos da Série C3.

Apesar de o emprego desta ferramenta da química medicinal ter gerado uma leve redução da atividade antinociceptiva para alguns dos derivados da Série C3, ainda que ativos (LASSBio-1247, LASSBio-1251) a homologação mostrou-se uma estratégia adequada para se obter análogos mais ativos, já que os derivados LASSBio-1245, LASSBio-1246 e LASSBio-1249 inibiram as contorções abdominais em aproximadamente duas vezes mais que seus análogos da Série C1, LASSBio-644, LASSBio-646 e LASSBio-653, respectivamente (Quadro 1), e os derivados LASSBio-1248 e LASSBio-1250 não tiveram seus perfis alterados.

A alteração bioisostérica do substituinte fenila do derivado LASSBio-644 pela 2-furila e pela 2-tiofenila do LASSBio-651 e LASSBio-655, respectivamente, melhorou a atividade antinociceptiva do LASSBio-644. Contudo, esta relação de otimização causada pelo bioisosterismo de anel não é observada na Série C3. Isto quer dizer que o incremento do efeito antinociceptivo promovido pela *bis*-homologação tornou a estratégia de bioisosterismo entre anéis indiferente para a redução das contorções abdominais.

Ainda, a alteração bioisostérica do radical *p*-dimetilamino fenil substituído na região imínica do derivado LASSBio-1246 pelo radical *p*-isopropil fenil na mesma posição (LASSBio-1292) diminuiu a atividade antinociceptiva. Vale observar que a presença deste substituinte juntamente com a *bis*-homologação é deletéria para a atividade em questão, visto que o LASSBio-1292 foi o único composto da Série C3 que não apresentou atividade no modelo de contorção abdominal.

**Quadro 1:** Atividade antinociceptiva dos análogos NAH indólicos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N.

Substituinte	Atividade antinociceptiva					
	Série C1		Série C2		Série C3	
	Substância	% de inibição	Substância	% de inibição	Substância	% de inibição
	LASSBio-644	22%	LASSBio-1163	5%	LASSBio-1245	44%
	LASSBio-646	27%	LASSBio-1164	23%	LASSBio-1246	40,5%
	LASSBio-649	46%	LASSBio-1165	29%	LASSBio-1247	34%
	LASSBio-651	38%	LASSBio-1166	16%	LASSBio-1248	40%
	LASSBio-653	23%	LASSBio-1167	14%	LASSBio-1249	39%
	LASSBio-655	38%	LASSBio-1168	30%	LASSBio-1250	36%
	LASSBio-656	41%	LASSBio-1169	29%	LASSBio-1251	32%
	LASSBio-1290	36%	LASSBio-1291	8%	LASSBio-1292	17%

Mesmo diante da existência de relatos que os efeitos da homologação não são capazes de ser previstos, a atividade antinociceptiva pronunciada da maioria das moléculas da Série C3 pode ser explicada em virtude da maior liberdade conformacional existente nas moléculas quando comparadas àquelas da Série C2 (WERMUTH, 2008).

Na grande maioria dos casos, as bases para a ocorrência dos efeitos farmacodinâmicos é a interação da substância com uma biomacromolécula de determinada importância fisiológica (SIPPL, 2008). Como exemplo, as ligações de hidrogênio são recorrentes no reconhecimento molecular de inúmeros fármacos e

caracterizadas por acontecer entre um átomo de hidrogênio com átomos de nitrogênio, flúor ou oxigênio, além de contribuírem predominantemente para a especificidade do reconhecimento molecular. Ainda, este tipo de ligação é a interação não-covalente mais importante existente no sistema biológico, inclusive para a interação entre o ligante e a proteína (SCHAEFFER, 2008; BARREIRO & FRAGA, 2008b).

Com relação aos valores obtidos de  $DE_{50}$  o derivado LASSBio-1245 exibiu menor potência que seus análogos. Tal fato pode ter sido em virtude da inexistência de um ponto favorável à ligação de hidrogênio no substituinte do composto em questão, ao contrário dos demais derivados NAH indólicos avaliados. Os compostos LASSBio-1246, LASSBio-1248 e LASSBio-1249 mostraram ser substâncias antinociceptivas mais potentes que o protótipo LASSBio-651 e a indometacina (Tabela 7) (LÉDA, 1999).

**Tabela 7:** Potência da indometacina e dos compostos NAH indólicos no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,1N.

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>EF. MÁXIMO*</b>	<b><math>DE_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/kg}</math>)</b>	<b><math>DE_{50}</math> (mg/kg)</b>
Indometacina	62	56,2**	20,1
LASSBio-651	52	40,0	10,1
LASSBio-1245	44	59,7	17,4
LASSBio-1246	41	30,4	10,2
LASSBio-1248	40	7,7	2,2
LASSBio-1249	39	8,7	2,9

$DE_{50}$ : Dose eficaz para cinquenta por cento do efeito máximo. \*% de inibição; \*\*LÉDA, 1999.

Outrossim, apesar da inserção de dois grupos metileno entre os fragmentos indol e NAH que resultou no derivado LASSBio-1248 não ter incrementado o efeito antinociceptivo comparado ao análogo da Série C1, LASSBio-651, e ainda ter apresentado menor efeito máximo, a determinação da  $DE_{50}$  mostrou que a homologação levou à um incremento da potência antinociceptiva de aproximadamente cinco vezes ( $DE_{50}$  LASSBio-1248 = 7,7  $\mu\text{mol/kg}$  x  $DE_{50}$  LASSBio-651 = 40  $\mu\text{mol/kg}$ ). De acordo com a literatura, a homologação é uma estratégia utilizada por químicos medicinais para obter compostos mais potentes que os protótipos. Tal fato sugere que a homologação tenha favorecido a ocorrência de

interações mais estáveis com o sítio de reconhecimento da biomacromolécula (SCHAEFFER, 2008).

Os derivados que apresentaram atividade antinociceptiva pronunciada no modelo de contorção abdominal foram avaliados no ensaio de placa quente. Considerando a presença do fragmento indólico na estrutura dos compostos estudados, assim como na molécula de serotonina, e a atividade antinocicetiva central observada para LASSBio-1249, poderíamos especular uma ação deste em alvos serotoninérgicos situados em fibras de lâminas superficiais do corno dorsal (YOSHIMURA & FURUE, 2006).

O modelo de edema induzido por carragenina tem sido empregado na triagem farmacológica para verificar o efeito antiedematogênico, conseqüentemente o potencial anti-inflamatório de substâncias, por ser um método capaz de avaliar o aumento do volume da pata do animal quando estimulada por um agente flogístico (FERREIRA, 1979). Estudos realizados por Posadas e colaboradores (2004) mostram claramente a formação do edema e a migração de neutrófilos em virtude da administração intraplantar de carragenina (POSADAS *et al.*, 2004).

Sabidamente, o processo edematogênico também pode ser induzido pela ação de diversos mediadores químicos, como a 5-HT, a histamina, bradicinina, PGs e TNF- $\alpha$ , cujos efeitos acarretam no aumento da permeabilidade vascular (MAJNO *et al.*, 1961; ROCHA *et al.*, 2006).

Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) como a indometacina são capazes de reduzir a formação do edema em virtude do seu mecanismo de ação que resulta na redução da síntese de PGs (BURKE *et al.*, 2006). Com isso, o ensaio de edema de pata de rato tem sido amplamente utilizado para verificar efeitos de novos candidatos a fármacos com perfil anti-inflamatório.

A avaliação temporal da atividade antiedematogênica dos compostos NAH indólicos da série C2 mostrou que o LASSBio-1169 foi o único derivado a reduzir significativamente a formação do edema, mas somente na segunda hora do modelo. O ensaio de edema indicou que as substâncias da Série C3 são mais ativas que aquelas da Série C2, com efeito predominante durante a segunda hora da avaliação da resposta inflamatória. Tal comportamento está bem caracterizado para o derivado LASSBio-1249 que, testado na dose de 300  $\mu\text{mol/kg}$ , exibiu o mesmo perfil antiedematogênico pronunciado duas horas após a administração da carragenina. Estes resultados apontam para a possibilidade de os compostos NAH indólicos

interferirem na ação de mediadores químicos mais proeminentes no início do processo inflamatório agudo, como a 5-HT, e que tenham menor relevância conforme o surgimento de outros mediadores, diferente do protótipo LASSBio-651 cuja atividade antiedematogênica pronunciada durante a terceira hora pode estar relacionada com a inibição de formação de prostaglandinas (SILVA *et al.*, 2002).

Apesar de os compostos da Série C3 serem mais ativos que os da Série C2, a comparação com o perfil antiedematogênico apresentado pelos análogos da Série C1 mostra que a homologação não otimizou este efeito. Isto pode ser evidenciado pela comparação entre os efeitos apresentados por LASSBio-651 com seu análogo direto LASSBio-1248, que teve baixa atividade antiedematogênica e não foi dependente da dose. Por outro lado, LASSBio-1249 mostrou um perfil de ação dependente da dose e uma potência antiedematogênica de 18,6  $\mu\text{mol/kg}$ .

Apesar das diferenças existentes entre LASSBio-1249 e LASSBio-651, a determinação de suas potências indica que o protótipo da série possui melhor perfil antiedematogênico ( $\text{DE}_{50} = 9,8 \mu\text{mol/kg}$ ).

O modelo de hipernocicepção térmica induzida por carragenina consiste em expor o animal a uma temperatura contínua até que a resposta nociceptiva refletida na pata seja evocada. Segundo Lavich e colaboradores, este ensaio permite detectar a hipersensibilidade periférica desencadeada pela carragenina e pode ser induzida pela  $\text{PGE}_2$ , histamina, bradicinina e 5-HT, além da importante participação de neutrófilos. Ainda, este modelo é sensível a efeitos analgésicos de AINEs, como a indometacina, e constitui uma abordagem adequada para estudos farmacológicos e de dor inflamatória (LAVICH *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2008). Mediante a retórica, os compostos NAH indólicos foram avaliados no modelo de placa quente modificado para averiguar seus respectivos potenciais anti-hipernociceptivos.

Deste modo, os resultados apontam novamente para uma maior atividade das moléculas da Série C3 em comparação àquelas da Série C2.

A estratégia de bioisosterismo aplicada a alguns compostos da Série C3 foi favorável para a obtenção da atividade anti-hipernociceptiva. Uma comparação do perfil anti-hipernociceptivo restrita entre os isómeros do anel fenila (LASSBio-1245) mostrou que a substituição pelo 2-tiofenila (LASSBio-1250) levou a um incremento do efeito. A substituição pelo radical 2-furila (LASSBio-1248) aumentou mais ainda o efeito, otimizando o perfil anti-hipernociceptivo dos outros dois bioisómeros em questão. Estes fatos permitem sugerir que, neste caso, a redução da hidrofobicidade

do sistema aromático dos substituintes isósteros destas moléculas pertencentes à Série C3 foi benéfica para a atividade sobre a dor inflamatória.

O radical 2-furila parece ser um grupamento auxofórico mais conveniente para obter o efeito anti-hipernociceptivo, quando comparado a outros análogos e até mesmo a indometacina. O composto LASSBio-1166 destacou-se das moléculas da Série C2 porque apresentou atividade superior aos outros derivados da mesma série. Quando este substituinte fora combinado com a estrutura NAH indólica *bis*-homologada, percebe-se que este tipo de estratégia contribuiu para um incremento do efeito logo no início da avaliação da resposta hipernociceptiva, exibindo um perfil anti-hipernociceptivo similar à indometacina. Além destas substâncias, o análogo da Série C1, o protótipo LASSBio-651, também apresentou efeito relevante.

Para compreender a importância da homologação na atividade anti-hipernociceptiva, uma comparação entre os análogos do protótipo LASSBio-651 foi realizada através do cálculo da área sob a curva do perfil do referido efeito evidenciado pelos derivados 2-furil substituídos. O tratamento estatístico mostrou que a modificação estrutural que originou o derivado LASSBio-1166 não modificou o perfil anti-hipernociceptivo, indicando novamente que a homologação não é uma estratégia adequada para obter um análogo mais ativo que o protótipo. Entretanto, a análise estatística indica que a aplicação da estratégia da *bis*-homologação aperfeiçoou o perfil anti-hipernociceptivo do protótipo LASSBio-651.

Vale ressaltar que os análogos LASSBio-1169 e LASSBio-1251 exibiram atividade mediana em determinado momento da avaliação da resposta anti-hipernociceptiva. Todavia, o efeito em questão pode estar associado à capacidade antioxidante do radical 3,5-di-*terc*-4-hidroxifenil, fato que também favoreceria ao efeito antiedematogênico do LASSBio-1169 evidenciado durante a segunda hora do experimento. Sabidamente, as espécies reativas de oxigênio provenientes de neutrófilos ativados e células endoteliais contribuem com o processo hipernociceptivo induzido por carragenina e com o aumento da permeabilidade vascular (IBI *et al.*, 2008; BOUEIZ & HASSOUN, 2009). Duarte e colaboradores verificaram em derivados NAH que o substituinte 3,5-di-*terc*-4-hidroxifenil teria a capacidade de doar o hidrogênio da hidroxila encontrada na posição *para* do anel fenila para radicais livres, conferindo uma importante característica que o permite atuar como agente antioxidante (DUARTE *et al.*, 2007b).

Em outra diretriz, diversos estudos correlacionam a hipernocicepção com a migração de neutrófilos para o local inflamado, além da presença de TNF- $\alpha$  que também atua como agente quimiotático para estas células do sistema imune. Esta citocina pró-inflamatória promove o fenômeno hipernociceptivo através de receptores de alta afinidade, mas de acordo com Cunha e colaboradores (2008) também é intermediado pelos neutrófilos, provavelmente porque estas células são capazes de produzir mediadores inflamatórios, como a PGE<sub>2</sub>, que diminuem o limiar de ativação dos nociceptores com o aumento da excitabilidade da membrana neuronal (VERRI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008; COUNTAX *et al.*, 2005).

Com os resultados obtidos é evidente que parte do efeito anti-hipernociceptivo dos derivados LASSBio-1166, LASSBio-1247, LASSBio-1248 e LASSBio-1292 pode ser em virtude da redução da migração de neutrófilos para o sítio inflamado e pela inibição da produção de TNF- $\alpha$  que, por sua vez, também interferem na migração leucocitária, diferente do protótipo LASSBio-651 cuja atividade anti-hipernociceptiva parece ter menor correlação com a migração de neutrófilo e a produção desta citocina inflamatória.

Diante do exposto, nossos resultados apontam para diferentes perfis de ação do protótipo LASSBio-651 e o análogo LASSBio-1248, provocada pela *bis*-homologação. Apesar de apresentarem atividades antinociceptiva e anti-hipernociceptiva consideráveis, o efeito observado no ensaio de edema de pata de rato indica que LASSBio-1248 não age preferencialmente em alvos que atenuam a formação do edema como o LASSBio-651, cujas atividades podem envolver relevante participação de prostanóides. O efeito pronunciado de LASSBio-1248 e outros derivados NAH indólicos *bis*-homologados sobre a produção de TNF- $\alpha$  e a migração de neutrófilos sugere que estes apresentam perfis semelhantes a inibidores de TNF- $\alpha$ , como a talidomida, já que a literatura descreve o potencial anti-inflamatório, anti-hipernociceptivo e antinociceptivo deste fármaco sem contudo afetar a exsudação, reforçando mecanismos distintos para LASSBio-651 e seus análogos (LACERDA, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Mas diante da disparidade existente entre a semelhança da redução da migração de neutrófilos e a redução na produção de TNF- $\alpha$  provocada pelos compostos NAH indólicos selecionados e a diferença entre os perfis anti-hipernociceptivos pode ter sido em virtude de compostos com perfil anti-hipernociceptivo destacável, como o LASSBio-1248, atenuar a ação de outro

mediador químico de outra via da gênese do processo inflamatório, sinergicamente a redução do recrutamento celular.

Devido às características do fragmento NAH, outra hipótese que não pode ser descartada é a ação dos compostos sobre a via de produção dos prostanóides. A inibição da atividade da COX e conseqüentemente a produção de mediadores lipídicos como a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub>, que contribuem para o aumento da secreção de muco no estômago e também participam do desenvolvimento dos sinais cardinais, está associada ao surgimento de ulcerações no trato gastrointestinal, constituindo um dos principais efeitos colaterais de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos inibidores não-seletivos da COX (JONES *et al.*, 2008; SMYTH *et al.*, 2006b). Ademais, estudos indicam que para haver a formação de lesões ulcerativas no estômago é preciso que a atividade das duas isoformas sejam inibidas (WALLACE *et al.*, 2000). A análise da mucosa gástrica dos animais mostrou que os compostos NAH indólicos não exibiram potencial de ulcerogenicidade gástrica, diferentemente da indometacina.

Outros compostos descritos com atividade anti-inflamatória cujas estruturas contem o fragmento NAH reduziram a produção de PGE<sub>2</sub> sem, contudo, causar lesões ulcerativas gástricas (CUNHA *et al.*, 2002; TRUBUTINO, 2002; TRIBUTINO *et al.*, 2009). Mais ainda, o protótipo LASSBio-651 também reduziu a produção de PGE<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub> sem apresentar potencial de ulcerogenicidade. Logo, a possibilidade de os compostos NAH indólicos também atuarem sobre a via de produção dos prostanóides não pode ser excluída, sabendo que o fragmento indólico e a NAH são subunidades privilegiadas que podem regular a ação de mais de um mediador químico envolvido no surgimento dos sinais cardinais da inflamação, atuando como simbióticos.

Este estudo mostrou que alguns derivados NAH indólicos podem ser protótipos de fármacos anti-inflamatório e/ou analgésico, seguros quanto à indução de lesões ulcerativas gástricas e com potencial possibilidade de atenuar os sintomas de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide cuja gênese envolve tanto a participação de TNF- $\alpha$  quanto a de neutrófilos.



## **7. CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

- O estudo revelou novos derivados *N*-acilidrazônicos indólicos com destacadas atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e anti-hipernociceptiva;
- A homologação que resultou na Série C2 não se mostrou favorável para as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-hipernociceptiva;
- A *bis*-homologação, realizada na Série C1 que originou a Série C3 permitiu a otimização do perfil antinociceptivo da nova série de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos;
- Quanto ao perfil antinociceptivo, os derivados mais potentes foram LASSBio-1248 e LASSBio-1249 com  $DE_{50}$  de 7,7 e 8,7  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, sendo o derivado LASSBio-1248 cinco vezes mais potente que seu análogo e protótipo LASSBio-651, reforçando a otimização alcançada pela homologação;
- Os derivados *N*-acilidrazônicos indólicos se mostraram desprovidos de efeito antinociceptivo central, quando avaliados no ensaio de placa quente;
- A *bis*-homologação também conferiu atividade anti-hipernociceptiva evidenciada para os derivados LASSBio-1247, LASSBio-1248, LASSBio-1249 e LASSBio-1292;
- O radical 2-furila consiste em um grupamento auxofórico importante para a atividade anti-hipernociceptiva desta série de derivados *N*-acilidrazônicos indólicos, cujo efeito é aumentado quando está associado à *bis*-homologação (LASSBio-1248);
- As diferenças encontradas entre o perfil antiedematogênico e anti-hipernociceptivo observado para os derivados LASSBio-1166, LASSBio-1247, LASSBio-1248 e LASSBio-1292 indicam que estes derivados *N*-acilidrazônicos indólicos devem interferir preferencialmente em mediadores que não contribuem para a formação do edema mas que participam do processo inflamatório;
- A atividade anti-hipernociceptiva dos derivados LASSBio-1166, LASSBio-1247, LASSBio-1248 e LASSBio-1292 parece estar relacionada com a redução da migração de neutrófilos e com a inibição da produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , diferente do protótipo LASSBio-651;

- Os derivados NAH indólicos homologados constituem uma classe de protótipos de fármacos analgésio e/ou anti-inflamatório seguros com relação à toxicidade gástrica;
- Os resultados apontam os derivados LASSBio-1247 e LASSBio-1248 como promissores protótipos de fármacos com atividade anti-inflamatória e anti-hipernociceptiva, potencialmente úteis para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e dor inflamatória.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adibhatla, R. M.; Hatcher, J. F. **Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies.** BMB Reports, v. 41, n. 8, p. 560- 567, 2008.

Alexander, J. S.; Elrod, J. W. **Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation.** Journal of anatomy, v. 200, n. 6, p. 561- 574, 2002.

Barnes, P. J.; Adcock, I. M. **Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Diseases.** Lancet, v. 373, p. 1905- 1917, 2009.

Barnes, P. J. **Corticosteroids: The Drugs to Beat.** European Journal of Pharmacology, v. 533, p. 2-14, 2006.

Barnes, P. J. **How Corticosteroids Control Inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005.** British Journal of Pharmacology, v. 148, p. 245- 154, 2006b.

Barreiro, E. J. **A Química Medicinal e o Paradigma do Composto-protótipo.** Revista Virtual de Química, v. 1, n. 1, p. 26- 34, 2009.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **A Estratégia da Hibridação Molecular no Planejamento, Desenho e Modificação Molecular de Ligantes e Protótipos.** Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Porto Alegre: Artmed®, p. 368, 2008.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Aspectos Gerais da Ação dos Fármacos.** Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Porto Alegre: Artmed®, p. 26-27, 2008b.

Bell, C.; Abrams, J.; Nutt, D. **Tryptophan depletion and its implication psychiatry.** British Journal of psychiatry, v. 178, p. 399- 405, 2001.

Bertrand, V.; Guessous, F.; Roy, A. L.; Viossat, B.; Fessi, H.; Abbouyi, A. E.; Giroud, J.; Roch-Arveiller, M. **Cooper-Indomethacin Associated with Zwitterionic Phospholipids Prevents Enteropathy in Rats.** Digestive Disease and Sciences, v. 44, n. 5, p. 991- 999, 1999.

Bogatcheva, N. V.; Verin, A. D. **Reprint of “The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function” [Microvascular Research 76 (2008) 202–207].** *Microvascular Research*, v. 77, n. 1, p. 64–69, 2009.

Boueiz, A.; Hassoun, P. M. **Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species.** *Microvascular Research*, v. 77, n. 1, p. 26- 34, 2009.

Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. **Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.** *Science*, v. 303, p. 1532- 1535, 2004.

Burke, A.; Smyth, E.; FitzGerald, G. A. **Analgesicos-Antipiréticos; Farmacoterapia da Gota.** *As bases Farmacológicas da Terapêutica*, Mc Graw Hill, 11<sup>a</sup> ed., p. 610; 621, 2006.

Cannon, K. E.; Leurs, R.; Hough, L. B. **Activation of Peripheral and Spinal Histamine H<sub>3</sub> Receptors Inhibits Formalin-Induced Inflammation and Nociception, Respectively.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 88, n. 1, p. 122- 129, 2007.

Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D.L. **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 21, p. 13926- 13931, 2002.

Chandrasekharan, N. V.; Simmons, D.L. **The Cyclooxygenases.** *Genome Biology*, v. 5, n. 9, p. 241- 247, 2004.

Claudino, R. F.; Kassuya, C. A. L.; Ferreira, J.; Calixto, J. B. **Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E<sub>2</sub>-Induced Mouse Paw Edema.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 318, n. 2, p. 611- 618, 2006.

Cloëz-Tayarani, I.; Changeux, J. **Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, p. 599- 606, 2007.

Cole, H. W.; Brown, C. E.; Magee, D. E.; Magee, C.; Roudebush, R. E.; Bryant, H. U. **Serotonin-induced Paw Edema in the Rat: Pharmacological Profile.** *Gen. Pharmac.*, v. 26, n. 2, p. 431- 436, 1995.

Collier, H. O. J.; Dinneen, L. C.; Johnson, C. A.; Schneider, C. **The Abdominal Constriction Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse.** British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, v. 32, p. 295- 310, 1968.

Countax, A.; Adam, F.; Willer, J. C.; Le Bars, D. **Hyperalgesia and Allodynia: Peripheral Mechanisms.** Joint Bone Spine, v. 72, n. 5, p. 359- 371, 2005.

Cunha, A. C.; Tributino, J. L. M.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. **Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Antinociceptive N-substituted-Phenylimidazolyl-4-Acylhydrazone Derivatives.** Il Farmaco, v. 57, p. 999- 1007, 2002.

Cunha, T. M.; Verri Jr., W. A.; Schivo, I. R.; Napimoga, M. H.; Parada, C. A.; Poole, S.; Teixeira, M. M.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. **Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception.** Journal of Leukocyte Biology, v. 83, p. 824- 832, 2008.

D'Mello, R.; Dickenson, A. H. **Spinal Cord mechanisms of pain.** British Journal of Anaesthesia, v. 101, n. 1, p. 8- 16, 2008.

Dale, D. C.; Boxer, L.; Liles, W. C. **The Phagocytes: Neutrophils and Monocytes.** Blood, v. 112, n. 4, p. 935- 945, 2008.

Duarte, C. D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 7, n. 11, p. 1108- 1119, 2007.

Duarte, C. D.; Tributino, J. L. M.; Lacerda D. I.; Martins, M. V.; Alexandre-Moreira, M. S.; Dutra, F.; Bechara, E. J. H.; De-Paula, F. S.; Goulart, M. O. F.; Ferreira, J.; Calixto, J. B.; Nunes, M. P.; Bertho, A. L.; Miranda, A. L. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Synthesis, Pharmacological Evaluation and Electrochemical Studies of Novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone Derivates: Discovery of LASSBio-881, a New Ligand of Cannabinoid Receptors.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 15, p. 2421-2433, 2007b.

Dworkin, R. H. **An Overview of Neuropathic Pain: Syndromes, Symptoms, Signs, and Several Mechanisms.** The Clinical Journal of Pain, v. 18, p. 343- 349, 2002.

Esbenshade, T. A.; Fox, G. B.; Cowar, M. D. **Histamine H3 receptors antagonists: preclinical promise for treating obesity and cognitive disorders.** Molecular interventions, v. 6, n. 2, p. 77- 88, 2006.

Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. **Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystinin Antagonists.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 31, p. 2235- 2246, 1988.

Farooqui, A. A.; Ong, W.; Horrocks, L. A. **Inhibitors of Brain Phospholipase A2 Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders.** *Pharmacological Reviews*, v. 58, p. 591-620, 2006.

Ferreira, S. H. **A New Method for Measuring Variations of Rat Paw Volume.** *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 31, p. 648, 1979.

Fink, K. B.; Göthert, M. **5-HT Receptors Regulation of Neurotransmitter Release.** *Pharmacological Reviews*, v. 59, n. 4, p. 362- 417, 2007.

Folco, G.; Murphy, R. C. **Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses.** *Pharmacological Reviews*, v. 58, n. 3, p. 375- 388, 2006.

Foskett, J. K.; White, C.; Cheung, K.; Mak, D. D. **Inositol Trisphosphate Receptor  $Ca^{2+}$  Release Channels.** *Physiol Rev*, v. 87, p. 593- 658, 2007.

Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. **Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones: New Lead-Compounds of analgesic, Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 167- 198, 2006.

Furze, R. C.; Rankin, S. M. **Neutrophil Mobilization and Clearance in the Bone Marrow.** *Immunology*, v. 123, n. 3, p. 281- 288, 2008.

Gallily, R.; Yamin, A.; Waksman, Y.; Ovadia, H.; Weidenfeld, J.; Bar-Joseph, A.; Biegon, A.; Mechoulam, R.; Shohami, E. **Protection Against Septic Shock and Suppression of Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide Production by Dexanabinol (HU-211), a Nonpsychotropic Cannabinoid.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 283, p. 918- 924, 1997.

Garavito, R. M.; Malkowsky, M. G.; De Witt, D. L. **The Structures of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2.** *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v. 68- 69, p. 129- 152, 2002.



Garcia, J. G. N. **Concepts in microvascular endothelial barrier regulation in health and disease.** *Microvascular Research*, v. 77, n. 1, p. 1- 3, 2009.

Gershon, M. D.; Tack, J. **The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders.** *Gastroenterology*, v. 132, n. 1, p. 397- 414, 2007.

Gold, M. S.; Flake, N. M. **Inflammation-Mediated Hyperexcitability of Sensory Neurons.** *Neurosignals*, v. 14, n. 4, p. 147- 157, 2005.

Goulet, J. L.; Pace, A. J.; Key, M. L.; Byrum, R. S.; Nguyen, M.; Tilley, S. L.; Morham, S. G.; Langenbach, R.; Stock, J. L.; McNeish, J. D.; Smithies, O.; Coffman, T. M.; Koller, B. H. **E-Prostanoid-3 Receptors Mediate the Proinflammatory Actions of Prostaglandin E2 in Acute Cutaneous Inflammation.** *The Journal of Immunology*, v. 173, p. 1321- 1326, 2004.

Gray, A. M.; Spencer, P. S. J.; Sewell, R. D. E. **The Involvement Of The Opioidergic System In The Antinociceptive Mechanism Of Action Of Antidepressant Compounds.** *British Journal of Pharmacology*, v. 124, p. 669- 674, 1998.

Gutstein, H. B.; Akil, H. **Analgésicos Opióides.** . *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Mc Graw Hill, 11<sup>a</sup> ed., p. 491; 494-495, 2006.

Gutzmer, R.; Langer, K.; Lisewski, M.; Mommert, S.; Rieckborn, D.; Kapp, A.; Werfel, T. **Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells.** *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 109, n. 3, p. 524- 531, 2002.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Os Compartimentos dos Líquidos Corporais: Líquidos Extracelular e Intracelular; Líquido Intersticial e Edema.** *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara Koogan, 10<sup>a</sup> ed., p.261, 2000.

Gyermek, L. **Pharmacology of serotonin as related to anesthesia.** *Journal of Clinical Anesthesia*, v. 8, p. 402-425, 1996.

van Hinsbergh, V. W. M.; Amerongen, G. P. van N. **Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function.** *J. Anat.*, v. 200, p. 549- 560, 2002.

Huang, S. K.; Peters-Golden, M. **Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time?**. *Chest.*, v. 133, n. 6, p. 1442- 1450, 2008.

Ibi, M.; Matsuno, K.; Shiba, D.; Katsuyama, M.; Iwata, K.; Kakehi, T.; Nakagawa, T.; Sango, K.; Shirai, Y.; Yokoyama, T.; Kaneko, S.; Saito, N.; Yabe-Nishimura, C. **Reactive Oxygen Species Derived from NOX1/NADPH Oxidase Enhance Inflammatory Pain**. *The Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 38, p. 9486-9494, 2008.

Jones, R.; Rubin, G.; Berenbaum, F.; Scheiman, J. **Gastrointestinal and Cardiovascular Risks of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs**. *The American Journal of Medicine*, v. 121, p. 464- 474, 2008.

Joule, J. A.; Mills, K.; Smith, G. F. **Indoles: Reactions and Synthesis**. StanleyThomes, Cheltenham, p. 305, 1988.

Julius, D.; Basbaum, A. I. **Molecular Mechanisms of Nociception**. *Nature*, v. 413, p. 203- 210, 2001.

Jutkiewicz, E. M. **The Antidepressant-like Effects of Delta-Opioid Receptor Agonists**. *Molecular Interventions*, v.6, n. 3, p. 162- 169, 2006.

Kayser, V.; Elfassi, I. E.; Auel, B.; Melfort, M.; Julius, D.; Gingrich, J. A.; Hamon, M.; Bourgoin, S. **Mechanical, Thermal and Formalin-induced Nociception is Differentially Altered in 5-HT<sub>1A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>1B</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>3</sub><sup>-/-</sup> and 5-HT<sup>-/-</sup> Knock-out Male Mice**. *Pain*, v. 130, p. 235- 248, 2007.

Khodorova, A.; Montmayeur, J.; Strichartz, G. **Endothelin Receptors and Pain**. *The Journal of Pain*, V. 10, n.1, p. 4- 28, 2009.

Kidd, B. L.; Urban, L. A. **Mechanisms of Inflammatory Pain**. *British Journal of Anaesthesia*, v. 87, n. 1, p. 3- 11, 2001.

Kim, C.; Kim, J.; Kim, J. **Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species**. *BMB reports*, v. 41, n. 8, p. 555- 559, 2008.

Kim, S.; Jun, C.; Suk, K.; Choi, B.; Lim, H.; Park, S.; Lee, S. H.; Shin, H.; Kim, D.; Shink, T. **Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells**. *Toxicological Sciences*, v. 91, n. 1, p. 123- 131, 2006.

Klebanoff, S. J. **Myeloperoxidase: Friend and Foe**. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, p. 598- 625, 2005.

Kosaka, T.; Miyata, A.; Ihara, H.; Hara, S.; Sugimoto, T.; Takeda, O. Takahashi, E.; Tanabe, T. **Characterization of the Human Gene (PTGS2) Encoding Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2**. *European Journal of Biochemistry*, v. 221, p. 889-897, 1994.

Kramer, R. M.; Sharp, J. D. **Structure, function and regulation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)**. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 410, p. 49- 53, 1997.

Krouwels, F. H.; Hol, B. E. A.; Lutter, R.; Bruinier, B.; Bast, A.; Jansen, H. M.; Out, T. A. **Histamine Affects Interleukin-4, Interleukin-5, and Interferon- $\gamma$  production by human T cell clones from the airways and blood**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 18, p. 721- 730, 1998.

Kuraishi, Y.; Harada, S.; Aratani, M.; Satoh, H. T. **Separate Involvement of the Spinal Noradrenergic and Serotonergic Systems in Morphine Analgesia: the Differences in Mechanical and Thermal Algesic Tests**. *Brain Research*, v. 273, p. 245- 252, 1983.

Lacerda, Daniel. **Avaliação Farmacológica de Novos Derivados 6-Nitro-Benzodioxola-N-Acildrazônicos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antinociceptivos e Anti-inflamatórios**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) — Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Lavich, T. R.; Cordeiro, R. S. B.; Silva, P. M. R.; Martins, M. A. **A Novel Hot-plate Test Sensitive to hyperalgesic Stimuli and Non-opioid Analgesic**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 445- 451, 2005.

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

Lawson, S. N. **Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A $\delta$ - or A $\alpha$ /  $\beta$ -fibres**. *Experimental Physiology*, v. 87, n. 2, p. 239-244, 2002.

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S. W. **Animal Models of Nociception**. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, p. 597- 652, 2001.

Li, S.; Dou, W.; Tang, Y.; Goorha, S.; Ballou, L. R.; Blatteis, C. M. **Acetaminophen: Antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant.** Prostaglandins & other Lipid Mediators, v. 85, p. 89–99, 2008.

Lima, L. M. **Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira.** Química Nova, v. 30, n. 6, p. 1456- 1468, 2007.

Lima, L. M.; Barreiro, E. J. **Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design.** Current Medicinal Chemistry, v. 12, p. 23- 49, 2005.

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, n. 1, p. 35- 48, 2009.

Linder, A. E.; Ni, W.; Diaz, J. L.; Szasz, T.; Burnett, R.; Watts, S. W. **Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain.** The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 323, n. 2, p. 415- 421, 2007.

Majno, G.; Palade, G. E. **Studies on Inflammation: I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study.** The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, v. 11, p. 571- 596, 1961.

Mantyh, P. W.; Clohisy, D. R.; Koltzenburg, M.; Hunt, S. P. **Molecular Mechanisms of Cancer Pain.** Nature Reviews Cancer, v. 2, p. 201- 209, 2002.

Meves, H. **The Action of Prostaglandins on Ion Channels.** Current Neuropharmacology, v. 4, p. 41- 57, 2006.

Miller, S. B. **Prostaglandins in Health and Disease: An Overview.** Seminars in Arthritis and Rheumatism, v. 36, n.1, p. 37- 49, 2006.

Michel, C. C.; Curry, F. E. **Microvascular Permeability.** Physiological Reviews, v. 79, n. 3, p. 703- 761, 1999.

Morita, I. **Distinct Functions of COX-1 and COX-2.** Prostaglandins & other Lipid Mediators, v. 68- 69, p. 165-175, 2002.

Morrow, J. D.; Roberts, L. J. **Eicosanóides e Fator de Ativação Plaquetária.** As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Mc Graw Hill, 10ª ed., p. 506, 2001.

Nichols, D. E.; Nichols, C. D. **Serotonin receptors**. Chemical Reviews, v. 108, n. 5, p. 1614- 1641, 2008.

Ohtsu, H. **Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: The Role of Histamine in Immunological and Cardiovascular Disease and the Transporting System of Histamine in the Cell**. Journal of Pharmacological Sciences, v. 106, p. 347- 353, 2008.

Passik, S. D. **Issues in Long-term Opioid Therapy: Unmet Needs, Risks, and Solutions**. Mayo Clinic Proceeds, v. 84, n. 7, p. 593- 601, 2009.

Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A. Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino, G. **Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression**. British Journal of Pharmacology, v. 142, p. 331- 338, 2004.

Rajakariar, R.; Yaqoob, M. M.; Gilroy, D. W. **COX-2 in Inflammation and Resolution**. Molecular Interventions, v. 6, n. 4, p. 199- 207, 2006.

Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. **Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond**. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical science, v. 11, n. 2, p. 81s- 110s, 2008.

Ribeiro, R. A.; Vale, M. L.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. **Analgesic Effect of Thalidomide on Inflammatory Pain**. European Journal of Pharmacology, v. 391, p. 97- 103, 2000.

Rocha, A. C. C.; Fernandes, E. S.; Quintão, N. L. M.; Campos, M. M.; Calixto, J. B. **Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carragenin in the mouse paw**. British Journal of Pharmacology, v. 148, p. 688- 695, 2006.

Rolin, S.; Masereel, B.; Dogné, J. **Prostanoids as Pharmacological Targets in COPD and Asthma**. European Journal of Pharmacology, v. 533, p. 89- 100, 2006.

de Sá Alves, F. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a "Privileged Structure"**. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 9, n. 7, p. 782- 793, 2009.

Sánchez, T.; Moreno, J. J. **Role of Leukocyte Influx in Tissue Prostaglandin H Synthase-2 Overexpression Induced by Phorbol Ester and Arachidonic Acid in Skin.** *Biochemical Pharmacology*, v. 58, n. 5, p. 877- 879, 1999.

Sander, K.; Kottke, T.; Stark, R. **Histamine H3 Receptor Antagonists Go to Clinics.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 12, p. 2163- 2181, 2008.

Sasaguri, Y.; Tanimoto, A. **Role of macrophage-derived histamine in atherosclerosis- Chronic participation in inflammatory response-.** *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, v. 11, n. 3, p. 122-130, 2004.

Sasaki, M.; Obata, H.; Shigeru, S.; Goto, F. **Antinociception with Intrathecal  $\alpha$ -Methyl-5-Hydroxytryptamine, a 5-Hydroxytryptamine<sub>2A/2C</sub> Receptor Agonist in Two Rat Models of Sustained Pain.** *Anaesth. Analg.*, v. 96, p. 1072- 1078, 2003.

Schaeffer, L. **The Role of Functional Groups in Drug-Receptor Interactions.** *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., p. 468, 2008.

Schlansky, B.; Hwang, J. H. **Prevention of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs-induced Gastropathy.** *Journal of Gastroenterology*, v. 44, suppl. 19, p. 44-52, 2009.

Schnur, D. M.; Hermsmeier, M. A.; Tebben, A. J. **Are Target-Family-Privileged Substructures Truly Privileged?** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 2000-2009, 2006.

Scholz, J.; Woolf, C. J. **Can We Conquer Pain?.** *Nature Neuroscience Supplement*, v. 5, suppl p. 1062- 1067, 2002.

Schwab, J. M.; Schluesener, H. J.; Meyermann, R.; Serhan, C. N. **COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 69, p. 339–343, 2003.

Serhan, C. N.; Ching, N.; Dyke, T. E. V. **Resolving Inflammation: Dual Anti-inflammatory and Pro-resolution Lipid Mediators.** *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 349- 361, 2008.

Silva, B.; Duarte C. de M.; Alexandre Moreira, M. S.; Fraga C. A. M.; Barreiro E. J.; Miranda, A. L. P.; **Abstracts of the XXXIV Brazilian Congress of Pharmacology and Experimentals Therapeutics**, 04.093, Águas de Lindóia, SP, 2002.

Simons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T. **Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition**. *Pharmacological Reviews*, v. 56, n. 3, p. 387- 437, 2004.

Sippl, W. **Pharmacophore Identification and Pseudo-Receptor Modeling**. *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., p. 572, 2008.

Skidgel, R. A.; Erdös, E. G. **Histamina, bradicinina e seus antagonistas**. *As bases farmacológicas da terapêutica*, McGraw-Hill, 11<sup>a</sup> ed., p. 563, 2006.

Smith, W. L.; Murphy, R. C. **The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoygenase, and epoxygenase pathways**. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5<sup>a</sup> ed., cap. 12, p. 332- 361, 2008.

Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. **CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology**. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 69, p. 145–82, 2000.

Smyth, E. M.; Burke, A.; FitzGerald, G. A. **Autacóides Derivados de Lipídios: Eicosanóides e Fator de Ativação das Plaquetas**. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Mc Graw Hill, 11<sup>a</sup> ed., p. 596, 2006.

Smyth, E. M.; Burke, A.; FitzGerald, G. A. **Autacóides Derivados de Lipídios: Eicosanóides e Fator de Ativação das Plaquetas**. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Mc Graw Hill, 11<sup>a</sup> ed., p. 593, 2006b.

Soga, N. K. F., Nara, T., Tamagawa-Mineoka, R.; Nin, M.; Kotani, H.; Masuda, K.; Kishimoto, S. **Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells**. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 146, p. 354- 361, 2006.

Surapisitchat, J.; Jeon, K.; Yan, C.; Beavo, J. A. **Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3**. *Circulation Research* October, v. 12, p. 811- 818, 2007.

Tabas, I. **Lipids and atherosclerosis**. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5<sup>a</sup> ed., cap. 21, p. 579- 605, 2008.

Tatulian, S. A. **Structural Effects of Covalent Inhibition of Phospholipase A2 Suggest Allosteric Coupling between Membrane Binding and Catalytic Sites**. *Biophysical Journal*, v. 84, p. 1773- 1783, 2003;

Tiruppathi, C.; Richard D. Minshall, R. D.; Paria, B. C.; Vogel, S. M.; Malik, A. B. **Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability.** *Vascular Pharmacology*, v. 39, p. 173– 185, 2003.

Trescot, A. M.; Datta, S.; Lee, M.; Hansen, H. **Opioid Pharmacology.** *Pain Physician*, v. 11, n. 2S, p. S133- S153.

Tributino, J. L. M.; Duarte, C. D.; Corrêa, R. S.; Doriguetto, A. C.; Ellena, J.; Romeiro, N. C.; Castro, N. G.; Miranda, A. N. P.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Novel 6-Methanesulfonamide-3,4-Methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally Effective Anti-inflammatory Drug Candidates.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 1125- 1131, 2009.

Tributino, Jorge. **Avaliação do Perfil Farmacológico de Novos Derivados N-Acildrazônicos Imidazólicos e Triazólicos.** 2002. 148 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)—Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

Vannier, E., Miller, L. C.; Dinarello, C. A. **Histamine Suppresses Gene Expression and Synthesis of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  via Histamine H<sub>2</sub> Receptors.** *The Journal of experimental medicine*, v. 174, p. 281- 284, 1991.

Verry, W. A. Jr.; Cunha, T. M.; Parada, C. A.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. **Hypernociceptive Role of Cytokines and Chemoamines: Targets for Analgesic Drug Development?.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 116- 138, 2006.

Wallace, J. L.; McKnight, W.; Reuter, B. K.; Vergnolle, N. **NSAID-Induced Gastric Damage in Rats: requirement for Inhibition of Both Cyclooxygenase 1 and 2.** *Gastroenterology*, v. 119, p. 706- 714, 2000.

Wermuth, C. G. **Molecular Variations in Homologous Series: Vinylogues and Benzologues.** *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., p. 275-282, 2008.

Wilton, D. C. **Phospholipases.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5<sup>a</sup> ed., cap. 11, p. 306- 307, 2008.

Wymann, M.; Schneider, R. **Lipid Signalling in Disease.** *Nature Reviews*, v. 9, p. 162- 176, 2008.



Xie, W.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. **Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 88, p. 2692- 2696, 1991.

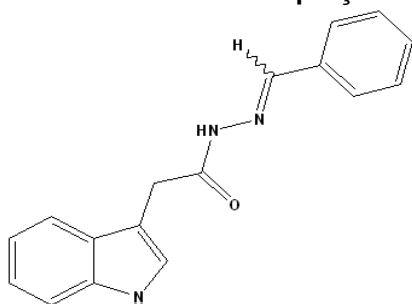
Yatsunami, K.; Hiroshi Ohtsuguf, H.; Tsuchikawal, M.; Hiechi, T.; Ishibashi, K.; Shidall, A.; Shimall, Y.; Nakagawall, S.; Yamauchi, K.; Yamamoto, M.; Hayashill, N.; Watanabellgg, T.; Ichikawall, A. **Structure of the L-Histidine Decarboxylase Gene.** The Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 2, p. 1554- 1559, 1994.

Yoshimura, M.; Furue, H. **Mechanisms for the Anti-nociceptive Actions of the Descending Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Spinal Cord.** Journal of Pharmacological Sciences, v. 101, p. 107- 117, 2006.

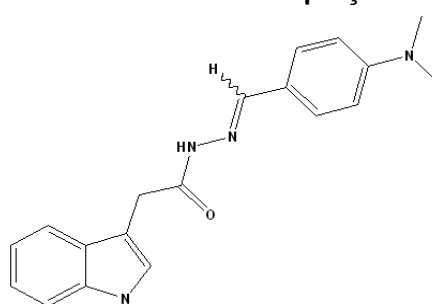
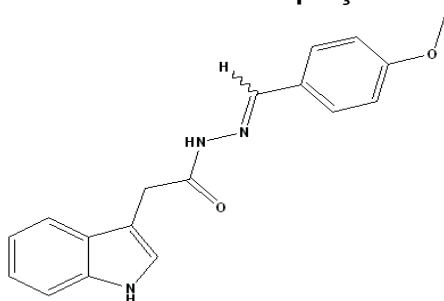
Zhang, Y.; Ramos, B. F.; Jakschik, B. A. **Neutrophil Recruitment by Tumor Necrosis Factor from Mast Cells in Immune Complex Peritonitis.** Science, v. 258, p. 1957- 1959, 1992.

## ANEXO I

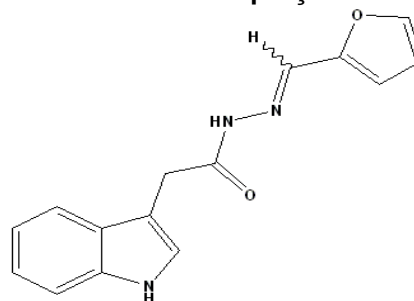
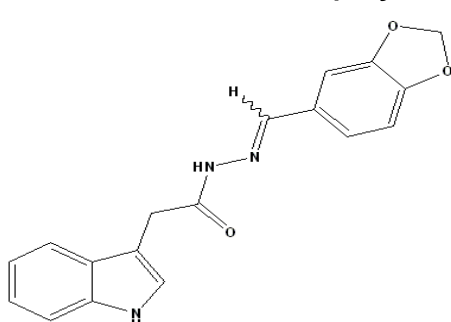
## SÉRIE C2

LASSBio-1163 Proporção *E/Z*: 57/43*N*-(fenilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazida

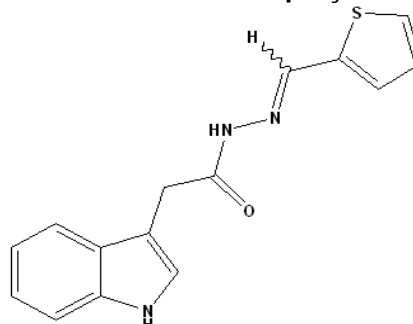
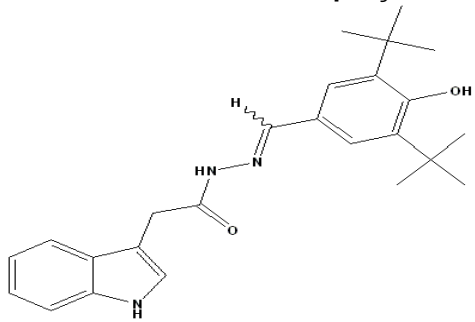
LASSBio-1164

Proporção *E/Z*: 56/44*N*-(4-dimetilaminofenilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazidaLASSBio-1165 Proporção *E/Z*: 51/49*N*-(4-metoxifenilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazida

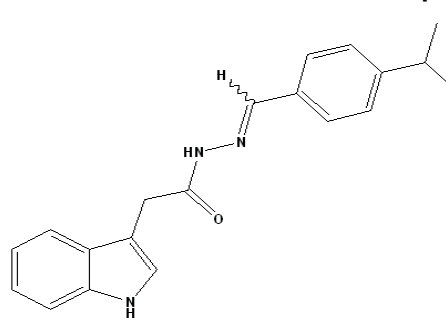
LASSBio-1166

Proporção *E/Z*: 54/46*N*-(2-furilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazidaLASSBio-1167 Proporção *E/Z*: 59/41*N*-(1,3-benzodioxometilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazida

LASSBio-1168

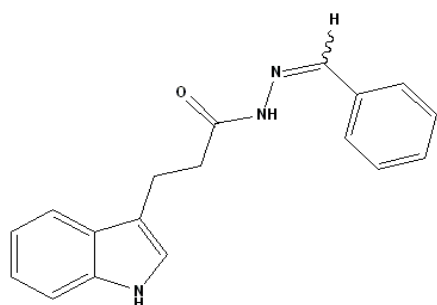
Proporção *E/Z*: 55/45*N*-(2-tienilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazidaLASSBio-1169 Proporção *E/Z*: 57/43*N*-(3,5-ditertbutil-4-hidroxifenilmetilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazida

LASSBio-1291

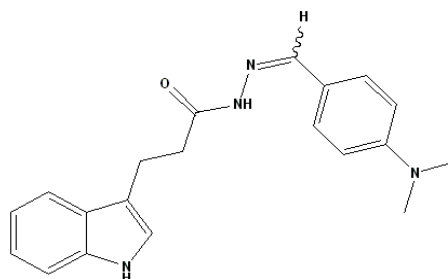
Proporção *E/Z*: 58/42*N*-(4-isopropilbenzilideno)-2-(1*H*-3-indolil) acetoidrazida

## SÉRIE C3

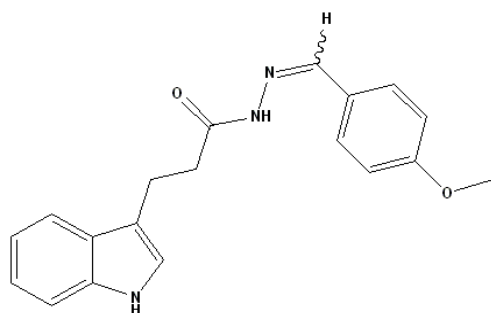
LASSBio-1245

Proporção *E/Z*: 57/43*N*-fenilmetilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

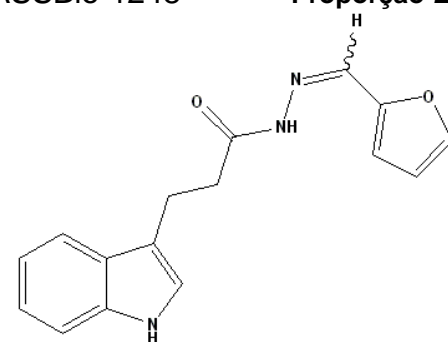
LASSBio-1246

Proporção *E/Z*: 54/46*N*-(4-dimetilaminofenil)metilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

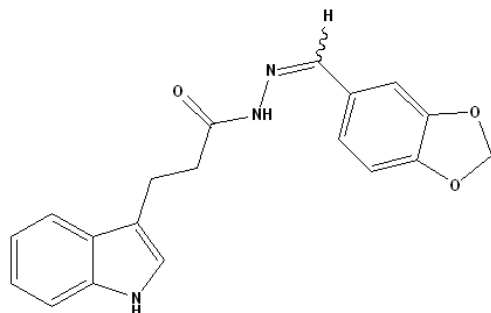
LASSBio-1247

Proporção *E/Z*: 59/41*N*-(4-metoxifenil)metilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

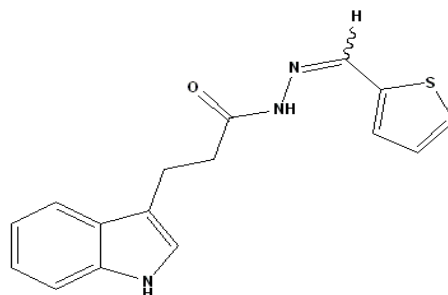
LASSBio-1248

Proporção *E/Z*: 58/42*N*-(2-furil)metilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

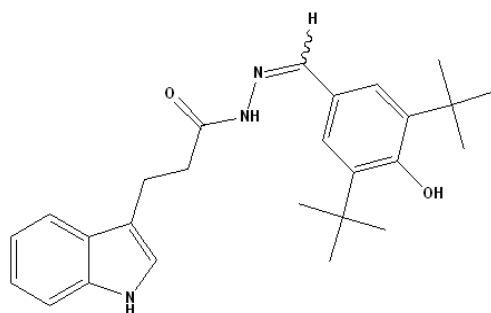
LASSBio-1249

Proporção *E/Z*: 58/42*N*-(1,3-benzodioxolametilideno)-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

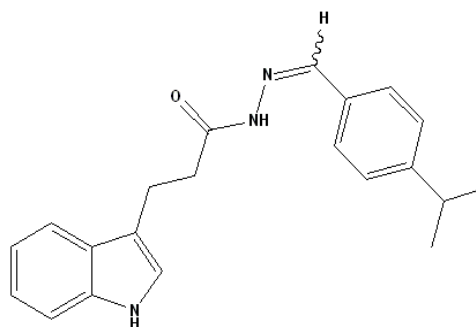
LASSBio-1250

Proporção *E/Z*: 50/50*N*-(2-tienil)metilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

LASSBio-1251

Proporção *E/Z*: 54/46*N*-(3,5-ditercbutil-4-hidroxi)fenilmetilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

LASSBio-1292

Proporção *E/Z*: 62/38*N*-(4-isopropil)benzilideno-3-(1*H*-3-indolil) propanoimidazida

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)