

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO HÍBRIDO: CIS-(±)-ACETATO DE 4-CLORO-6-(NAFTALENO-1-IL)-TETRAIDRO-2H-PIRANO-2-IL)METIL 2-(2-(2,6-DICLOROFENILAMINO) FENILA

Gabriela Mastrangelo Gonçalves

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO HÍBRIDO: CIS-(±)-ACETATO DE 4-
CLORO-6-(NAFTALENO-1-IL)-TETRAIDRO-2H-PIRANO-2-IL)METIL 2-(2-(2,6-
DICLOROFENILAMINO) FENILA**

GABRIELA MASTRANGELO GONÇALVES

Sob a orientação do Professor

Bruno Guimarães Marinho

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em Ciências
Fisiológicas, no Curso de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em
Farmacologia

Seropédica, RJ
Outubro de 2020

M394a Mastrangelo, Gabriela, 1989-
Avaliação farmacológica das atividades
antinociceptiva e anti-inflamatória do composto
híbrido: cis-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-Il)
tetraidro-2h-pirano-2-Il) metil 2-(2-(2,6
diclorofenilamino) fenila / Gabriela Mastrangelo. -
Caraguatatuba, 2020.
133 f.: il.

Orientador: Bruno Guimarães Marinho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Ciências Fisiológicas, 2020.

1. Nocicepção. 2. Sistema opioide. 3. Inflamação. I.
Guimarães Marinho, Bruno , 1978-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Ciências Fisiológicas III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TERMO Nº 297/2020 - PPGCF (12.28.01.00.00.00.52)

Nº do Protocolo: 23083.051878/2020-98

Seropédica-RJ, 07 de outubro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

GABRIELA MASTRANGELO GONÇALVES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 02/10/2020

Membros da Banca:

Prof Dr Bruno Guimarães Marinho (Membro Interno, Orientador - UFRRJ)

Prof Dr David do Carmo Malvar (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento - (Membro Externo, UNIFAL)

Prof Dr Giovane Galdino de Souza (Membro Externo - UNIFAL)

**(Assinado digitalmente em 07/10/2020
14:22)**

BRUNO GUIMARAES MARINHO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: 1674073

**(Assinado digitalmente em 07/10/2020
15:36)**

WELLINGTON DA SILVA CORTES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: 386960

**(Assinado digitalmente em 07/10/2020
15:13)**

DAVID DO CARMO MALVAR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: 3000663

**(Assinado digitalmente em 08/10/2020
16:22)**

GIOVANE GALDINO DE SOUZA

ASSINANTE EXTERNO
CPF: 047.470.956-67

(Assinado digitalmente em 07/10/2020 15:48)

CARLOS GIOVANI DE OLIVEIRA NASCIMENTO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 075.114.657-90

Para verificar a autenticidade deste documento entre
em

<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp>

informando seu número: **297**, ano: **2020**, tipo:
TERMO, data de emissão: **07/10/2020** e o código de
verificação: **d187cdb0d6**

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

Aos meus pais que desde sempre lutaram para me dar a melhor educação possível, que me incentivaram e me ajudaram demais nesta longa jornada de estudos. E também a todos os meus familiares que me apoiaram até aqui.

Aos meus amigos, por acreditarem no meu potencial e estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins.

Ao meu orientador, Bruno Guimarães Marinho. Ao longo desta última década, contribuiu enormemente na minha formação como pesquisadora e como pessoa. Expresso aqui toda minha gratidão por todos os ensinamentos, as conversas, as risadas, as lições de vida, por tudo! Obrigada por cruzar o meu caminho nesta vida.

Agradeço a todos os professores, pois acredito que a educação é um dos pilares mais importantes para se obter conhecimento e é responsável por nos tornarmos seres humanos melhores em todos os sentidos.

Obrigada a todos os colegas de laboratório que participaram dos experimentos, contribuindo de forma extremamente importante para dar vida a esta tese e esclarecer o máximo de questionamentos que surge ao longo deste processo.

Quero dedicar também esta tese a todos os pesquisadores e cientistas, pois sei que o caminho é longo e árduo, mas acredito que estamos em busca de um mundo com mais esperança e mais justo. A ciência é capaz de realizar grandes transformações positivas e deve ser enaltecida sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria também de deixar um agradecimento a mim mesma! Muitas vezes duvidei que eu fosse capaz, sentindo muito medo e insegurança, mas hoje me orgulho muito dessa conquista de me tornar Doutora.

RESUMO

GONÇALVES, Gabriela Mastrangelo. **Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto híbrido cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila**. 2020. 136p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas, Farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A hibridação molecular é uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz de arquitetar racionalmente novos compostos que podem apresentar sinergismo e terapia de dupla ação farmacológica ou modulação de efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de um novo composto híbrido: cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS19), obtido através da hibridização do composto [(\pm)-(2,4,6-Cis)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il] metanol (CAPIM e cols., 2012) com o anti-inflamatório não-esteroidal diclofenaco de sódio. O composto LS19 foi administrado por via oral em todos os modelos animais e de acordo com os resultados, possui atividade contra a nocicepção aguda observada nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina e imersão da cauda em água quente. O mecanismo de ação do composto envolve o sistema opioide, já que antagonistas seletivos opioides foram capazes de reduzir o efeito antinociceptivo. A via NO/cGMP/K_{ATP} também interfere na atividade farmacológica do composto devido a diminuição do efeito antinociceptivo com a administração prévia de L-NAME, ODQ e glibenclamida. A administração prévia de atropina reverteu a antinocicepção, sugerindo a participação do sistema colinérgico na atividade do composto LS19. Possivelmente há envolvimento de receptores TRPV1 neuronais e não-neuronais no mecanismo de ação do composto, pois no teste de nocicepção induzido por capsaicina, o LS19 inibiu o tempo de lambadura e foi capaz de diminuir tanto a hiperalgesia quanto a concentração de citocinas pró-inflamatórias induzidas por capsaicina. A atividade antinociceptiva do composto não está relacionada a um déficit motor, de acordo com dados obtidos no teste de rotarod. Em relação a atividade anti-inflamatória, o composto LS19 demonstrou um efeito anti-edematogênico, foi capaz de reduzir a migração leucocitária e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e aumentar a síntese da IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Na avaliação *in vitro* de atividade COX, o LS19 demonstrou maior, porém discreta, seletividade para COX-2. No ensaio toxicológico realizado, o composto não provocou alterações agudas e subcrônicas, tanto a nível macro quanto microscópico. Conclui-se então que o composto LS19 apresenta atividade antinociceptiva através de sua ação sobre as vias colinérgica e NO/cGMP/K_{ATP}, além de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva induzida por ação sobre a via vanilóide e citocinas.

Palavras-chave: nocicepção, sistema opioide, inflamação.

ABSTRACT

GONÇALVES, Gabriela Mastrangelo. **Antinociceptive and anti-inflammatory profile of hybrid compound: 4-chloro-6- (naphthalen-1-yl) -tetrahydro-2H-pyran-2-yl cis - (±) methyl 2- (2- (2,6-dichlorophenylamino) phenyl)** 2020. 136p. Thesis (Doctorate of Physiological Sciences, Pharmacology). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Molecular hybridization is a classic strategy of conjugating structures of distinct bioactive compounds in a single molecule, being an effective alternative to rationally architect new compounds that may present synergism and double pharmacological action therapy or modulation of adverse effects. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activity of a new hybrid compound: cis - (±) - 4-chloro-6- (naphthalene-1-yl) -tetrahydro-2H-pyran-2-yl) methyl 2- (2- (2,6-dichlorophenylamino) phenyl (LS19), obtained by hybridizing the compound [(±) - (2,4,6-cis) -4-chloro-6- (naphthalene-1 -il) -tetrahydro-2H-pyran-2-yl] methanol (CAPIM et al., 2012) with the non-steroidal anti-inflammatory drug sodium diclofenac. The compound LS19 was administered orally in all animal models and according to the results, it has activity against the acute nociception observed in the models of abdominal contortions induced by acetic acid, formalin test and immersion of the tail in hot water. The mechanism of action of the compound involves the opioid system, since selective opioid antagonists were able to reduce the antinociceptive effect. The NO/cGMP/KATP pathway also interferes in the pharmacological activity of the compound due to the decrease of the antinociceptive effect with the previous administration of L-NAME, ODQ and glibenclamide. The previous administration of atropine reversed antinociception, suggesting the participation of the cholinergic system in the activity of the compound LS19. Possibly there is involvement of neuronal and non-neuronal TRPV1 receptors in the mechanism of action of the compound, as in the nociception test induced by capsaicin, LS19 inhibited the licking time and was able to decrease both hyperalgesia and the concentration of pro-inflammatory cytokines induced by capsaicin. The antinociceptive activity of the compound is not related to a motor deficit, according to data obtained in the rotarod test. In relation to anti-inflammatory activity, the compound LS19 demonstrated an anti-edematogenic effect, was able to reduce leukocyte migration and the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and increase the synthesis of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. In the *in vitro* assessment of COX activity, LS19 demonstrated greater, but discrete, selectivity for COX-2. In the toxicological test carried out, the compound did not cause acute and subchronic changes, both at the macro and microscopic level. It is concluded that the compound LS19 has antinociceptive activity through its action on the cholinergic and NO / cGMP / KATP pathways, in addition to anti-inflammatory and antinociceptive activity induced by action on the vanilloid pathway and cytokines.

Keywords: nociception, opioid system, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias ascendentes da dor.....	7
Figura 2 – Via descendente da dor.....	8
Figura 3 – Ativação e migração de leucócitos.....	10
Figura 4 – Representação do comportamento celular e vascular durante e após os dois tipos de inflamação (aguda e crônica).....	12
Figura 5 – Ação das citocinas nas fases indutora e efetora da ativação linfocitária.....	14
Figura 6 – Cascata do ácido araquidônico e seus metabólitos.....	18
Figura 7 – Mecanismo de ação dos opiáceos na produção de analgesia.....	24
Figura 8 – Membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs) e suas moléculas ativadoras.....	28
Figura 9 – Morfina ativando a via NO-GMPc.....	32
Figura 10 – Efeitos do NO no processo inflamatório.....	33
Figura 11 – Estrutura química do composto cis-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila.....	37
Figura 12 – Protocolo do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	43
Figura 13 – Protocolo do modelo da formalina.....	44
Figura 14 – Protocolo do modelo de imersão da cauda em água quente.....	45
Figura 15 – Protocolo do modelo de nocicepção induzida por capsaicina.....	46
Figura 16 – Protocolo de placa quente e quantificação de citocinas induzida por capsaicina.....	47
Figura 17 – Protocolo do teste de Rotarod.....	47
Figura 18 – Protocolo do modelo de edema de pata.....	48
Figura 19 – Protocolo do modelo de bolsa de ar subcutânea.....	49
Figura 20 – protocolo da avaliação toxicológica sub-crônica.....	51
Figura 21 – Efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	52
Figura 22 – Curvas dose-resposta do Diclofenaco (A), do composto [(±)-(2,4,6-Cis)-4-cloro-6-(Naftaleno-1-il)-Tetrahidro-2H-Pirano-2-il]Metanol (CTHP - B) e do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-	

(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 - C), no modelo contorções abdominais induzidas por ácido acético, e cálculo de DI50.....	54
Figura 23 – Efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de formalina.....	55
Figura 24 – Efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 - 10, 100 e 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	57
Figura 25 – Influência da administração prévia de naloxona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	59
Figura 26 – Influência da administração prévia de antagonistas seletivos opióides (metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	61
Figura 27 – Influência da administração prévia de L-NAME sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	63
Figura 28 – Influência da administração prévia de ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	65
Figura 29 – Influência da administração prévia de glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	67
Figura 30 – Influência da administração prévia de atropina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	69
Figura 31 – Avaliação do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no modelo de nocicepção induzida por capsaicina e no modelo de placa quente, além da quantificação de citocinas.....	71
Figura 32 – Avaliação do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no teste de rotarod.....	73

Figura 33 – Avaliação do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no modelo de edema de pata.....	74
Figura 34 – Efeito do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de leucócitos totais a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	76
Figura 35 – Efeito do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de citocinas (A-IL-1 β , B- TNF- α , C- IL-6 e D- IFN- γ) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	78
Figura 36 – Efeito do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de citocinas e óxido nítrico (A-IL-10, B- IL-4 e C- NO) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	80
Figura 37 – Efeito de concentrações crescentes cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	82
Figura 38 – Análise microscópica dos órgãos.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acetico.....	53
Tabela 2 – Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina.....	56
Tabela 3 – Tempos de latência, em segundos, no modelo de retirada de cauda.....	58
Tabela 4 – Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	60
Tabela 5 – Avaliação da influência da administração prévia de metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	62
Tabela 6 – Avaliação da influência da administração prévia de L-NAME sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	64
Tabela 7 – Avaliação da influência da administração prévia de ODQ sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	66
Tabela 8 – Avaliação da influência da administração prévia de Glibenclamida sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	68
Tabela 9 – Avaliação da influência da administração prévia de Atropina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.....	70
Tabela 10 – Avaliação o tempo de lambedura e quantificação de citocinas no modelo de capsaicina.....	71
Tabela 11 – Avaliação no modelo de rotarod.....	73
Tabela 12 – Avaliação no modelo de edema de pata.....	75
Tabela 13 – Quantificação do número de leucócitos totais no modelo de bolha de ar subcutâneo.....	77
Tabela 14 – Quantificação de citocinas no modelo de bolsa de ar subcutâneo.....	79
Tabela 15 – Quantificação de citocinas e óxido nítrico no modelo de bolha de ar subcutâneo.....	81
Tabela 16 – Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoenensaio enzimático.....	82
Tabela 17 – Avaliação toxicológica sub-crônica com análise do peso corporal e consumo de ração.....	84
Tabela 18 – Análise macroscópica e peso dos órgãos.....	84

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

A: amígdala
Acetil-CoA: acetil coenzima-A
ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterase
AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais
A δ : fibra nervosa do tipo A-delta
5HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)
5HT1A: receptor de 5-hidroxitriptamina 1A
5HT2: receptor de 5-hidroxitriptamina 2
5HT3: receptor de 5-hidroxitriptamina 3
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANO1: anoctamina 1
ANOVA: análise de Variância
APC: células apresentadoras de antígenos
ASC: rea sob a curva
ATP: adenosina trifosfato
Atro: atropina
BChE: butirilcolinesterase
C: fibra nervosa do tipo C
Ca⁺⁺: cálcio
Cl: cloro
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChAT: colina acetiltransferase
CI: córtex insular
CI50: concentração inibitória 50%
cm: centímetro
COX: cicloxigenase
COX-1: cicloxigenase 1
COX-2: cicloxigenase 2
CTHP: composto (\pm)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol
DI50: dose inibitória 50%
DRG: gânglios da raiz dorsal
EPM: erro padrão da mdia
e-NOS: xido nítrico sintase endotelial
g: gramas
GABA: cido gama-aminobutírico
GDP: guanosina difosfato
Gi: proteína G inibitória
GIRK: canal retificador interno dependente de proteína G
GLI: glibenclamida
GMPc: guanosina mono-fosfato cíclico
GTP: guanosina trifosfato
H: hipotálamo
HE: hematoxilina eosina
HETE: hidroxi-ácidos graxos

HPETEs: ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenoicos
IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ : interferon gama
IS: índice de seletividade
IgG1: imunoglobulina G1
IgE: imunoglobulina E
IL-1: interleucina 1
IL-1 β : interleucina 1-beta
IL-4: interleucina 4
IL-5: interleucina 5
IL-6: interleucina 6
IL-8: interleucina 8
IL-10: interleucina 10
IL-12: interleucina 12
IL-13: interleucina 13
i-NOS: óxido nítrico sintase induzida
i,p: intraperitoneal
IS: índice de seletividade
K⁺: potássio
KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico
L-NAME: N-nitro-arginina-L-metil éster
LPS: lipopolissacarídeo
LT: leucotrienos
LTB₄: leucotrieno B₄
LTC₄: leucotrieno C₄
LTD₄: leucotrieno D₄
LS19: composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila
LX: lipoxina
mAChRs: receptores muscarínicos
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
m/s: metros por segundo
mg/kg: miligrama por quilo
mg: miligrama
min: minuto(s)
mL/kg: mililitro por quilo
mL: mililitros
mM: milimol
MN: metilnaltrexona
N: naloxona
Na₂PO₄: fosfato dissódico
NaCl: cloreto de sódio
nAChRs: receptores nicotínicos
NAL: naltrindol
NF- κ B: fator nuclear κ B
NGF: fator de crescimento do nervo
ng/mL: nanograma por mililitro
NK: células natural killer

NKT: linfócitos natural killer T
NMDA: N-metil-D-aspartato
n-NOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOR: nor-binaltorfimina
NOS: óxido nítrico sintase
NRM: núcleo magno da rafe
NTS: núcleo do trato solitário
ODQ: 1H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalina-1-ona
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAF: fator de ativação plaquetário
PAG: região periaquedutal cinza
P2X3: subtipo de receptor purinérgico específico
PD: pata direita
PE: pata esquerda
PENK: proencefalina
pg/mL: picograma por mililitro
PGD2: prostaglandina D2
PGE2: prostaglandina E2
PGF2: prostaglandina F2
PGG2: prostaglandina G2
PGH2: prostaglandina H2
PGI2: prostaciclina
PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA: proteína quinase A
PKC: proteína quinase C
PKG: proteína quinase dependente de GMPc
PLC: fosfolipase C
PMNs: leucócitos do tipo polimorfonucleares
POMC: proopiomelanocortina
PP3: calcineurina
rpm: rotações por minuto
RVM: medula rostroventral
s: segundos
s.c: subcutâneo
SBED: Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
SBP: substância branca periaquedutal
SG: substância gelatinosa
TGF β : fator de transformação do crescimento beta
TL: tempos de latência
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TNFR1 - receptor 1 do fator de necrose tumoral-alfa
TNFR2 - receptor 2 do fator de necrose tumoral-alfa
TR: tempo de reação
TRPs: receptores de potencial transitório
TRPA1: receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPC: receptor de potencial transitório canônico
TRPM: receptor de potencial transitório melastatina
TRPML: receptor de potencial transitório mucolipina

TRPP: receptor de potencial transitório policistina

TRPV1: receptor vanilóide tipo 1

TXA2: tromboxano A2

UI: unidade internacional

V: veículo

v/v: volume por volume

vo: via oral

μ: receptor opioide μ

μL: microlitros

μmol: micromol

μmol/kg: micromol por quilograma

δ: receptor opioide δ

κ: receptor opioide κ

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Nocicepção e dor	3
2.2	Inflamação.....	9
2.2.1	Processo inflamatório	9
2.2.2	Citocinas	12
2.2.3	Mediadores inflamatórios lipídicos	18
2.3	Sistema opioide	22
2.4	Receptores de potencial transitório – TRPs	28
2.5	Óxido nítrico	31
2.6	Sistema colinérgico	36
2.7	Origem do composto cis-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS19).....	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivos Gerais.....	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Animais	40
4.2	Tratamentos	41
4.3	Modelos experimentais.....	43
4.3.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	43
4.3.2	Teste da formalina	44
4.3.3	Modelo de imersão da cauda em água quente.....	45
4.3.4	Modelo de nocicepção induzida por capsaicina	46
4.3.5	Modelo de placa quente	46
4.3.6	Teste de Rotarod.....	47
4.3.7	Modelo de edema de pata	48

4.3.8 Modelo da bolsa de ar subcutâneo.....	49
4.3.9. Quantificação de mediadores inflamatórios	50
4.3.10. Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	50
4.3.11. Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica	51
4.4 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS	52
5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	53
5.2 Teste da formalina.....	55
5.3 Modelo de imersão da cauda em água quente.....	57
5.3.1 Avaliação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente.....	59
5.4 Avaliação da via NO/GMP _c /K _{ATP} sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente.....	63
5.5 Avaliação da via colinérgica muscarínica sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente.....	69
5.6 Modelo de nocicepção induzida por capsaicina.....	71
5.7 Modelo da Placa Quente.....	73
5.8 Modelo de Rotarod.....	73
5.9 Modelo de edema de pata	75
5.10 Modelo da bolsa de ar subcutâneo	76
5.11 Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	82
5.12 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica	84
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÕES	100
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que 80% dos indivíduos adultos irão sofrer pelo menos uma crise aguda de dor durante a vida, sendo que 90% desses indivíduos poderão ter mais de uma vez no decorrer de suas vidas.

A dor pode passar de aguda a crônica após três meses do início. A Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED) estima que pelo menos 37% da população do Brasil apresenta dor de forma crônica, isso corresponde a aproximadamente 60 milhões de pessoas.

A complexidade de patologias que culminam com dor e inflamação envolve não apenas aspectos físicos, como também uma experiência perceptual com fenômenos subjetivos inerentes a cada indivíduo, ou seja, cada pessoa ou animal pode sentir a dor de forma diferente.

A dor inflamatória se origina através da ativação de neurônios sensoriais nociceptivos com a participação de mediadores inflamatórios. Patógenos, quando entram em contato com o organismo, são reconhecidos primeiramente pelos macrófagos e desencadeiam uma série de processos que irão compor a resposta imune/ inflamatória. Os mediadores pró-inflamatórios também podem levar ao aumento da sensibilidade neuronal a estímulos que normalmente seriam inócuos ou causariam pouca dor, caracterizando assim um mecanismo denominado hipernocicepção inflamatória.

Inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. Ela é caracterizada pelas alterações no calibre vascular, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo; alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos, migração de leucócitos e acúmulo no espaço extravascular, onde ocorreu a injúria.

Apesar da dor apresentar um caráter protetor como resposta ao organismo, o impacto da dor na sociedade é visto de maneira negativa, pois é uma condição que em geral diminui a qualidade de vida do indivíduo. A cronicidade da dor interfere nas atividades diárias, pode aumentar o estresse tanto físico quanto mental, aumentar os índices de ansiedade e depressão, comprometimento do humor, do sono, do apetite,

entre outros. Todos esses impactos podem resultar em afastamento social e no trabalho, desequilíbrio econômico, intenso sofrimento físico e psíquico que pode levar até mesmo ao suicídio.

A partir disto, a identificação de compostos capazes de combater a dor e a inflamação com efeitos adversos limitados é um objetivo proeminente na pesquisa biomédica. Alguns dos fármacos analgésicos "clássicos", notadamente os opioides (por exemplo, a morfina) e os anti-inflamatórios não esteroidais tem suas origens em produtos naturais que foram usados por séculos.

Porém, os inúmeros efeitos adversos (por exemplo, depressão respiratória, irritação gástrica, sedação e constipação intestinal), além de tolerância à opioides limitam fortemente o seu uso clínico, isto leva a uma busca contínua por analgésicos mais eficazes e potentes, e com um melhor perfil em relação ao desenvolvimento de efeitos adversos.

Um dos grandes avanços no desenvolvimento de fármacos a partir da química medicinal ao longo dos últimos anos foi a concepção e síntese de compostos híbridos, que englobam moléculas com dois farmacóforos de entidades conhecidas em uma única estrutura, e que são dotadas de atividades biológicas bem estabelecidas. A abordagem de hibridização molecular é uma ferramenta poderosa na química medicinal para a concepção de ligantes e protótipos e para promoção de efeito benéfico para o tratamento de várias patologias.

A partir do exposto e baseado em estudos anteriores com as moléculas precursoras, o presente estudo analisou a ação do composto híbrido *cis*-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2h-pirano-2-il)metil-2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila sobre condições nociceptivas e inflamatórias agudas, e aprofundou o entendimento sobre os mecanismos reponsáveis pelas suas atividades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nociceção e dor

As definições e pensamentos relacionados à dor e nociceção existem desde a antiguidade e foram se modificando e se aperfeiçoando com o passar do tempo. Aristóteles (384-322 a.C), na Grécia antiga, reconhecia os cinco sentidos principais (tato, visão, olfato, audição e paladar), e considerava que o tato era o sentido que tinha relação direta com a sensação de dor, correlacionando ainda com o dano tecidual. Herophilus (335-280 a.C) propôs que o órgão responsável pela consciência e sensações era o cérebro, com os nervos periféricos sendo a ligação com a medula espinhal, realizando assim o controle das sensações e dos movimentos (PERL, 2011). Já o filósofo persa, Avicenna (980-1037), relatou que a dor poderia ser dissociada do tato em condições de doença, propondo que a sensação de dor era independente (PERL, 2007).

Por volta dos anos 1880, diversas propostas surgiram com a introdução de um mecanismo espinhal de condução da informação dolorosa (PERL, 2007). Já no ano de 1904, o termo nociceção foi criado por Charles Sherrington (WOODWORTH E SHERRINGTON, 1904). Sherrington via os reflexos nociceptivos e a percepção da dor como processos intimamente ligados.

Desde então, em mais de cem anos de pesquisa, evidências incontestáveis definiram o processo nociceptivo com todas as propriedades neuronais e moleculares envolvidas (BASBAUM e cols, 2009; WOOLF e SALTER, 2000). A definição de nociceção dada pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) refere-se como sendo "o processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo" (LOESER e TREEDE, 2008).

A nociceção ocorre continuamente na ausência da percepção da dor, e é um processo fisiológico fundamental que subconscientemente fornece informações que protegem o organismo de danos nos tecidos (KOCH, 2012).

Com relação à dor, esta é uma experiência subjetiva consciente que é mais comumente impulsionada pela atividade nociceptiva. O estímulo nocivo da periferia é transmitido, através da medula espinhal, para áreas do sistema nervoso central, resultando na sensação fisiológica da dor com resposta emocional negativa e memória associadas (KHALID e cols, 2017). Portanto, de acordo com a definição pela IASP, dor

é “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrito em termos de tais danos” (LOESER E TREEDE, 2008).

A dor fisiológica tem um caráter protetor, porém quando é persistente, esta se torna patológica e incapacitante. É essencial que o sistema nervoso codifique e reconheça este estímulo doloroso o mais rapidamente possível, para assim evitar dano tecidual (KHALID e cols, 2017).

No caso da dor crônica, é importante conseguir mensurá-la na clínica, para que a progressão da doença e a resposta da pessoa ou animal ao tratamento possam ser monitorados. Na área da pesquisa, também é importante a mensuração da dor, mas neste caso o objetivo é fornecer resultados significativos que irão promover a nossa compreensão dos mecanismos da dor ou como esta pode ser melhor tratada. (JOHNSON, 2016). Técnicas baseadas na primeira resposta de um animal frente a um estímulo progressivamente crescente são referidas como testes de limiar de dor ou teste sensorial quantitativo. Estes provaram ser muito úteis em uma variedade de situações (DICKINSON e cols., 2009; LOVE e cols., 2011). As respostas aos estímulos têm componentes reflexos e cognitivos. Os componentes reflexos são processados na medula espinhal dentro do dermatomo do estímulo (reflexos segmentares) e também em associação com outros dermatomos (reflexos longos). Eles geralmente envolvem a retirada do membro estimulado ou espasmos da musculatura na área estimulada (JOHNSON, 2016). Os componentes cognitivos são aqueles que incluem os centros superiores do sistema nervoso central, são considerados mais complexos e mais globais quando comparados aos componentes reflexos. O giro cingulado rostral é a estrutura que integra informações vindas do sistema nociceptivo e também de vias envolvidas com a emoção. Assim, este local representa o ponto crítico em que a nocicepção se torna dor. O estado da função cognitiva de um animal é, portanto, decisivo na medida em que ele terá a percepção da dor como resultado de um estímulo novo específico. (JOHNSON, 2016).

Vários tipos diferentes de estímulos, incluindo químicos, mecânicos e térmicos, podem ser usados para testes limiars de dor. Os transdutores mecânicos mimetizam muito bem os estímulos nocivos encontrados fora do laboratório. Eles são fáceis de controlar e o estímulo pode ser terminado rapidamente. Eles também são estáveis ao longo do tempo e produzem pouco dano tecidual (GRINT e cols., 2014). Estimuladores térmicos não causam co-estimulação de outros receptores além dos termocceptores.

Porém, o controle e o término do estímulo são mais difíceis e com o tempo isso pode causar problemas com dano nos tecidos, levando à sensibilização. A temperatura ambiente também influencia os resultados obtidos e isto deve ser explicado pela metodologia experimental (LOVE e cols., 2011). A dor a partir de estímulos químicos procede de alterações metabólicas e eletroquímicas locais causadas por inflamação aguda, perdas teciduais, rupturas vasculares, e outros estímulos (STERIN e cols., 2005). O teste de contorções abdominais é um modelo de nocicepção química, sensível e abrangente utilizado para a investigação de substâncias com atividade antinociceptiva, principalmente de origem periférica (AHMED e cols., 2011). No teste de formalina a dor gerada na pata é difusa e mal definida, geralmente em decorrência da baixa densidade de inervação sensitiva (SIKANDAR & DICKENSON, 2012).

Deste modo, é importante selecionar cuidadosamente as metodologias mais apropriadas para que os dados gerados sejam relevantes para as hipóteses testadas (JOHNSON, 2016).

O primeiro passo no processamento da dor é a conversão de um estímulo na periferia em um potencial de ação nas fibras sensoriais nociceptivas. Se um estímulo possui intensidade suficiente para atingir o limiar de um potencial de ação, um impulso nervoso é gerado. Se a intensidade desse impulso aumenta, fibras nervosas adicionais do sistema nervoso central são recrutadas. (GARLAND e cols., 2012).

As fibras sensoriais periféricas podem ser divididas em três grandes grupos. O primeiro grupo envolve as fibras A- α , A- β ou A- γ , que estão envolvidas com o tato e a propriocepção, e não com o estímulo nocivo (APKARIAN e cols., 2005). O segundo grupo contém a fibra do tipo A- δ , envolvida particularmente com a sensação de dor, ela pode ser de dois tipos: fibras A δ tipo I (respondem a temperatura em torno de 52°C, são insensíveis a capsaicina e possuem resposta mediada pelos receptores TRPV2) fibras A δ tipo II (sensíveis a temperatura em torno de 43°C, a capsaicina e ativam, via receptores TRPV1, canais catiônicos não seletivos permeáveis ao cálcio) (ROCHA e cols., 2007). O terceiro e último grupo compreende as fibras C, que são polimodais, respondem a todos os tipos de estímulos nocivos, de irritação mecânica, térmica e química. Para cada um, há subtipos de receptores, o calor é frequentemente mediado pelo canal TRPV 1-3, a pressão mecânica pelo canal TREK-1, e o estímulo químico é mediado pelo canal ASIC (APKARIAN e cols., 2005; FEIN, 2011).

De acordo com a IASP, nociceptor é um neurônio definido como “um receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico que é capaz de transduzir e codificar estímulos nocivos” (LOESER E TREEDE, 2008). Os nociceptores transmitem informações via glutamato, um neurotransmissor excitatório, quando são ativados por seu estímulo específico. Os mediadores inflamatórios são também secretados no local da lesão para estimular a ativação do nociceptor, através de formação de diversas substâncias químicas, tais como neurotransmissores (serotonina), lípídeos (prostaglandinas), peptídeos (bradicinina) e neurotrofinas (fator de crescimento do nervo – NFG) (APKARIAN e cols., 2005; ROCHA e cols., 2007). Todas estas moléculas diminuem o limiar de ativação dos nociceptores, resultando assim em uma transmissão de sinais aferentes ao corno dorsal da medula espinhal. Também ocorre o início de uma inflamação neurogênica com a liberação da substância P, por exemplo. Esse processo, por sua vez, causa vasodilatação, que resulta no extravasamento de proteínas e fluidos para o espaço extracelular, estimulando as células do sistema imune, que também contribuem para a reação da inflamação neste local (KHALID e cols, 2017).

As fibras aferentes primárias (nociceptores) projetam-se ao corno dorsal da medula espinhal de maneira coordenada e específica. As fibras nociceptivas (A- δ e C) estão inseridas nas camadas mais superficiais (lâminas I e II), enquanto as fibras A- β (responsáveis pelo tato e propriocepção) inserem-se nas lâminas III-V, que são mais profundas. Estudos eletrofisiológicos corroboram com esta disposição anatômica, demonstrando que os neurônios espinhais localizados nas lâminas I e II são responsivos a estímulos nocivos (via fibras A- δ e C), enquanto neurônios presentes nas lâminas III e IV são responsivos a estímulos inócuos (via fibras A- β). Já os neurônios localizados na lâmina V recebem estímulos tanto inócuos quanto nocivos. (BASBAUM e cols., 2009).

Na região do corno dorsal da medula espinhal, os neurônios sensoriais primários liberam agentes neuroquímicos como glutamato e substância P. Isso, por sua vez, ativa os neurônios nociceptivos de segunda ordem, que formam vias ascendentes (trato espinotalâmico) (Figura 1) responsáveis pela transmissão da informação para regiões supra-espinhais, como tálamo e córtex, onde há a percepção e a interpretação da dor. (MILLAN, 2002). Posteriormente, axônios do tálamo (terciários) seguem em direção ao giro pós-central e ao lóbulo paracentral posterior do lobo parietal. Estas áreas corticais

recebem informações de dor aguda e fornecem um mapa somatotrópico que permite a localização precisa da dor (MILLAN, 1999).

O trato espinomesencefálico corresponde a outra projeção ascendente de extrema importância (Figura 1), já que ele é estimulado quando há uma dor de característica crônica. As áreas envolvidas incluem a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal. Essa última região, através do hipotálamo, mantém conexões recíprocas com o sistema límbico (MILLAN, 1999; AIRES, 2008).

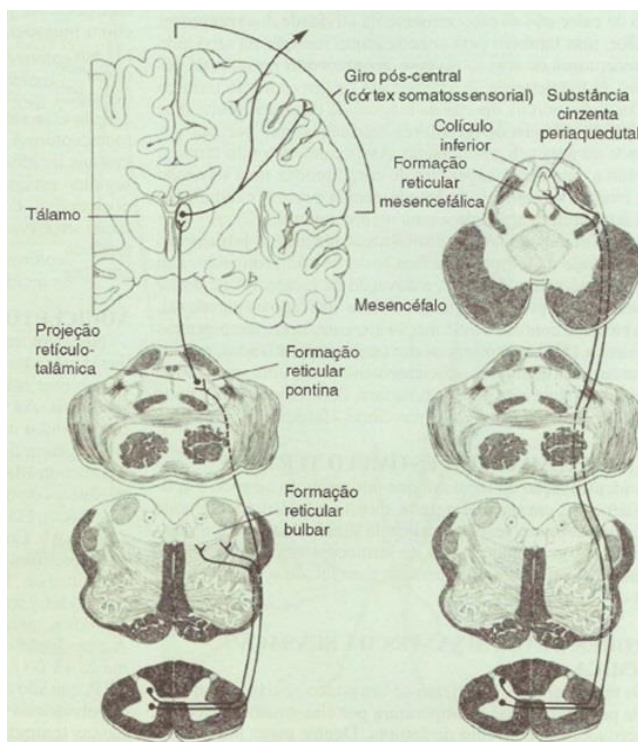


Figura 1 – Vias ascendentes da dor (KANDEL e cols., 2003)

A modulação da dor também envolve projeções descendentes (Figura 2). Uma região essencial para a transmissão que ocorre nas vias descendentes é a região periaquedutal cinza (PAG) localizada no mesencéfalo (MILLAN e cols., 2002). A PAG se projeta inicialmente para o bulbo rostral medial (RVM) e através do funículo posterolateral da medula espinhal, para o corno posterior. Os impulsos são recebidos de muitas outras regiões cerebrais, como hipotálamo (H), córtex insular (CI) e amígdala (A).

Através da medula rostroventral (RVM), fibras inibitórias descendentes contendo neurotransmissores importantes como encefalina e 5-hidroxitriptamina, se projetam para o corno dorsal da medula espinhal.

A estimulação elétrica da PAG causa analgesia através deste mecanismo citado anteriormente. Os opioides promovem analgesia, em parte por ativarem essa via descendente, pois as regiões cerebrais citadas expressam receptores opioides μ . Além disso, os opioides também podem inibir a excitação das terminações nervosas sensitivas na periferia (RANG e cols., 2012).

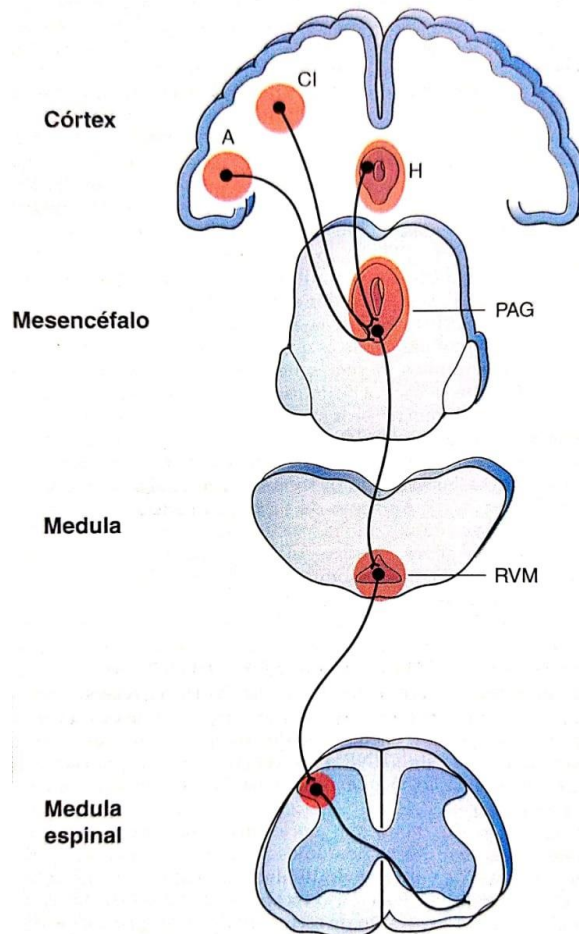


Figura 2 – Via descendente da dor (RANG e cols., 2012)

Como discutido previamente, normalmente a dor tem um caráter protetor. A plasticidade neuronal em reconhecer o estímulo doloroso resulta na sensibilização do sistema nervoso central e periférico e auxilia na detecção precoce da sensação de dor. Quando então a dor torna-se persistente, há estágios de progressão de hipersensibilidade, intitulados de alodinia e hiperalgesia (McMAHON e cols., 2008; BASBAUM e cols., 2009). Estímulos nocivos intensos resultam na liberação de glutamato e consequente ativação repetitiva de receptores glutamatérgicos do tipo

AMPA, que por sua vez induzem despolarizações repetidas induzindo influxo de cálcio pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ocasionando em uma soma do potencial pós-sináptico excitatório lento, maior despolarização neuronal e deflagração de potencial de ação, produzindo “alodinia”, que é uma hipersensibilidade à dor num estímulo de contexto não doloroso, e “hiperalgesia”, uma resposta aumentada à um estímulo nocivo, mediante estimulação supra-limiar. Ambos os processos são reversíveis com a remoção do estímulo doloroso (WOOLF e cols., 2000; FERREIRA e cols., 2010).

A exposição crônica frente a um estímulo nocivo pode resultar na dor inflamatória ou neurogênica, isso causa uma alteração neuronal mais permanente. Essas alterações podem ser notadas nos neuromoduladores sinápticos, nos canais iônicos, nos receptores acoplados a proteína G e em proteínas estruturais. A injúria no nervo também induz à reorganização das fibras A no corno dorsal da medula espinhal devido à perda de fibras C. Este processo resulta em sinapses das fibras A onde deveriam estar as fibras C com expressão de neurotransmissores relacionados à dor. Por fim, isso causa a persistência da dor, tornando a dor neuropática incurável (WOOLF e cols., 1996, 1991; MANNION e cols., 1999).

A dor tem caráter multifacetado e por isso há bastante dificuldade em realizar tratamentos que sejam realmente eficazes. Existem vários possíveis locais de intervenção para reduzir a dor, incluindo tanto os mediados periféricamente quanto centralmente. É essencial ter um entendimento adequado da patogênese da dor e também as vantagens e desvantagens de cada agente farmacológico. Diante disso, é importante também a identificação de novos fármacos que possam ser utilizados junto ao arsenal terapêutico já existente. Uma abordagem multidisciplinar, incluindo terapia farmacológica e psicológica é a melhor forma de combater a dor e fornecer assim uma melhor qualidade de vida aos indivíduos acometidos (KHALID e cols, 2017).

2.2 Inflamação

2.2.1. Processo inflamatório

O processo inflamatório é definido como um fenômeno dinâmico e complexo, regulado por diversos mediadores. É uma resposta fisiológica normal do organismo que ocorre após alguma lesão ou infecção local e tem como finalidade recuperar a homeostase do tecido lesionado (SILVA, 2010).

O sistema imune participa diretamente na indução da inflamação, desempenhando um papel essencial no reconhecimento rápido e eficaz de microorganismos patogênicos, e, através de diferentes processos combate esses agentes nocivos, restabelecendo assim as funções normais do tecido (SKELDON e cols., 2011).

A resposta inflamatória envolve uma sequência de eventos bioquímicos, vasculares e celulares, que resulta nos sinais clínicos característicos como o rubor, calor, edema e a dor, acompanhados ou não da perda de função do tecido acometido (CRUVINEL, 2010). Ocorre liberação de sucessivos mediadores e recrutamento de leucócitos circulantes, que são ativados no local da inflamação (Figura 3). Porém, em alguns casos, a inflamação é resolvida pela liberação de mediadores anti-inflamatórios endógenos, como por exemplo as citocinas anti-inflamatórias. No entanto, na inflamação crônica, há ativação persistente de células leucocitárias, gerando uma disfunção dos mecanismos regulatórios (HANADA e cols., 2002).

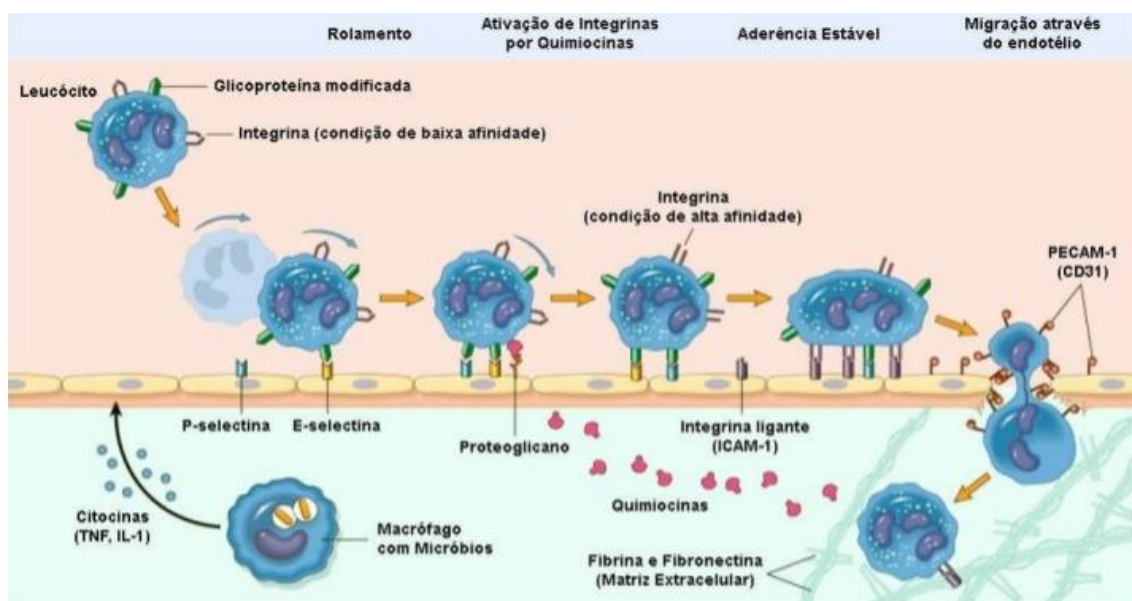


Figura 3 – Ativação e migração de leucócitos (ROBBINS & COTRAN, 2010)

Durante a inflamação ou dano tecidual, células residentes do sistema imune produzem mediadores que ativam neurônios sensoriais para produzirem potenciais de ação ou sensibilizam neurônios, aumentando a transdução sensorial e a excitabilidade neuronal (ZHANG e cols., 2007; BASBAUM e cols., 2009).

Um processo relevante no processo inflamatório é a ativação de mastócitos, que vai levar a liberação de diversas substâncias presentes nos grânulos desse tipo celular, o

que caracteriza a desgranulação. Quimiocinas, citocinas e aminas vasoativas (serotonina e histamina) são as principais moléculas liberadas (FRENZEL e cols., 2013).

Os primeiros mediadores liberados durante a resposta inflamatória são as aminas vasoativas, serotonina e histamina. Esta última está presente nos mastócitos, plaquetas e basófilos. A sua liberação ocorre através da desgranulação dos mastócitos, que acontece quando há uma lesão física, ou por intermédio de proteínas liberadoras de histamina derivadas de leucócitos, ou ainda a ligação de anticorpos aos mastócitos. Os efeitos biológicos da histamina incluem o aumento da permeabilidade vascular, produção de prostaglandinas, vasoconstrição pulmonar, aumento dos níveis de GMPc e ativação de células T (ROBBINS & COTRAN, 2010). Já a serotonina se encontra principalmente nas plaquetas, sendo ativada durante o fenômeno de agregação plaquetária, após o contato com complexo antígeno-anticorpo, colágeno e trombina. Seu efeito biológico envolve o aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, uma característica fundamental da inflamação aguda (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Apesar desse orquestrado equilíbrio que o organismo realiza para resolver a inflamação e retornar a homeostase tecidual, pode ocorrer uma falha nesse processo de resolução e gerar uma inflamação do tipo crônica (LAWRENCE e cols., 2007). A inflamação crônica tem como característica a presença de um estímulo persistente, gerando assim uma resposta mais prolongada, podendo durar semanas ou até meses. Provocada normalmente por respostas imunes direcionadas a antígenos próprios ou ambientais ou por microorganismos patogênicos que sejam muito resistentes (ROBBINS & COTRAN, 2010). Quando a inflamação aguda se torna crônica, há infiltração de células mononucleares, como os linfócitos e macrófagos. Esse processo é mediado primordialmente por citocinas pró-inflamatórias. A constante ativação de macrófagos, neutrófilos e células T faz com que haja de modo simultâneo: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo do tecido lesionado e consequente perda da função e destruição desse tecido e ainda formação de fibrose (Figura 4) (SHERWOOD e cols., 2004, GILROY e cols., 2004).

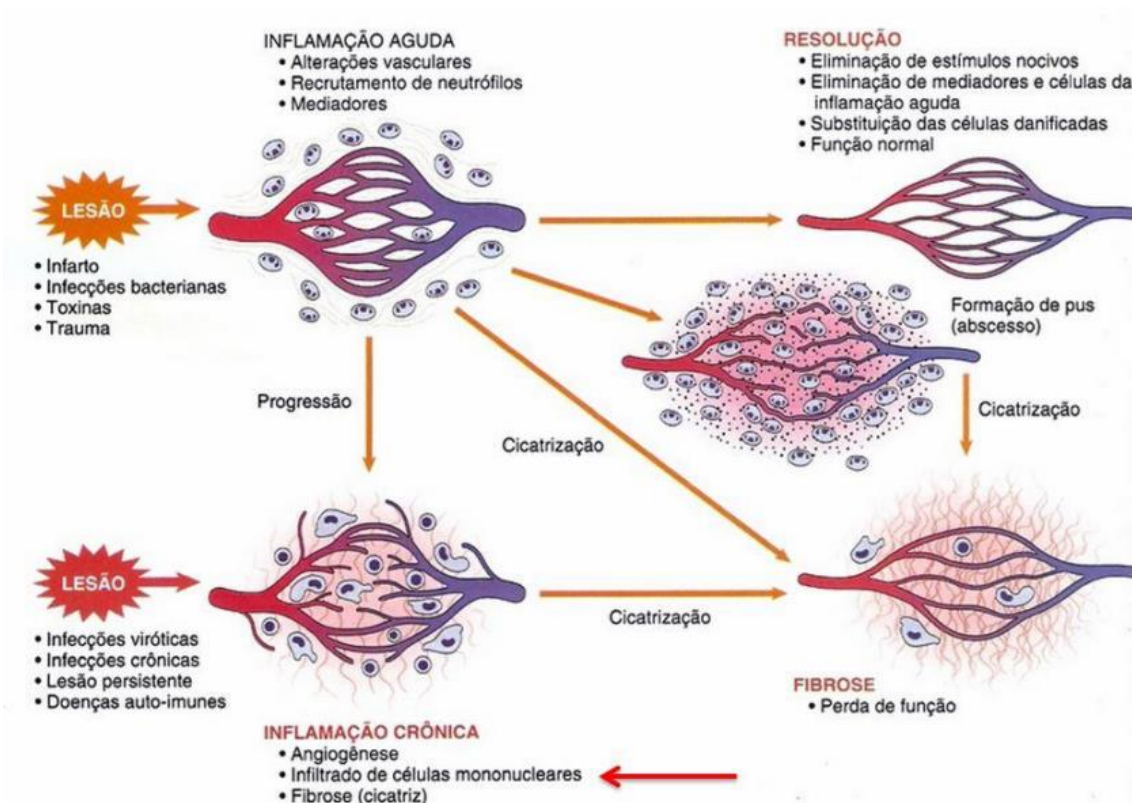


Figura 4 - Representação do comportamento celular e vascular durante e após os dois tipos de inflamação (aguda e crônica) (ROBBINS & COTRAN, 2010)

2.2.2. Citocinas

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas predominantemente por macrófagos ativados e estão envolvidas na regulação positiva de reações inflamatórias. Os neutrófilos são importantes liberadores de citocinas e são as primeiras células que chegam ao foco inflamado, tempo grande importancia na inflamação aguda.

A interleucina-1 β (IL-1 β) é liberada principalmente por monócitos e macrófagos, bem como por células não imunes, como fibroblastos e células endoteliais, durante lesão celular, infecção e inflamação. Além disso, esta citocina aumenta a produção de substância P e prostaglandina E₂ (PGE₂) em várias células neuronais e gliais (JEANJEAN e cols., 1995).

A IL-1 é composta por dois polipeptídeos distintos (IL-1 α e IL-1 β) que liga-se a um receptor de IL-1 do tipo 1 de 80kd e um receptor de IL-1 do tipo 2 de 68kd, que estão presentes em diferentes tipos de células (O'NEILL e cols., 2008). Os níveis plasmáticos de IL-1 são aumentados em pacientes com inflamação.

A interleucina-6 (IL-6), outra citocina importante, está envolvida na ativação microglial e astrocítica, bem como na regulação e expressão de neuropeptídeos neuronais (KLEIN e cols., 1997). Há evidências de que a IL-6 contribui para o desenvolvimento do comportamento da dor neuropática após lesão do nervo periférico (RAMER e cols., 1998). O efeito neuronal da IL-6 também depende da presença do seu receptor solúvel, e esse complexo age como agonista em células que expressam a molécula transdutora de sinal gp130, como a subunidade b do receptor IL-6 alterando a dinâmica intracelular (OBREJA e cols., 2002).

Outro mediador do grupo das citocinas pró-inflamatórias é o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O TNF é composto de duas proteínas intimamente relacionadas: TNF madura (TNF- α) e linfotoxina (TNF- β), ambas reconhecidas por receptores de TNF, um receptor do tipo 1 de 75kd e um receptor do tipo 2 de 55kd (DEMPSEY e cols., 2003). Após ser liberado no espaço extracelular, atua através de dois receptores de superfície celular, o TNFR1 e o TNFR2. Estes dois tipos de receptores são glicoproteínas transmembrânicas e estão presentes tanto em neurônios quanto na glia. A interação do TNF- α com o receptor TNFR1 ativa uma via de sinalização intracelular com eventos pró-inflamatórios e apoptose, ambos associados à injúria tecidual. Já a interação com o receptor TNFR2 ainda é pouco esclarecida, mas acredita-se que esteja associada com a angiogênese e reparo do tecido (BRADLEY, 2008). O TNF- α apresenta uma variedade ampla de efeitos, como a ativação dos neutrófilos, aumento da citotoxicidade para alguns microorganismos patogênicos, produção de espécies reativas de oxigênio, aumento de expressão das moléculas de adesão ICAM-1, P-selectina e E-selectina (DINARELLO, 1991; ALESSIO e cols., 1998).

A IL-1 β e o TNF podem causar *up regulation* da expressão de fator de crescimento nervoso (NGF), da ciclooxigenase-2 (COX-2), da óxido nítrico sintase (NOS) e estimular o brotamento simpático no gânglio da raiz dorsal, alterando a plasticidade sináptica para o estado de facilitação de longo termo (WOOLF e cols., 1997). Além disso, é possível que a IL-1 β iniba a habilidade das células da glia de remover o glutamato da fenda sináptica, contribuindo para hiperexcitabilidade neuronal. De modo adicional, as células da glia possuem os mesmos sistemas de receptores e de transdutores do sinal que os neurônios, de forma que há interação dinâmica entre essas células na amplificação da resposta neuronal à agressão periférica ou central (MELLER e cols., 1994).

Em doenças que cursam com processo inflamatório agudo ou crônico, é possível que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF) induzam o organismo a criar uma série de respostas caracterizadas por febre, aumento do sono e da síntese de proteínas pelo fígado, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de corticosteróides, alteração da atividade cerebral das monoaminas, diminuição da atividade do cotidiano e da interatividade social e hiperalgesia. Essas alterações ocorrem na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imune, imobilizar a área que foi lesada e conservar energia (MELLER e cols., 1994).

As quimiocinas representam uma família de proteínas com baixo peso molecular, que atuam principalmente na ativação e migração de leucócitos. Possuem uma variedade de funções na inflamação. Sabe-se que uma variedade de quimiocinas induz quimiotaxia, auxiliam na resposta imune e iniciam o processo de cicatrização de feridas (COMMINS e cols., 2010). As quimiocinas conservam resíduos de cisteína, o que permite que sejam atribuídas a dois principais grupos: quimiocinas C-X-C, (quimiotáticas principalmente para neutrófilos) e as quimiocinas C-C (ativam e atraem predominantemente linfócitos e monócitos) (MATSUKAWA e cols., 2000, ZHANG e cols., 2007).

O sistema imune é intensamente regulado e funciona de forma eficaz para limitar e controlar a infecção em determinado tecido, promovendo a restauração do mesmo. Há um equilíbrio notável entre os mediadores pró-inflamatórios e os anti-inflamatórios (ZHANG e cols., 2007) (Figura 5).

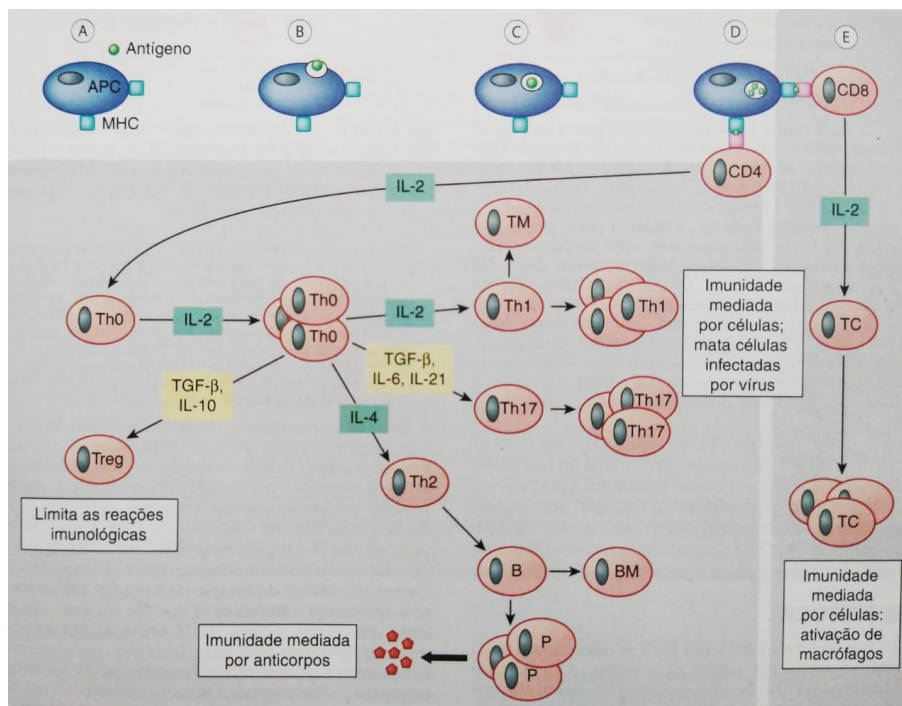


Figura 5 - Ação das citocinas nas fases indutora e efetora da ativação linfocitária. As células apresentadoras de antígenos (APC) ingerem e processam o antígeno (A-D) e posteriormente os fragmentos junto com MHC (complexo principal de histocompatibilidade) a células TCD4, liberam IL-2 (gera e prolifera Th0 – T helper 0). A IL-4 dá origem a células Th2, responsáveis por respostas imunes mediadas por anticópsios. O TGF β (fator de transformação do crescimento beta) e a IL-10 são citocinas que limitam as reações imunológicas, são ditas citocinas anti-inflamatórias. As células CD8 também produzem IL-2, que estimula de modo autócrino as células T citotóxicas (TC) que destroem células infectadas por vírus. Na inflamação do tipo crônica o componente Th1/Th17 torna-se dominante e ativa macrófagos, que liberam IL-1 e TNF α , que por sua vez liberam outras citocinas inflamatórias. Essa ativação corresponde a uma resposta imune adaptativa (RANG e cols., 2012).

Entre todas estas citocinas, a IL-10 apresenta potente ação anti-inflamatória e funciona como um inibidor de células dendríticas e macrófagos ativados (OBERHOLZER e cols., 2002). Seu efeito principal é a supressão de IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-1 por macrófagos, resultando assim numa diminuição da extensão da resposta pró-inflamatória mediada por estas citocinas (SHERWOOD e cols., 2004). A administração aguda de IL-10 tem sido documentada como supressora do desenvolvimento da dor em diversos modelos animais, como neurite periférica, lesão excitotóxica da medula espinhal, e lesão do nervo periférico (WIESELER-FRANK e cols., 2004). O bloqueio da IL-10 espinhal, por outro lado, preveniu e até reverteu os comportamentos de dor neuropática (MILLIGAN e cols., 2005).

A resposta imune adquirida também tem um papel muito importante nesse processo, ela pode ser ativada e amplificada pela própria resposta imune inata. Este fenômeno é mediado principalmente por IL-12, que causa a ativação de células T e promove a diferenciação de células T virgens em células do fenótipo Th1 (O'SULLIVAN e cols., 1995). A resposta adaptativa é, no entanto, induzida primariamente pela apresentação de antígenos estranhos para células T CD4+ e CD8+. A ativação de células T CD4+ causa uma produção extra de citocinas e amplifica as respostas imunes tanto inatas quanto adquiridas (SHERWOOD e cols., 2004).

Os subgrupos das células T CD4+ são as células Th1 e Th2. A principal citocina produzida pelas células Th1 é o interferon- γ (IFN- γ) (WOLK e cols., 2000). O IFN- γ tem papel essencial na imunidade contra patógenos intracelulares. Esta citocina é produzida predominantemente por células natural killer (NK) e linfócitos natural killer T (NKT), fazendo parte da imunidade inata, e também por linfócitos T CD4+, Th1 e T CD8+ citotóxicos (CTL), como parte da resposta imune adquirida (JAMIE e cols., 2007). O IFN- γ é um potente ativador de macrófagos, estimula a produção de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio. Além disso, estimula o aumento de moléculas de adesão e receptores de anticorpos IgG na superfície de células apresentadoras de antígeno (BOGDAN e cols., 2000). O IFN- γ amplifica a resposta pró-inflamatória através da ativação de macrófagos e estimulação das funções citolíticas das células T CD8+. A indução de uma resposta Th1 é promovida pela IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas. Em resumo, a principal função dessas células Th1 é produzir imunidade antimicrobiana (DECKER e cols., 2002).

Já a diferenciação da célula do tipo Th2 ocorre pela indução de IL-4 e é desencadeada pela exposição a helmintos e alérgenos. As células Th2 produzem diversas citocinas, como IL-5, IL-10 e IL-13, assim como anticorpos IgG1 e IgE, que medeiam as reações alérgicas, contra parasitas e asma (ROBINSON, 2000). Em suma, a função primordial das células Th2 envolve um papel importante nas respostas imunes relacionadas a infecções de helmintos e reações alérgicas (SHERWOOD e cols., 2004).

A citocina IL-4 é uma glicoproteína pleiotrópica, foi primeiramente identificada como um fator de crescimento para células B derivada de células T. Seu DNA foi clonado posteriormente, no ano de 1986 (LEE e cols., 1986; NOMA e cols., 1986). Atualmente a IL-4 é dita como a citocina protagonista das células Th2 (T helper 2) (SCHMITT e cols., 2015).

A IL-4 desempenha suas funções a partir da ligação com seu respectivo receptor, IL-4R α , amplamente expresso na maioria das células. A partir do complexo IL-4/IL4R α , uma segunda cadeia de receptor é ligada, IL-2R γ c (JUNTTILA e cols., 2018). A ligação entre a IL-4 e seus receptores ocorre com uma alta afinidade, sendo capaz de mesmo em baixas concentrações, poder ocupar ao máximo as cadeias receptoras em uma determinada superfície celular. A partir da formação do complexo IL-4 e seu receptor ocorre uma mudança conformacional e consequente alteração nos domínios do receptor intracelular, permitindo a ativação de moléculas de sinalização intracelular (NELMS e cols., 1999).

A principal cascata de sinalização celular ativada é a IL-4/STAT6 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 6) (GOENKA e cols., 2011). As moléculas ativadas nessa cascata homodimerizam e se translocam para o núcleo e se ligam a sequências específicas de DNA. O STAT6 promove a expressão de IL-4 nas células Th parcialmente por induzir a expressão de GATA3, um fator transcricional essencial para várias etapas críticas durante a diferenciação das células T, incluindo determinação do destino das células T e especificação de linhagem CD4. Também regula a homeostase e a ativação de células NKT e células T CD8 + (I-CHENG HO., 2016).

Além de fator de crescimento para células B, a IL-4 aumenta a expressão de CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE), regula a função de macrófagos, impulsiona a diferenciação das células Th2 (que também secretam IL-4, formando um feedback positivo para reforçar a diferenciação de Th2), promove proliferação, sobrevivência, adesão e quimiotaxia de mastócitos (HUA e cols., 2015). A IL-4 também aumenta a expressão de Fc ϵ RI (receptor de alta afinidade para IgE), permitindo a ligação da IgE. A citocina IL-4 medeia as defesas imunológicas contra helmintos, mas também desempenha um papel importante na patogênese das doenças atópicas, como asma e dermatite atópica, patologias caracterizadas por altas concentrações de IgE e mastócitos (BROWN e cols., 2017).

As citocinas pró-inflamatórias parecem estar envolvidas na hiperalgesia e na alodinia mecânica decorrente da lesão nervosa por compressão. Diversos autores já demonstraram que em modelos de isquemia de troncos nervosos periféricos em ratos ocorre maior expressão tissular de genes da família citocinas pró-inflamatórias que podem estar relacionadas à vacuolização da mielina, lesão da célula de Schwann e edema (OKAMOTO e cols., 2001). Outro estudo, através de diversos modelos de

compressão nervosa, evidenciou o aumento da expressão de células positivas para IL-6 ou TNF em ratos com alodinia em relação aos normais, correlacionando citocinas pró-inflamatórias com a intensidade do quadro patológico (CUI e cols., 2000).

2.2.3. Mediadores inflamatórios lipídicos

Os metabólitos gerados na cascata do ácido araquidônico constituem mediadores importantes na inflamação (Figura 6). O substrato dessa via metabólica é o ácido araquidônico, um derivado do ácido linoleico, que se encontra esterificado nos fosfolípidos da membrana celular. A sua biodisponibilidade depende da enzima fosfolipase A₂, que é capaz de desagregá-lo da membrana, tornando-o uma molécula livre (DEVLIN, 2006). O ácido araquidônico livre então pode sofrer metabolização através de duas vias enzimáticas, a da cicloxigenase (COX), resultando na formação dos prostanoídes (tromboxanos, prostaciclina e prostaglandinas), e a via da lipoxigenase, gerando as lipoxinas, HETE e os leucotrienos (STACK e cols., 2001; FRANCISCHETTI e cols., 2010).

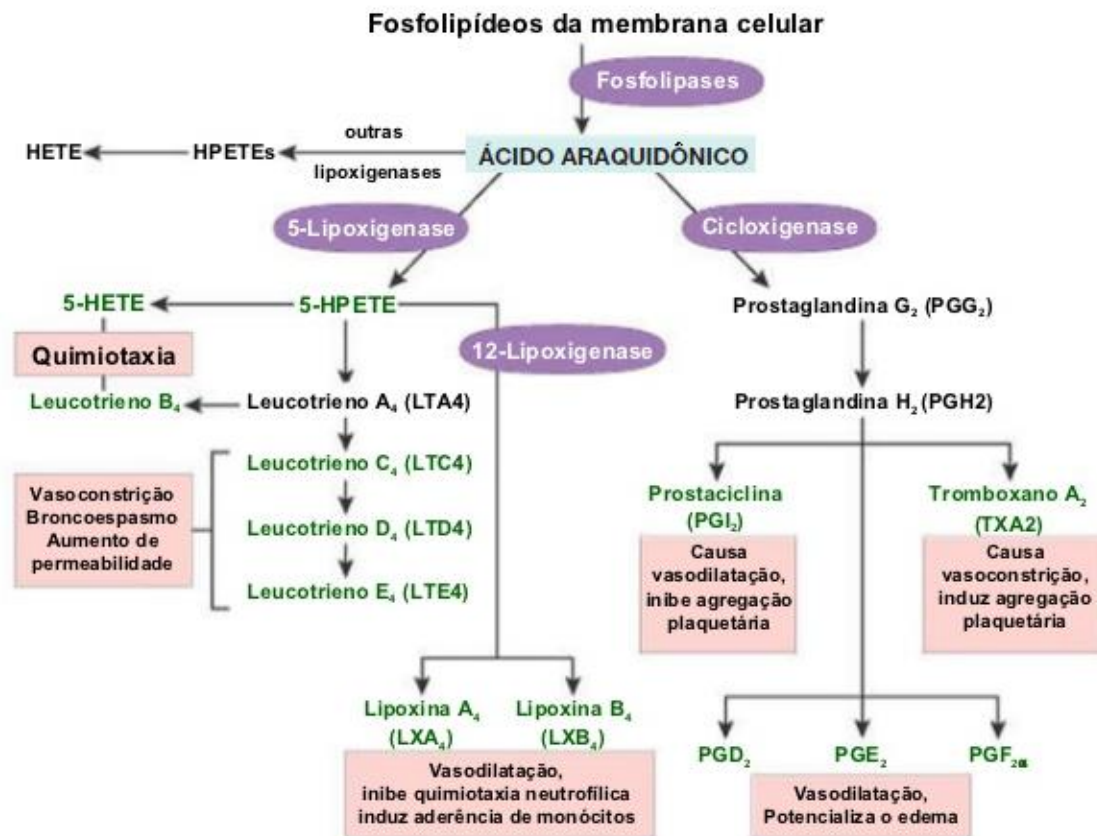


Figura 6 – Cascata do ácido araquidônico e seus metabólitos (ROBBINS & COTRAN, 2010)

Diversos estímulos são capazes de desencadear um processo inflamatório e a partir daí, os eicosanoides são sintetizados, respondendo pela resposta inflamatória e função imune do organismo (KIM E LUSTER, 2007).

Em conjunto, esses mediadores formados regulam variados aspectos da resposta imunológica. Os leucotrienos, por exemplo, contribuem para o extravasamento dos capilares e induzem a contração das células endoteliais. O tromboxano A₂ é um fator derivado principalmente de plaquetas que promove a agregação plaquetária e vasoconstrição. Já a prostaglandina E₂ causa vasodilatação, acompanhado de rubor e calor característicos da inflamação (SHERWOOD e cols., 2004).

A síntese das prostaglandinas, prostaciclina e do tromboxano é feita por enzimas microssômicas. A enzima ciclooxigenase (COX) metaboliza o ácido araquidônico nestes prostanoides. Existem duas isoformas dessa enzima, a COX-1 que se caracteriza por ser constitutiva/fisiológica, sendo sua função produzir prostanóides responsáveis por ações fisiológicas, como por exemplo a citoproteção do epitélio gástrico. E a COX-2 que é induzida/inflamatória, é hiper-regulada pelas citocinas e pelos fatores de crescimento, está presente quando há inflamação ou câncer no organismo, porém também pode ser constitutiva em alguns tecidos. Ambas isoformas contribuem para a produção dos prostanoides autorreguladores e homeostáticos e podem participar do processo inflamatório. Tanto processos fisiológicos quanto fisiopatológicos envolvem a participação de COX-1 e COX-2, que podem realizar suas funções de maneira coordenada ou de maneira isolada (SMITH e cols., 2001).

Do lado direito da figura 6, podemos visualizar a biossíntese dos prostanoides. Primeiramente, as prostaglandinas G₂ e H₂ são formadas e após isso, os prostanóides são gerados a partir de enzimas específicas, dentre eles a prostaciclina (PGI₂) induz respostas como vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, enquanto o tromboxano A₂ leva a vasoconstrição e indução da agregação de plaquetas. As prostaglandinas D, E e F₂ levam também a uma vasodilatação e potencializam o edema no processo inflamatório (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Já no lado esquerdo da mesma figura, conseguimos observar outro grupamento enzimático, as lipoxigenases. O ácido araquidônico sofre metabolização em ácidos

hidroxiperoxi-eicosatetraenoicos (HPETEs), que por sua vez, são convertidos em hidroxi-ácidos graxos (HETES) correspondentes (GOODMAN & GILLMAN, 2012).

A via da 5 lipoxigenase resulta na síntese dos leucotrienos, que participam na inflamação causando vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. Já as lipoxinas (LXA e LXB) resultam em vasodilatação, inibição da quimiotaxia neutrofílica e indução de aderência de monócitos (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Os prostanoides, para realizarem suas funções, precisam se ligar a receptores específicos da membrana. Os efeitos variados ocorrem devido a interação de uma família inteira de receptores diferentes. Por exemplo, a prostaglandina E2 (PGE2) pode se ligar a EP1, EP2, EP3 ou EP4. A cascata bioquímica ativada envolve proteínas G, que pode ser Gs, Gi e Gq, que modulam as atividades da adenilciclase e da fosfolipase C (GOODMAN & GILLMAN, 2012).

Os sinais clássicos da inflamação estão intimamente ligados a mediadores inflamatórios lipídicos. Inicialmente, a fase vascular, com papel principalmente realizado via PGI2, PGD2 e PGE2, é caracterizada por dilatação arteriolar. Esse efeito causa aumento no fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade venular pós capilar e finalmente, exsudação plasmática, que leva para os tecidos componentes do sistema complemento, do sistema de coagulação sanguínea, fibrinolítico e também das cininas.

Vários tipos de células do sistema imune participam destes eventos, como os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos (BOOTHE, 2001). Na dor do tipo inflamatória, a partir da sensibilização de nociceptores, há participação das prostaglandinas, que podem ser definidos como mediadores álgicos endógenos. Acredita-se que a prostaciclina está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a prostaglandina E2 pode manter sua atividade por um período de tempo de até 6 horas (PAPICH, 1997).

A PGE2 também está diretamente relacionada com a febre. As endotoxinas bacterianas fazem com que macrófagos liberem o pirógeno endógeno IL-1, que tem a capacidade de estimular a síntese de PGE2, causando a elevação do ponto de ajuste da temperatura corporal (BOOTHE, 2001).

O fator de ativação plaquetário (PAF) é considerado um dos mais potentes mediadores inflamatórios lipídicos (DEMOPOULOS, 2000). Envolvido em diversos processos importantes, como inflamação, cicatrização de injúrias, angiogênese e até

mecanismos ligados a reprodução. Uma variedade de patologias envolve a participação do PAF, tais como doenças renais, câncer, alergias, asma, doenças correlacionadas ao sistema nervoso central e ao sistema cardiovascular (TSOUPRAS e cols., 2018; LORDAN e cols., 2019).

Produzido por plaquetas, macrófagos, monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastócitos e células endoteliais o PAF participa da inflamação aguda ativando leucócitos do tipo polimorfonucleares (PMNs), importantes células reguladoras da imunidade adquirida devido à sua capacidade de síntese de citocinas, e também ativando monócitos envolvidos em cascatas de sinalização intracelular, como a do NF- κ B (fator nuclear κ B) (LORDAN e cols., 2017). Um aumento na concentração dos níveis de PAF no sítio inflamatório leva a ativação e agregação de plaquetas e leucócitos, ativação de células endoteliais, aumento da aderência, motilidade, quimiotaxia e migração leucocitária. Todos esses processos culminam num distúrbio endotelial que estimula o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (LORDAN e cols., 2019).

O PAF também tem participação direta na patologia da aterosclerose, caracterizada por formação de placas de ateroma sobre a parede das artérias. É um agente inflamatório essencial que inicia diversas cascatas inflamatórias com consequente disfunção de células endoteliais e participa de eventos pró-aterogênicos (TSOUPRAS e cols., 2018). O PAF modula a interação entre diversas moléculas pró-inflamatórias, como citocinas, eicosanóides e radicais livres de oxigênio. Dessa forma, este importante mediador lipídico é responsável pela formação, desenvolvimento e ruptura de ateromas (DEMOPOULOS e cols., 2003; RAINGER e cols., 2015).

A inibição seletiva de enzimas da cascata do ácido araquidônico representa um sítio de intervenção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Os glicocorticóides e o anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são dois grupos de fármacos que agem inibindo a síntese dos mediadores lipídicos, por mecanismos distintos (RANG e cols., 2012).

A maioria dos AINEs inibe ambas as cicloxigenases (COX-1 e COX-2), embora varie quanto ao grau de inibição de cada uma delas. Formam um grupo heterogêneo de compostos, que possuem funções terapêuticas em comum, ou seja, são analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. Os AINES, ao inibirem a síntese de prostaglandinas, diminuem a vasodilatação, inibem a sensibilização dos nociceptores, centro

termorregulador hipotalâmico e modulam os sinais e sintomas da inflamação (FELDMAN & McMAHON, 2000).

Os glicocorticóides atuam inibindo a gênese dos mediadores inflamatórios lipídicos (eicosanóides e PAF), através da indução da síntese de uma proteína específica, denominada lipocortina que, por sua vez, inibe a enzima fosfolipase A2, bloqueando a liberação do ácido araquidônico e liso-gliceril-fosforilcolina dos fosfolipídios da membrana celular. Os glicocorticóides também são responsáveis pela inibição da expressão de COX-2, que acarreta em inibição de prostanóides. Os glicocorticóides bloqueiam não somente a síntese de prostanóides, como fazem os AINEs, mas também são capazes de inibir outros mediadores e fenômenos da inflamação, possuindo portanto uma maior amplitude em sua atividade antiinflamatória (BUDSBERG, 1999).

2.3 Sistema opioide

O termo opioide foi proposto por Acheson para designar os fármacos com ação semelhante à da morfina, contudo com uma diferente estrutura química. Porém, o conceito deste termo sofreu evoluções e passou a inserir todas as substâncias naturais, semi-sintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores opioides, seja como agonista ou antagonista (MARTIN, 1983).

O ópio, substância original desse grupo farmacológico, é extraído da papoula, nome popular de *Papaver somniferum*, uma espécie da família das Papaveráceas (MAZÁK e cols., 2009). O termo ópio é uma derivação da palavra de origem grega “opus” que significa suco, pois o fármaco é retirado do suco da papoula (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Historicamente, o século XIX foi um período de acontecimentos relevantes neste campo relacionado ao sistema opioide. De acordo com Haller Jr (HALLER JR., 1989), o pesquisador William Collen publicou em 1808 no *Treatise on the Materia Medica* que “o ópio suspende o fluxo de mensagens dos nervos para o encéfalo e vice-versa, causando a abolição de toda a sensibilidade dolorosa e de qualquer outra irritação oriunda de qualquer parte do sistema”. Embora ainda fosse desconhecido o mecanismo de ação do ópio, ele se tornou um importante suporte no campo terapêutico da era Vitoriana (HALLER JR., 1989).

O fato mais importante deste século inclui a descoberta da morfina pelo assistente farmacêutico alemão Friedrich Sertürner. Ele identificou uma substância insolúvel em água, que denominou *principum somniferum*, farmacologicamente ativa em testes animais e foi identificada como um alcaloide. Em 1816 o termo foi substituído por *morphium*, em homenagem ao Deus grego do sono, e então pesquisou-se mais profundamente seu perfil químico e farmacológico (MACHT, 1915). Em um editorial publicado numa revista francesa, Gay Lussac propôs a substituição do termo novamente, desta vez chegando ao nome de morfina (HAMILTON e cols., 2000).

Alguns anos após a descoberta dos princípios ativos do ópio, o próprio descobridor Sertürner fez uma auto-experiência com a morfina e de acordo com os sintomas, relatou: “considero meu dever chamar a atenção para os efeitos terríveis dessa nova substância, a fim de que uma calamidade possa ser evitada” (BOOTH, 1998). Assim, a morfina, a primeira substância alcaloide extraída do ópio, já teve seus riscos anunciados pelo próprio pesquisador que a descobriu (DUARTE, 2005).

Já no século XX, a heroína foi proposta para substituir a morfina, já que aliviava os sintomas da síndrome de abstinência da morfina. Acreditou-se nisso por aproximadamente dez anos, até constatarem que a heroína também provocava dependência (BOOTH, 1998). A procura por novos fármacos opioides continuou e somente em 1939, foi descoberta a meperidina, o primeiro opioide sintético (MURPHREE, 1969).

Os efeitos dos opioides, mesmo os adversos, são decorrentes das complexas ligações com seus receptores específicos. Os tipos de receptores reconhecidos são mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) (KIEFFER e cols., 2009).

Os receptores opioides são expressos principalmente na medula espinhal, no córtex, tronco cerebral e sistema límbico. Algumas estruturais neuronais apresentam uma maior expressão de determinado receptor (MERRER e cols., 2009).

Evidências científicas sugerem que a analgesia supraespinhal feita pelos receptores opioides também ocorre a nível espinhal e periférico. Os opioides inibem a transmissão de impulsos nociceptivos através do corno posterior da medula e suprime reflexos espinhais nociceptivos, até mesmo em indivíduos com transecção da medula espinhal (RANG e cols., 2012).

Os receptores opioides periféricos são responsáveis pela inibição da descarga de terminações aferentes nociceptivas. E em condições de inflamação a expressão destes receptores é aumentada pelos neurônios sensitivos (SAWYNOK, 2003).

Os receptores μ são responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opioides, mas por alguns efeitos colaterais relevantes também, como depressão respiratória, euforia, sedação e dependência química (JONGKAMONWIWAT e cols., 2003). Os receptores δ têm papel principalmente na analgesia, mas também modulam funções cognitivas. Os receptores do tipo κ contribuem com a analgesia central. Além disso, tem participação na termorregulação e secreção neuroendócrina. Estão envolvidos em um pequeno número de efeitos indesejáveis, como sedação e disforia (BOWEN e cols., 2003).

A presença de opioides endógenos foi reconhecida também, com seus receptores localizados em neurônios aferentes primários, nervos entéricos e gânglios autonômicos (COGGESHALL, 1997). Os ligantes endógenos destes receptores foram identificados como encefalinas, dinorfinas e endorfinas. As encefalinas derivam da proteína precursora pré-pró-encefalina e apresentam alta afinidade pelos receptores μ e δ . Receptores κ possuem afinidade elevada por dinorfinas, que derivam da clivagem de pré-pró-dinorfina. As endorfinas se ligam a receptores μ e são derivadas da clivagem da proteína precursora pré-pró-opiomelanocortina (POMC) (PRZEWLOCKI e cols., 2001).

Os receptores do sistema opioide são acoplados a proteínas G inibitórias (Gi) (WALDHOER e cols., 2004). A partir da ativação do receptor, várias ações são desencadeadas, como inibição da adenilato ciclase com produção reduzida de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e outros segundos mensageiros. Os opioides aumentam a condução do íon potássio causando hiperpolarização de células alvo, assim há menos pulsos despolarizantes e inibição do influxo de cálcio. Como consequência dessas ações, a liberação de neurotransmissores fica reduzida e diminui também a geração do impulso pós-sináptico (GHELARDINI e cols., 2015).

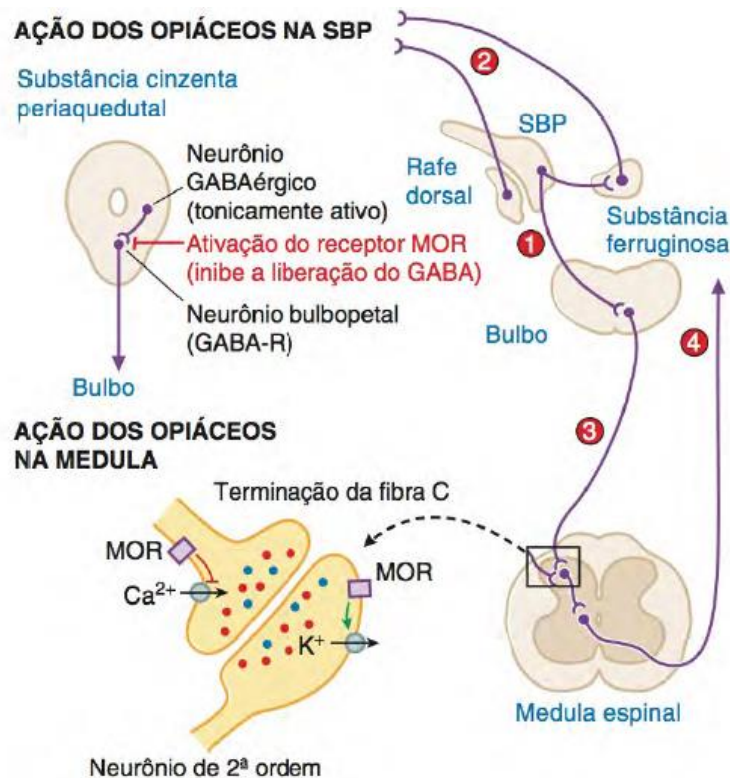


Figura 7 – Mecanismo de ação dos opiáceos na produção de analgesia: A ativação do receptor μ (também denominado de MOR) inibe a liberação do neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama-aminobutírico) pelos sistemas tonicamente ativos que, de outro modo, regulam as projeções ao bulbo (1), conseqüentemente há ativação da via sensitiva da SBP (substância branca periaquedutal), que ativa por sua vez, receptores de monoaminas no prosencéfalo (2), e da medula (3), que regulam as projeções espinhais (4). A partir daí, projeções sensoriais levam a informação para centros mais elevados do sistema nervoso central. Na parte inferior podemos demonstrar a ação dos opiáceos na medula espinal. Ocorre uma sinapse aferente primária com o neurônio de segunda ordem com a participação de receptores opiáceos pré e pós sinápticos, acoplados a canais de cálcio e potássio respectivamente. Antes da sinapse, a ativação do receptor μ (MOR) bloqueia a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem, gerando hiperpolarização. (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Uma série complexa de interações neuronais ocorre para que os opiáceos exerçam o efeito analgésico. A nível supra-espinhal, os fármacos opiáceos se ligam ao receptor μ que está localizado em neurônios GABAérgicos, inibindo-os. Essa inibição do neurônio GABAérgico permite a ativação de neurônios serotoninérgicos inibitórios descendentes (GHELARDINI e cols., 2015). Os neurônios inibitórios serotoninérgicos estimulam a liberação de opiáceos endógenos, através de interneurônios inibitórios espinhais, que por sua vez atuam sobre receptores opiáceos localizados na sinapse espinhal no corno dorsal da medula. O efeito analgésico é então produzido pela inibição da liberação de mediadores da via da dor, como o glutamato e a substância P, de neurônios aferentes

nociceptivos por intermédio da ativação dos receptores opioides espinhais (Figura 7) (YAKSH e cols, 1980).

Os opioides inibem o processamento da dor na coluna vertebral por dois mecanismos, um pré e um pós sináptico no corno dorsal superficial da medula espinhal (MILLAN e cols., 2002).

A substância gelatinosa (SG) contém células da glia e pequenas células nervosas, sua aparência gelatinosa é devido a uma concentração muito baixa de fibras mielinizadas. Estende-se por todo o comprimento da medula espinhal, recobrando a coluna posterior. A SG é caracterizada por altas densidades de neurônios contendo encefalina, terminais axônicos e sítios de ligação de opioides (ARVIDSON e cols., 1995) e, portanto, contribui diretamente no mecanismo de ação analgésico do sistema opioide (JENSEN E YAKSH, 1986).

A ligação do opioide e a proteína receptora específica (proteína G) ficam limitadas em grande parte à substância gelatinosa do corno dorsal superficial. Uma porcentagem significativa dos receptores opioides está associada às fibras C aferentes primárias peptidérgicas. Essa observação é compatível com a síntese e o transporte da proteína do receptor opioide pelas pequenas células do gânglio da raiz dorsal (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Os opioides podem atuar através de três principais mecanismos: ativação de canais de K^+ (mais especificamente um canal retificador interno dependente de proteína G, GIRK) (IKEDA e cols., 2002); inativação dos canais de Ca^{++} voltagem dependentes (IKEDA, 1996) e inibição da adenilato ciclase (HAWES e cols, 2000; MORAN e cols., 2000).

A confirmação da inibição pré sináptica depende principalmente do efeito inibitório direto, excitose do transmissor a partir de vesículas de armazenamento associadas à membrana, mas também na inativação de canais de Ca^{++} dependentes de tensão (IKEDA, 1996). Os opioides espinhais reduzem, por exemplo, a secreção da substância P, um dos principais transmissores peptídicos aferentes (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A inibição pós-sináptica depende da ativação dos canais GIRK, que por sua vez, induz a hiperpolarização da membrana associada ao aumento da condutância de potássio (IKEDA, 2002). Os opioides têm a capacidade de bloquear a excitação dos neurônios do corno dorsal evocada diretamente pelo neurotransmissor excitatório

glutamato, demonstrando uma ação de forma direta dos neurônios que tem projeção ao corno dorsal da medula espinhal (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Ações opioides adicionais incluem a ativação da proteína quinase C (SHUKLA e cols., 2006), liberação de cálcio de estoques intracelulares e ativação de MAP-quinases (SCHULZ e cols., 2004).

Em conjunto, a ação dos opioides ao diminuir a secreção de neurotransmissores excitatórios e a excitabilidade de neurônios do corno dorsal evidencia a potência destes fármacos na nocicepção a nível espinhal.

Os opioides modulam principalmente a resposta analgésica, mas também medeiam diversas atividades fisiológicas importantes, como função imunitária, controle respiratório e cardiovascular, regulação da homeostase e proliferação celular (FENG e cols., 2012).

Além do efeito agonista, a interação fármaco-receptor pode levar a um antagonismo. Os antagonistas opioides receberam importância na metade do século XX, com a busca de um antídoto para a superdosagem de fármacos agonistas, mais especificamente, o efeito adverso de grande depressão respiratória causadas por estas substâncias. A naloxona e a naltrexona, derivadas da oximorfona, são identificadas como sendo fármacos opioides antagonistas puros e interagem com os três tipos de receptores (μ , δ e κ) (GOODMAN & GILMAN, 2012).

O notável conhecimento já adquirido de fisiologia e farmacologia do sistema opioide permite que fármacos desta classe sejam administrados com segurança, buscando obter o máximo de analgesia e o mínimo de efeitos adversos (DUARTE, 2005). Estes efeitos adversos incluem sonolência, êmese, constipação e outros ainda mais graves como euforia, disforia e depressão respiratória (KELLEY e TEPPER, 2012). Além disso, muitos pacientes sofrem com a dependência química de opioides, além do desenvolvimento de tolerância no tratamento da dor crônica. Mas embora haja um reconhecimento que os opioides possam ter efeitos prejudiciais, esta classe de fármacos é ainda a mais eficaz em termos de analgesia (SEVERINO e cols., 2018). Essa relação pode se tornar ainda mais vantajosa quando houver avanços na pesquisa para conduzir uma identificação de mais subtipos de receptores, síntese de novos fármacos que sejam mais seletivos e com menos ocorrência de efeitos colaterais (DUARTE, 2005).

2.4 Receptores de potencial transitório – TRPs

Diversas tentativas são feitas para controlar satisfatoriamente as condições de dor crônica, e algumas continuam sem sucesso. A grande maioria dos casos envolvendo dor crônica é associada com atividade e excitabilidade alteradas de nervos periféricos, devido a processos inflamatórios iniciados por dano tecidual, físico, químico (por exemplo, fármacos antineoplásicos) ou por doenças biológicas (por exemplo, doenças metabólicas ou infecções) (SCHOLZ e cols., 2002; WOOLF, 2010). A excitabilidade aumentada de neurônios sensoriais primários ocasionada por estas patologias resulta em uma sinalização nociceptiva para o sistema nervoso central, o que conseqüentemente leva a percepção da dor.

Uma variedade de moléculas que agem na sinalização da dor periférica para o cérebro foi identificada em diferentes níveis do processamento da dor. Estas incluem mediadores, moléculas de sinalização intracelular, receptores de tirosina quinase e moléculas transdutoras (WHITE e cols., 2010; HEINZMANN e cols., 2011; LÖTSCH e cols., 2011; VAY e cols., 2012).

Dentre os diversos tipos de transdutores da informação nociceptiva, membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs, *Transient Receptor Potential*) têm sido descritos como o maior grupo de transdutores moleculares da hipersensibilidade mecânica e térmica que acompanha os estados crônicos da dor (BASBAUM e cols., 2009). Os receptores TRP são estruturas tetraméricas e formam uma família de moléculas que são agrupadas em seis subfamílias: TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina) e TRPP (policistina) (Figura 8). Todos estes receptores atuam como sensores para uma variedade de estímulos físicos inócuos e nocivos, como por exemplo, calor e frio (NILIUS e cols., 2011).

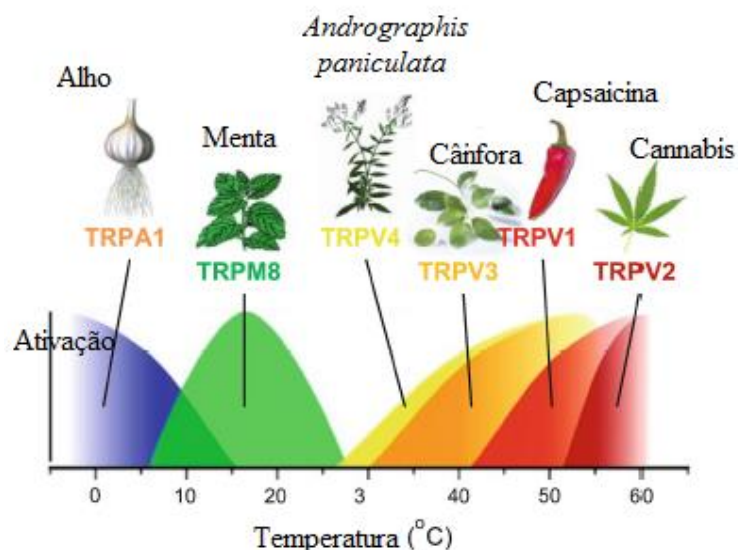


Figura 8 - Membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs) e suas moléculas ativadoras (STEPHEN e cols., 2014).

Entre esses canais, o TRPV1, é um canal de cátion ativado por estímulo térmico (calor) e pode ser estimulado por fatores inflamatórios, estando envolvido com o processamento nociceptivo. Também conhecido como receptor de capsaicina, foi clonado em 1997 a partir de gânglios da raiz dorsal de ratos (CATERINA e cols., 1997). A capsaicina, o ingrediente pungente da pimenta malagueta, é uma substância derivada das plantas do gênero *Capsicum*, família *Solanaceae*. A capsaicina é um vanilóide, já que contém um grupo vanilil na sua fórmula. O primeiro estudo sobre a estrutura da capsaicina se remete a 1920 (NELSON, 1920; FRIAS e cols., 2016). Esta substância tem ação excitatória em uma sub-população de neurônios sensoriais aferentes. Quando há interação dela com o receptor TRPV1, ocorre uma despolarização, e assim, excita os neurônios. Porém nem todos os neurônios são despolarizados pela capsaicina, a quimiosensibilidade é restrita a alguns neurônios aferentes somáticos e viscerais com condução de velocidade presente em fibras do tipo C. Os neurônios somáticos sensíveis à capsaicina incluem os nociceptores polimodais, que respondem a uma variedade de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, enquanto os neurônios viscerais medeiam reflexos autonômicos importantes.

Os efeitos da capsaicina são antagonizados de forma competitiva por um fármaco denominado capsazepina (WALPOLE e cols., 1994). Estudos farmacológicos demonstraram que a capsazepina é capaz de reverter a hiperalgesia mecânica em modelos de inflamação e dor neuropática em animais (WALKER e cols., 2003). Dessa

forma, parece evidente que o receptor TRPV1 é essencial em processos de hiperalgesia térmica e mecânica associados a processos inflamatórios e dano tecidual (CATERINA e cols., 2000).

O canal TRPV1 tem alta permeabilidade ao Ca^{2+} e é expresso nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, principalmente em fibras C (CATERINA e cols., 1997; PREMKUMAR e cols., 2012).

Em neurônios, o influxo de cálcio através do TRPV1 causa despolarização da membrana, levando à ativação de canais de sódio dependentes de voltagem e a geração de um potencial de ação. Recentemente foi relatado que a ação ativada pela capsaicina potencialmente segue uma interação física entre TRPV1 e anoctamina 1 (ANO1), um canal de cloreto ativado por cálcio, resultante da entrada de Ca^{2+} através do poro de TRPV1 e que tal interação é relevante para o aumento da dor. A capsaicina ativa canais de cloreto de forma extracelular através de um mecanismo dependente de cálcio nas células HEK293T que expressam TRPV1 e ANO1. Resultados de estudos com antagonistas do canal anoctamina 1 indicam uma interação entre TRPV1 e ANO1 e que tal mecanismo é significativo no aumento da dor no sistema periférico (TAKAYAMA e cols., 2015). De acordo com este estudo, o potencial de ação evocado pela capsaicina pode ser induzido por dois componentes: uma despolarização mediada pelo influxo de cátions causada pela ativação do TRPV1 e uma despolarização mediada pelo efluxo aniônico subsequente via ativação da anoctamina 1 (ANO1), um canal de cloreto ativado por cálcio, resultante da entrada de cálcio através do TRPV1. A interação entre TRPV1 e ANO1 é baseada em sua ligação física (TAKAYAMA e cols., 2015).

De um modo geral, o TRPV1 tem sido associado, além da sensação térmica (calor), à termorregulação autonômica, nocicepção, regulação da ingestão alimentar e múltiplas funções no trato gastrointestinal (SHARMA e cols., 2013).

A atividade do TRPV1 pode ser regulada pela fosforilação de moléculas que levam ao aumento da sensibilidade a estímulos químicos e térmicos. Essa é uma característica importante já que diversos mediadores inflamatórios ativam a proteína quinase A (PKA) e/ou a proteína quinase C (PKC), através de mecanismos relacionados a GPCR (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (VELLANI e cols., 2010). Por outro lado, acredita-se que a desfosforilação esteja subjacente à dessensibilização do TRPV1 mediada por cálcio.

Os efeitos mediados pela fosforilação de PKA e PKC diferem entre si. A sensibilização por PKC está associada a mudanças na ativação dependente de voltagem para mais potenciais negativos, aumentando a probabilidade da abertura de canais em condições normais ou em resposta a estímulos provocados por TRPV1 (MATTA e cols., 2007). De modo contrário, os efeitos associados a fosforilação da PKA estão mais associados a reversão da dessensibilização.

Uma característica marcante do TRPV1 é a dessensibilização mediada por cálcio, que leva a perda da sensibilidade à capsaicina ou outros agonistas químicos e a redução da sensibilidade ao calor (VYKLUCKY e cols., 1999). A dessensibilização do TRPV1 pela capsaicina está associada a uma diminuição da aparente afinidade por este agonista como as respostas podem ser recuperadas aumentando a concentração de capsaicina (NOVAKOVA-TOUSOVA e cols., 2007).

Além disso, a dessensibilização é menos acentuada em potenciais de membrana positivos, quando comparada a negativos (PIPER e cols., 1999), e isso não ocorre simplesmente pela redução do influxo de cálcio em potenciais positivos, levando a dessensibilização reduzida, mas parece refletir uma mudança na voltagem do TRPV1 dessensibilizado.

Diversos mecanismos são propostos para explicar a dessensibilização. Um deles é a desfosforilação do TRPV1 impulsionada pelo influxo de cálcio através de canais TRPV1 que ativam a calcineurina (PP3), uma fosfatase dependente de calmodulina (MOHAPATRA e cols., 2005). Esse mecanismo é consistente aos achados decorrentes de que a fosforilação de PKC e PKA é capaz de reduzir a dessensibilização de TRPV1 mediada por cálcio (NUMAZAKI e cols., 2002; MOHAPATRA e cols., 2003). O segundo mecanismo é dependente da estimulação de PLC levando a hidrólise de PIP2 (Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato). E um terceiro mecanismo proposto é a inativação envolvendo a ligação de cálcio-calmodulina ao receptor TRPV1 (NUMAZAKI, 2003).

2.5 Óxido nítrico

A descoberta do óxido nítrico (NO) como um mensageiro biológico em 1992 (CULOTTA e cols., 1992) fez com que essa molécula começasse a ter importância na comunidade científica. O Prêmio Nobel de 1998 em Fisiologia ou Medicina foi premiado pela “primeira descoberta de que um gás pode atuar como uma molécula

sinalizadora”, enfatizando que o NO é um mediador produzido por células de mamíferos (LEWIS e cols., 1998).

Em sistemas biológicos, o NO é um gás molecular gerado a partir de L-arginina pela atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (PALMER e cols., 1988). As diferentes isoformas de NO sintase foram identificadas e nomeadas de acordo com as respectivas células em que foram isoladas primeiramente: NOS neuronal (n-NOS), NOS induzida (i-NOS), induzida em macrófagos após estimulação com endotoxinas bacterianas, e NOS endotelial (e-NOS) (BREDT e cols., 1990; KNOWLES e cols., 1994; BRUCKDORFER, 2005).

O NO é um mediador relevante na nocicepção. Porém, evidências experimentais indicam que ele também pode ter um papel na indução de analgesia. A ação do NO na modulação nociceptiva é complexa e controversa, podendo apresentar um efeito duplo no processamento da dor (CURY e cols., 2011).

O conhecimento sobre o papel do óxido nítrico em diferentes tipos de dor foi derivado principalmente através de experimentos em animais examinando a expressão das isoformas da NOS em relação a um estímulo nociceptivo. Esta teoria é apoiada pela observação de que a expressão dessas enzimas é rapidamente regulada positivamente em neurônios do corno dorsal da medula espinhal após uma estimulação nociva periférica (MELLER e cols., 1993).

O óxido nítrico atua através de uma cascata de sinalização intracelular. O principal alvo do NO é a guanilil ciclase, a sua ativação resulta na conversão de trifosfato de guanosina para o segundo mensageiro GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) (FRIEBE e cols., 2003). Essa cascata de sinalização NO/GMPc é importante no sistema cardiovascular e no sistema nervoso, atuando no relaxamento da musculatura lisa e modulação da transmissão sináptica (GARTHWAITE e cols., 1988).

A via de sinalização NO-GMPc também contribui para o desenvolvimento de hiperalgesia em modelos animais, através da ativação da PKG (proteína quinase dependente de GMPc) (SCHMIDTKO e cols., 2003). No entanto, diferentes estudos demonstraram atuação da via NO-GMPc no efeito analgésico de diversos fármacos que são indicados para o tratamento de dor neuropática, como o tramadol (DAL e cols., 2006), gabapentina (MIXCOATL-ZECUATL e cols., 2006; ORTIZ e cols., 2006). E também no efeito antinociceptivo de fármacos como a indometacina (VENTURA-MARTINEZ e cols., 2004). Outros estudos indicam que a morfina induz, em neurônios

nociceptivos, um aumento na abertura de canais de K^+ sensíveis a ATP, mediados pela via NO-GMPc, e em seguida ocorre uma hiperpolarização do neurônio (CUNHA e cols., 2010) (Figura 9).



Figura 9 – Morfina ativando a via NO-GMPc Adaptada de Cury e cols., 2011.

Outras vias de sinalização interagem com a via NO-GMPc, como as vias colinérgica, adrenérgica, purinérgica e peptidérgica (GARTHWAITE, 2008). Na pesquisa sobre nocicepção, o funcionamento específico dessas interações ainda não está totalmente esclarecido (MICLESCU e cols., 2009).

O papel do óxido nítrico no processo inflamatório ainda não foi totalmente esclarecido, já que ele é produzido por diversas células e participa de todos os estágios da inflamação. Assim como no sistema imune, a regulação e função do óxido nítrico dependem de sua concentração, da localização em que foi sintetizado e se as células que o produziram passaram por uma ativação prévia ou não (XIE e cols, 1994).

Estudos realizados por STUEHR e MARLETTA em 1985 comprovaram que macrófagos de camundongos produziam nitrito e nitrato em resposta a lipossacarídeo bacteriano (LPS) e um composto com a reatividade de NO provou ser um intermediário no processo (MIWA e cols., 1987).

Desde então, diversos estudos posteriores sobre os efeitos do NO foram realizados. Concentrações mais elevadas de NO são relacionadas a estímulos inflamatórios e desencadeiam efeitos pró-inflamatórios. No entanto, como a maioria dos mediadores inflamatórios, o NO também tem efeitos protetores em alguns casos dentro da inflamação (RIKU e cols., 2005).

O NO desempenha um papel relevante na função vascular durante a inflamação, sendo um vasodilatador potente. Além disso, reduz a agregação plaquetária, inibe funções dos mastócitos induzidos por inflamação e serve como um regulador no recrutamento de leucócitos (GARCIA e cols., 2006) (Figura 10).

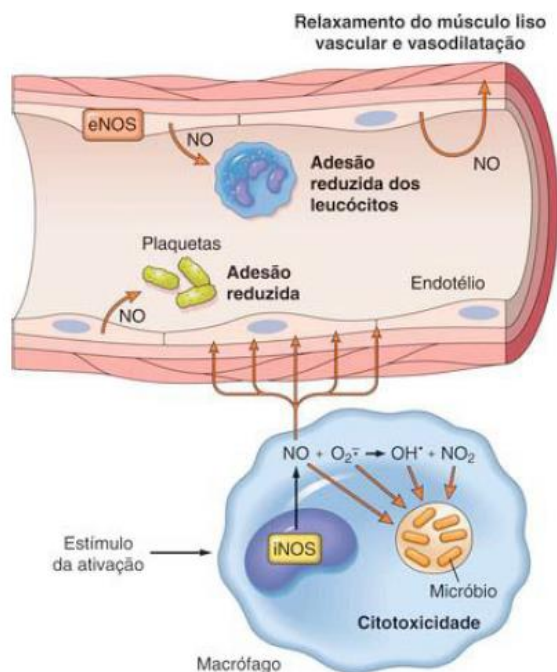


Figura 10: Efeitos do NO no processo inflamatório. O NO produzido via NOS_e (óxido nítrico sintase endotelial) e via iNOS (óxido nítrico sintase induzível) leva a uma resposta vasodilatadora, redução da adesão de leucócitos e plaquetas. O NO também tem caráter de citotoxicidade aos micróbios (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Altos níveis de NO produzido por uma variedade de células parecem limitar a replicação de bactérias, helmintos, protozoários e vírus, com risco de dano inflamatório potencial a células e tecidos do hospedeiro (ROBBINS & COTRAN, 2010). O NO também pode desempenhar um papel no dano tecidual devido a sua citotoxicidade, não apenas para microorganismos invasores, mas também para células que o produzem e células vizinhas. O NO, em algumas situações, pode interagir com produtos derivados de oxigênio, radicais livres, para gerar moléculas que poderiam aumentar sua citotoxicidade (GARCIA e cols., 2006).

O subtipo endotelial (eNOS) é responsável pela manutenção do tônus vascular baixo e diminuição do recrutamento e adesão de leucócitos à parede vascular. A NOS constitutiva neuronal (nNOS) atua como um neuromodulador em alguns neurônios centrais e em terminações nervosas "não colinérgicas e não adrenérgicas" periféricas

(NANC). O NO formado pela NOS induzível (iNOS) em macrófagos e outras células desempenham múltiplos papéis no processo inflamatório (GUZIK e cols., 2003).

Em contraste com as isoformas constitutivas na NOS, a iNOS não depende de um aumento na concentração de cálcio intracelular para iniciar sua atividade. A indução de iNOS pode ser deflagrada por citocinas inflamatórias como IFN- γ ou TNF- α ou IL-1 β (HEBA e cols., 2001). Porém, o indutor mais reconhecido é o LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), responsável pelo desenvolvimento da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) no curso da sepse bacteriana (desencadeada por bactérias gram-negativas) (XIE e cols., 1994).

As células mieloides têm um receptor para LPS em sua membrana celular, a proteína m-CD14. Através de uma proteína ancoradora, a proteína de ligação ao LPS (LBP), o LPS é ancorado ao m-CD14 e uma cascata de sinalização celular é ativada, o que leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B (XIE e cols., 1994; MATSUNO e cols., 1998).

A família dos fatores de transcrição NF- κ B tem um papel central na regulação das respostas inflamatórias, incluindo proliferação de células T e B, expressão de citocinas e moléculas de adesão, bem como uma regulação da apoptose. A ativação do NF- κ B está envolvida em uma série de estados patológicos, como asma, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal (TAK e cols., 2001).

De uma maneira semelhante, o LPS também pode induzir COX-2. Embora o NO atenda funções mais parácrinas que autoendócrinas, altas concentrações de NO gerado pela iNOS pode inibir a própria iNOS, bem como a COX-2, em um *feedback* negativo. A ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) pode desempenhar um papel importante na regulação da indução de iNOS. A ativação deste receptor leva a diminuição da apoptose (SLOMIANY, 2002). Os glicocorticosteróides e algumas citocinas, como TGF- β , IL-4 ou IL-10, inibem a indução de iNOS (GUZIK e cols., 2003).

Diante do exposto, é provável que o óxido nítrico tenha um papel multifacetado nas reações inflamatórias, variando da participação na vasodilatação e formação do edema e atividade leucocitária até a provável citotoxicidade tecidual (GARCIA e cols., 2006).

2.6 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico tem um papel bastante relevante em diversas funções vitais, como o aprendizado, a memória e a organização cortical do movimento (MESULAM e cols., 2002). A acetilcolina (ACh) é um dos mais relevantes neurotransmissores do organismo, tem ação tanto no sistema periférico quanto no central modulando mecanismos simpáticos e parassimpáticos (TIWARI e cols., 2013).

Enquanto uma porcentagem de ACh é derivada de estruturas supra-espinhais, como o núcleo magno da rafe (NRM) e vários outros núcleos medulares, a visão predominante é que neurônios intrínsecos do corno dorsal da medula espinhal são a fonte principal de ACh (CORDERO e cols., 2001). Ela é sintetizada no citosol dos neurônios a partir da acetil coenzima-A (acetil-CoA) e da colina. A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sintetizada, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas. No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo este neurotransmissor ficam armazenadas até que haja um estímulo que as libere (SILVA, 2010). Então, um potencial de ação leva a despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a condutância do cálcio, favorecendo sua entrada no axônio. Desta forma, a liberação de acetilcolina depende diretamente da concentração do íon cálcio. A partir daí, a ACh pode ser degradada pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase BChE, ou interagir com receptores colinérgicos específicos (PRADO e cols., 2002).

Os receptores muscarínicos (mAChRs) são acoplados a proteína G. M₁, M₃ e M₅ se acoplam a proteína G_q, e a partir da ativação de PLC e MAPK ocorre aumento da concentração intracelular de cálcio. Já os receptores M₂ e M₄ se ligam predominantemente a proteína G_i, causando inibição da adenilatociclase e inibindo os canais de cálcio dependentes de voltagem (WESS e cols., 2007).

Os receptores nicotínicos (nAChRs) são em sua maioria canais heteropentaméricos. O influxo de cálcio desempenha um relevante papel na sinalização metabólica intracelular (DANI, 2015; NEMECZ e cols., 2016).

A regulação da nocicepção pode ter envolvimento do sistema colinérgico tanto na medula espinhal quanto em regiões superiores do sistema nervoso central (NASER e cols., 2018). Altas concentrações de ACh na medula espinhal induz antinocicepção (MATSUMOTO e cols., 2007). A região protagonista de processos colinérgicos na

medula é a lâmina II, com uma grande quantidade de neurônios, a maioria das células sintetiza o neurotransmissor GABA e podem co-expressar óxido nítrico sintase, dessa forma modula a nocicepção nos segmentos nos quais a informação percorre (MESNAGE e cols., 2011). No sistema nervoso central algumas estruturas se destacam na modulação colinérgica envolvida com a nocicepção, como a amígdala, o córtex somatossensorial, córtex insular, córtex cingulado anterior e córtex medial pré frontal, relacionadas principalmente a processos cognitivos e de percepção da dor (NASER e cols., 2018).

Os receptores muscarínicos (principalmente o subtipo M₂) parecem ter uma importância maior na modulação da nocicepção quando comparados aos nicotínicos. A ativação direta de mAChRs reduz a dor em roedores e em humanos e, inversamente, a inibição de mAChR espinhais induz hipersensibilidade nociceptiva (FIORINO e cols., 2012). Estudos de eletrofisiologia indicam que receptores muscarínicos pré-sinápticos são expressos nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigeminal. Os fármacos agonistas muscarínicos diminuem a probabilidade de liberação de glutamato nos neurônios do corno dorsal (JEONG e cols., 2013).

Estudos feitos com receptores nicotínicos ainda são inconclusivos, mas até agora indicam que eles podem funcionar como moduladores positivos no aumento das concentrações de cálcio (SHELUKHINA e cols., 2015). A ativação de receptores nicotínicos via administração exógena de agonistas potencializa a transmissão excitatória na medula espinhal via $\alpha 7$ -nAChRs e NMDARs, sugerindo um mecanismo de hiperalgesia nicotínica exógena (GENZEN e cols., 2003).

A partir de estudos farmacológicos, há evidências de uma relação entre o sistema opioide e o sistema colinérgico no processo nociceptivo (NASER e cols., 2018). Foi descoberto que a morfina aumenta os níveis de acetilcolina na região do corpo estriado no sistema nervoso central e induz antinocicepção (GREEN e cols., 1976). Além disso, a administração de antagonistas muscarínicos reverteu os efeitos de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) na analgesia opioide (GAWEL e cols., 2017).

A modulação de neurônios opiodérgicos pelo sistema colinérgico também é relatada. Altas concentrações de ACh na medula espinhal aumentam os níveis de opioides endógenos, como encefalinas, endorfinas e dinorfinas, enquanto a inibição de receptores muscarínicos as diminuem (YANG e cols., 2012).

De acordo com todo o embasamento descrito acima é possível refletir sobre o manejo terapêutico envolvendo o sistema colinérgico no tratamento da dor. Os inibidores de acetilcolinesterase e os agonistas muscarínicos podem ser apontados como uma linha promissora em diversas condições de dor crônica. Juntamente com os opioides, os fármacos relacionados ao sistema colinérgico podem ser uma oportunidade de inovação na terapia analgésica (NASER e cols., 2018).

2.7 Origem do composto *cis*-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS19)

Os estudos iniciaram-se em 2006 com a obtenção do composto ácido (±)-*cis*-(6-etil-tetrahidropirano-2-il)-fórmico. Sua atividade foi comparada à morfina em modelos nociceptivos e inflamatórios. Os resultados demonstraram que a naloxona (antagonista opioide não seletivo) reverteu o efeito do composto quando administrada previamente aos modelos experimentais, sugerindo a participação do sistema opioide no efeito nociceptivo deste novo composto (MARINHO e cols., 2006).

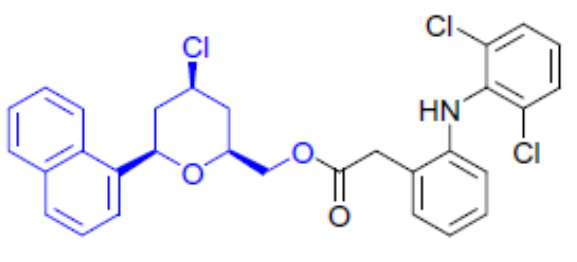


Figura 11 - Estrutura química do composto *cis*-(±)-acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila

Posteriormente, modificações químicas foram realizadas com o objetivo de melhoria da atividade antinociceptiva e também diminuição de efeitos adversos. Foram criadas 10 moléculas derivadas do ácido (±)-*cis*-(6-etil-tetrahidropirano-2-il)-fórmico, dentre estas, uma molécula se destacou como sendo a mais promissora, o composto CTHP (composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2h-pirano-2-il-metano) (CAPIM e cols., 2012). A administração sistêmica de CTHP reduziu a nocicepção induzida por estímulos químicos e térmicos. Evidências indicam o envolvimento tanto do sistema opioide quanto da via NO/GMP_c/K_{ATP} no mecanismo de ação do CTHP (GONÇALVES e cols., 2016).

A síntese de compostos através da hibridação molecular é um ramo promissor na química medicinal dos últimos anos. Um composto híbrido é definido como uma molécula que contém em uma única estrutura dois farmacóforos com comprovada atividade biológica (CAPIM e cols., 2013). O composto LS19 (Figura 11) foi originado a partir da hibridação dos seguintes fármacos: CTHP e diclofenaco de sódio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os mecanismos responsáveis pelas atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e toxicológica do composto LS19.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva do composto LS 19 sobre a dor aguda;
- Avaliar a possibilidade de interferência da performance motora sobre o efeito antinociceptivo demonstrado pelo composto LS 19;
- Avaliar a participação dos sistemas opioide, colinérgico, nitrérgico e vaniloide no mecanismo de ação antinociceptivo do composto LS19;
- Avaliar a atividade antiedematogênica do composto LS 19;
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas cicloxigenases 1 e 2 frente ao composto LS19;
- Avaliar a migração de leucócitos totais;
- Quantificar a produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IFN- γ e IL-10) e óxido nítrico;
- Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do composto LS 19.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com peso de 20-25g. O protocolo para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS – UFRRJ) – sob o número 011/2017. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo

claro-escuro de 12h. Água e alimentação foram mantidas à disposição dos animais, porém a ração foi retirada 8h antes da administração oral do composto.

4.2 Tratamentos

- Solução salina: Solução NaCl 0,9%. A solução foi administrada aos animais pertencentes ao grupo controle.
- Veículo: água destilada com dimetilsulfóxido, na concentração de 1,5% (v/v), para a solubilização do composto. A solução veículo foi administrada aos animais pertencentes ao grupo veículo nos diferentes modelos.
- Solução de ácido acético: foi preparado na concentração de 0,8% (v/v) em solução salina e injetado por via intraperitoneal (i.p), 60 minutos após a administração oral do composto LS19, diclofenaco, solução salina ou veículo no modelo de contorções abdominais.
- Solução de formalina: foi preparada na concentração de 2,5% (v/v) em solução salina e injetada em uma das patas traseiras dos animais, 60 minutos após a administração oral do composto LS19, morfina, diclofenaco, solução salina ou veículo no modelo de formalina.
- Solução de carragenina: foi preparada na concentração de 10 mg/ml. Administrada em volume de 0,1 mL, 60 minutos após a administração oral do composto LS19, dexametasona, solução salina ou veículo no modelo de edema de pata e de bolsa de ar subcutâneo. No modelo de edema de pata a solução foi administrada em uma das patas traseiras dos animais e no modelo de bolsa de ar subcutâneo foi administrada na bolsa subcutânea estéril.
- Composto: cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS19). Administrado por via oral (v.o) nas doses de 10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$.
- Morfina: agonista de receptores opioides. Utilizada como controle positivo nos modelos de formalina e rotarod. Administrado por via oral (v.o) na dose de 12 $\mu\text{mol/kg}$, baseado em OLIVEIRA e cols., 2018.
- Fentanil: agonista de receptores opioides. Utilizado como controle positivo no modelo de imersão da cauda em água quente, administrado por via subcutânea (s.c) na dose de 0,6 $\mu\text{mol/kg}$.

- Diclofenaco de sódio: anti-inflamatório não esteroidal. Utilizado como controle positivo nos modelos de contorções abdominais e de formalina. Administrado por via oral (v.o) na dose de 500 µmol/kg.
- Dexametasona: anti-inflamatório esteroidal. Utilizado como controle positivo nos modelos de edema de pata e bolsa de ar subcutânea. Administrado por via subcutânea (s.c.) na dose de 5,7 µmol/kg, baseado em SANTOS e cols., 2015.
- Capsaicina: agonista TRPV1. Administrado 0,02 mL de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata direita traseira do camundongo no modelo de nocicepção induzida por capsaicina e no modelo de placa quente.
- Capsazepina: antagonista dos receptores vanilóides TRPV1. Administrada por via intraperitoneal (i.p) na dose de 13,3 µmol/kg no modelo de nocicepção induzida por capsaicina e no modelo de placa quente, baseado em LOPES e cols., 2013.
- Naloxona: antagonista não-seletivo opioide. Administrado por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 9 e 15 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em STEFANO e cols., 2017.
- N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME): inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase. Administrado por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 3,7 e 18,5 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em MBIANTCHA e cols., 2017.
- 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ): inibidor da enzima guanilato ciclase. Administrado por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 10,7 e 26,7 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em MBIANTCHA e cols., 2017.
- Glibenclamida: bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis a ATP. Administrado por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 2,02 e 10,1 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em MBIANTCHA e cols., 2017.
- Naltrindol: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo δ. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 7,2 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016.

- Metilnaltrexona: antagonista seletivo periférico de receptor opioide do tipo μ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016.
- Nor-binaltorfimina: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo κ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 4,5 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016.
- Atropina: antagonista não-seletivo de receptor muscarínico colinérgico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 10,3 e 17,2 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em ROSAS-BALLINA e cols., 2011.

4.3 Modelos experimentais

4.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este modelo é usado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER e cols., 1959). Solução salina, veículo, diclofenaco (500 $\mu\text{mol/kg}$) e o composto LS 19 (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral. As contorções abdominais são induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (0,8%). A contagem do número de contorções é iniciada imediatamente após a injeção e permanece por um período de 30 minutos (Figura 12). O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem é o aparecimento de fortes contrações abdominais, alongamento de todo o corpo do animal, seguido pelo alongamento dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontra.

Curvas dose-resposta foram construídas a partir da administração de doses crescentes do composto LS19 (10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$) e de seus precursores (CTHP e diclofenaco). A partir destas curvas foram calculados o DI_{50} destes.

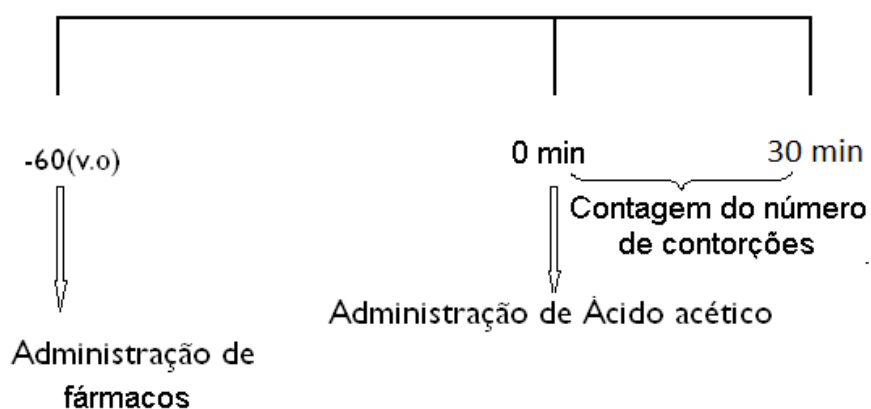


Figura 12 - Protocolo do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

4.3.2 Teste da formalina

Este modelo é utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e HOLE., 1987). Solução salina, veículo, morfina (12 $\mu\text{mol/kg}$), diclofenaco (500 mg/kg) e o composto LS19 (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral. Injeta-se 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5% em uma das patas traseiras. Posteriormente, mede-se o tempo (em segundos) que o animal permanece lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo é feita em duas fases: a primeira chamada neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase chamada inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção (Figura 13).

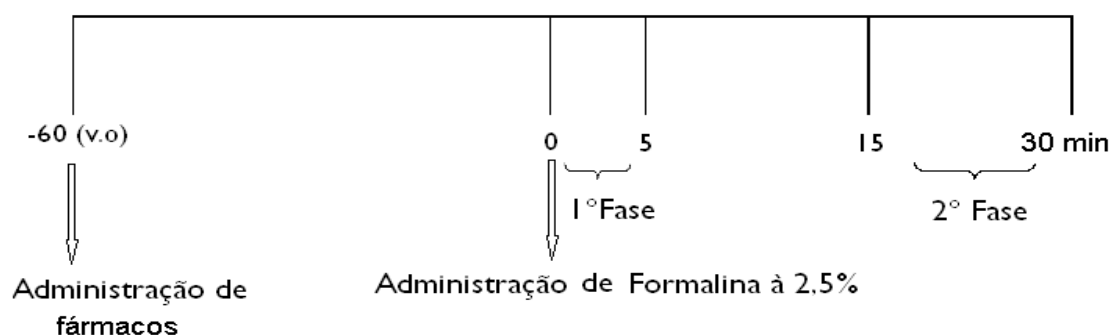


Figura 13 - Protocolo do modelo da formalina

4.3.3 Modelo de imersão da cauda em água quente

Este modelo é utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva não inflamatória (BEN-BASSAT e cols., 1959). Os animais foram tratados com solução salina, veículo e o composto LS 19 (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) por via oral, assim como fentanil (0,6 $\mu\text{mol/kg}$) no grupo controle positivo, por via subcutânea. Neste modelo, o animal foi imobilizado dentro de um recipiente cilíndrico e a cauda foi imersa (aproximadamente 2 cm) em banho-maria com água aquecida a uma temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. Mediu-se o tempo (em segundos) em que o animal demorou a retirar a cauda de dentro da água, tempo este chamado de “tempo de latência”. Foram feitas oito medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração dos fármacos (e foram chamadas de medidas controle) (Figura 14). A média das medidas controle foi denominada “linha de base”. Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um “cut-off” de 3 vezes o valor da linha de base. Os resultados são expressos como tempo de reatividade em segundos.

Na tentativa de elucidação do mecanismo de ação do composto LS 19, grupos experimentais receberam antagonistas específicos (L-NAME, ODQ, glibenclamida, atropina, naloxona, metilnaltrexona, nor-binaltorfimina e naltrindol) por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração oral do composto.

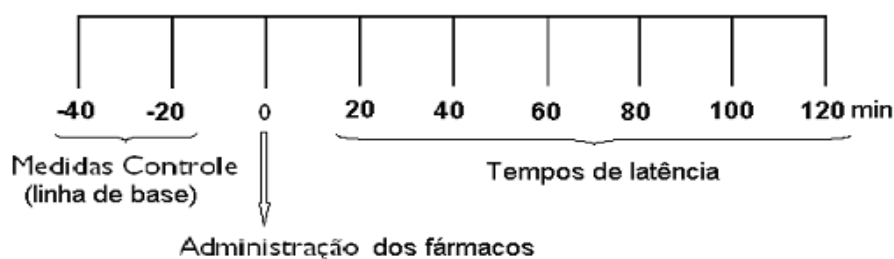


Figura 14 - Protocolo do modelo de imersão da cauda em água quente

4.3.4 Modelo de nociceção induzida por capsaicina

Este modelo foi realizado como descrito por SAKURADA e cols (1998) com o objetivo de verificar a participação dos receptores TRPV1 sobre a nociceção. Solução salina, veículo e o composto LS 19 (100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral, assim como a capsazepina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$) foi administrada por via intraperitoneal 60 minutos antes da administração da capsaicina. Um volume de 0,02 mL de solução de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) foi administrado por via intraplantar, na pata traseira direita do animal. Após a injeção de capsaicina, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de vidro espelhada e o tempo de lambertura da pata injetada com capsaicina foi cronometrado e registrado (em segundos), durante um período de 5 min (figura 15). A ação de lambertura foi considerada como reação ao estímulo nocivo.

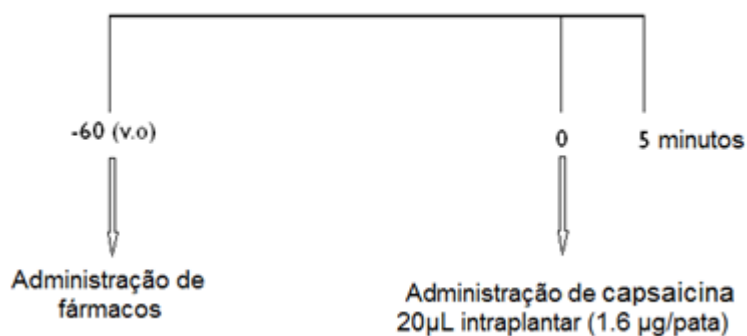


Figura 15 - Protocolo do modelo de nociceção induzida por capsaicina

4.3.5 Modelo de placa quente

Este modelo foi realizado como descrito por (SAHLEY e BERNTSON, 1979) com o objetivo de avaliar a atividade do composto sobre a hiperalgesia inflamatória induzida pela capsaicina. Neste modelo os animais foram colocados em uma placa aquecida a uma temperatura de $55 \pm 1^\circ\text{C}$. Registrou-se (em segundos) o tempo que o animal levou para retirar e/ou lambere as patas traseiras, denominado como tempo de latência. Solução salina, veículo e o composto LS 19 (100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral, assim como a capsazepina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$; i.p.), 60 minutos antes da administração de capsaicina. Um volume de 0,02 mL de solução de capsaicina

(1,6 µg/pata) foi administrado por via intraplantar, na pata traseira direita do animal. Três horas após a injeção da solução de capsaicina, os animais foram submetidos ao modelo da placa quente (Figura 16).

A pele das patas traseiras injetadas com capsaicina e não-injetadas foi removida após a realização do teste da placa quente. As amostras dos tecidos foram armazenadas à - 80°C para serem posteriormente processadas.

As amostras de tecido foram homogeneizadas em solução salina tampão-fosfato (pH 7,4) contendo: 0,4M NaCl; 0,05% Tween 20; 0,5% albumina sérica bovina; 0,1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoreto; 0,1 mM cloreto de benzetônio; 10 mM EDTA e 20 UI aprotinina. Os homogenados foram depois centrifugados a 12000 x g por 60 min à 4° C. As concentrações de citocinas no sobrenadante dos tecidos homogeneizados foram medidos através de kit's de imunoenensaio enzimático (ELISA Kit Mouse, Cayman Chemical®), os quais mensuram as concentrações de IL-1β e TNF-α através do método de ELISA.

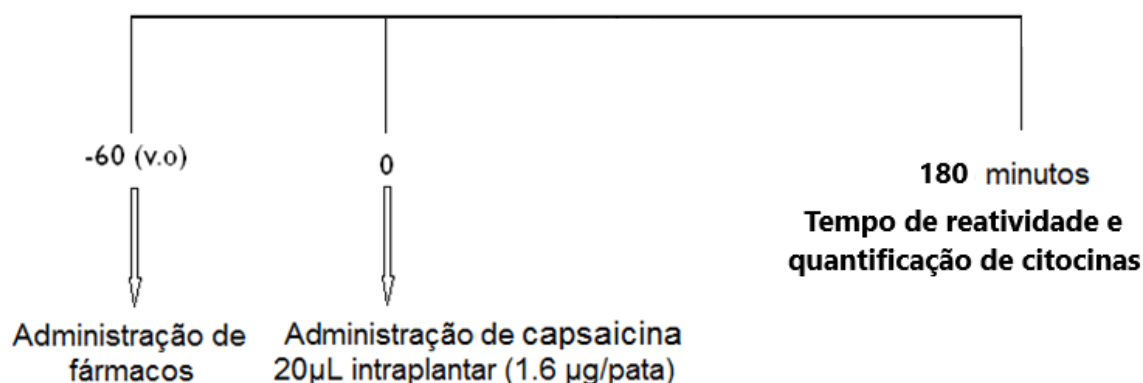


Figura 16 - Protocolo de placa quente e quantificação de citocinas induzida por capsaicina

4.3.6 Teste de Rotarod

Este modelo é realizado para avaliar a integridade do sistema motor dos animais. Solução salina, veículo, morfina (12 µmol/kg) e o composto LS 19 (10, 100 e 300 µmol/kg) foram administrados por via oral. O procedimento da barra giratória, descrito por DUNHAM E MIYA (1957), é capaz de detectar prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade e é executado em um aparelho composto por uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e de 50 cm de comprimento. O procedimento

consiste na avaliação da capacidade do animal em se manter sobre uma barra que gira a uma velocidade de 20 rpm, permitindo-se até três reconduções após queda, durante o período de avaliação que é de 1 minuto (Figura 17). Considerando que uma parcela dos animais pode não ser naturalmente apta a se manter sobre a barra giratória, procedeu-se a uma pré-seleção na qual foram descartados de todo o procedimento os animais não-aptos. Esta pré-seleção consistiu de uma sessão experimental realizada no dia anterior ao do teste. A avaliação consiste na contagem do número de quedas no intervalo de 1 minuto.

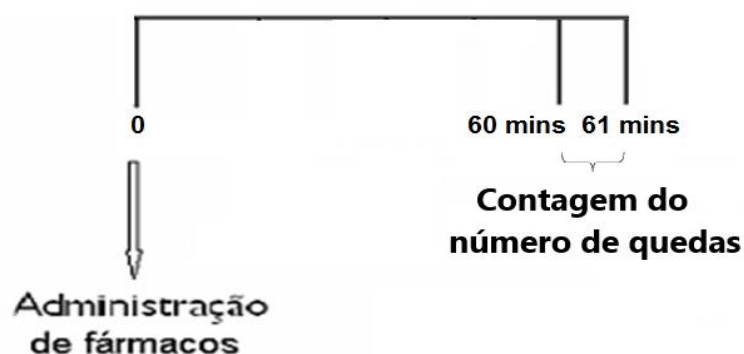


Figura 17 - Protocolo do teste de Rotarod

4.3.7 Modelo de edema de pata

Este modelo de avaliação edematogênica utiliza a técnica de pletismografia (FERREIRA, 1979), que consiste na utilização do pletismômetro, um equipamento capaz de registrar pequenas variações no volume de líquido deslocado pela inserção da pata, até a articulação tíbio-társica. Solução salina, veículo e o composto LS 19 (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral, e a dexametasona foi administrada por via subcutânea (5,7 $\mu\text{mol/kg}$). 60 minutos após a administração dos fármacos, o edema foi induzido pela injeção intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%, p/v) na pata esquerda do animal. Na pata direita injeta-se o mesmo volume de solução salina. O edema é avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina (Figura 18).

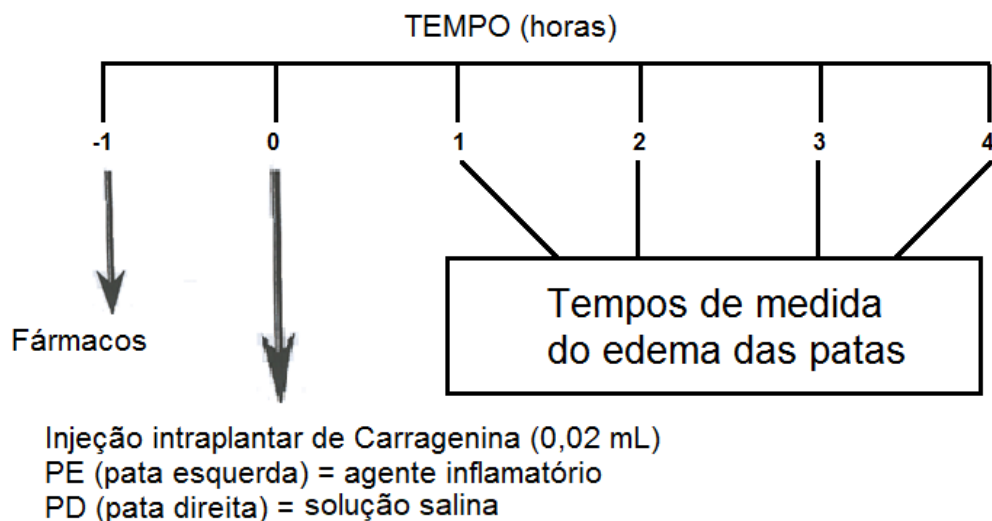


Figura 18 - Protocolo do modelo de edema de pata

4.3.8 Modelo da bolsa de ar subcutâneo

A bolsa de ar subcutâneo foi realizada como descrito por VIGIL e cols., 2008. Solução salina, veículo e o composto LS 19 (100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral, e a dexametasona foi administrada por via subcutânea (5,7 $\mu\text{mol/kg}$). Uma área do dorso dos animais (3cm x 2,5 cm) foi desinfetada. 7 mL de ar estéril foi injetado subcutaneamente em um único ponto. As bolsas de ar foram injetadas com ar estéril em dias alternados por 3 dias. Durante este período, eritema, inchaço, exsudação e vazamento de ar não sendo observados sugerem que o modelo foi estabelecido com sucesso. No quarto dia, os animais receberam carragenina (1%) administrada por via subcutânea no interior da bolsa de ar subcutâneo e 4 horas depois foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital (Figura 19). Os animais foram então fixados em uma mesa cirúrgica e uma incisão na pele foi feita para perfurar a bolsa de ar. A cavidade subcutânea foi lavada com 1 ml de tampão fosfato salina estéril (pH 7,6 contendo NaCl (130 mM), Na_2PO_4 (5 mM) e KH_2PO_4 (1 mM) e heparina (20 UI/mL) em água destilada. Após a eutanásia, as amostras de lavado subcutâneo foram coletadas.

Uma alíquota de 20 μL do lavado subcutâneo de cada animal foi transferida para um Eppendorf® contendo 380 μL de líquido de Türk, possibilitando assim a coloração

percentual da razão entre a taxa de ligação de uma amostra e a taxa de ligação máxima (%B/B₀) e do log da concentração de prostaglandina em pg/mL. Este gráfico permitiu a obtenção de valores referentes à concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela ação das enzimas COX-1 e COX-2 e também a porcentagem de inibição de ambas as enzimas frente à utilização de doses crescentes do LS19.

4.3.11. Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica

Foi realizado modelo de toxicidade aguda, ou chamado também de dose fixa de acordo com o modelo experimental descrito por LORKE (1983) a fim de determinar os valores de DL₅₀. Uma única dose oral de LS19 (300 µmol/kg) foi administrada a um grupo de animais. Foi considerada a dose de acordo com os critérios de classificação da comunidade Europeia (OGA, 2003). Os animais foram colocados posteriormente em uma câmara de observação.

A avaliação da toxicidade subcrônica foi realizada através da exposição repetida de LS19 na dose de 100 µmol/kg por 14 dias v.o. (adaptado de OGA 2003) a fim de verificar se o tratamento subcrônico produziria algum efeito tóxico não observado no modelo agudo. Um grupo controle foi administrado com solução salina e foi exposto ao mesmo protocolo.

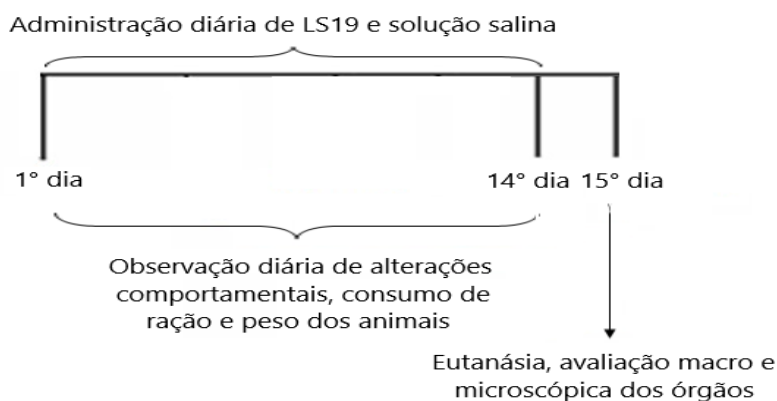


Figura 20 - Protocolo da avaliação toxicológica sub-crônica

Parâmetros comportamentais foram avaliados na avaliação da toxicidade subcrônica por um período de 14 dias e incluíram a observação de convulsão, hiperatividade, perda do reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação. O peso dos animais e o consumo de ração foram avaliados. No 15º dia, todos os animais foram

eutanasiados por sobredose anestésica e os órgãos: pulmões, rim, fígado, intestino e estômago, foram retirados, pesados e avaliados macroscopicamente e microscopicamente. A análise microscópica foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Setor de Anatomia Patológica (SAP) - UFRRJ da professora Vivian de Assunção Nogueira Carvalho.

4.4 Análise estatística

Os grupos experimentais foram constituídos por 6 animais. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (One-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, rotarod, placa quente e modelo de indução de nocicepção por capsaicina e bolsa de ar subcutâneo. E foi realizada pela aplicação de análise de variância (Two-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os testes de imersão da cauda em água quente e edema de pata. Os valores de p menor que 0,05; 0,01 e 0,001 foram usados como nível de significância. O método de regressão não-linear foi usado para o cálculo de DI50 do composto LS19 e seus precursores no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e cálculo de CI50 na avaliação da atividade COX.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração oral do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) nas doses de 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$ e diclofenaco (300 $\mu\text{mol/kg}$) foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle, indicando atividade antinociceptiva deste composto de forma dose dependente (Figura 20).

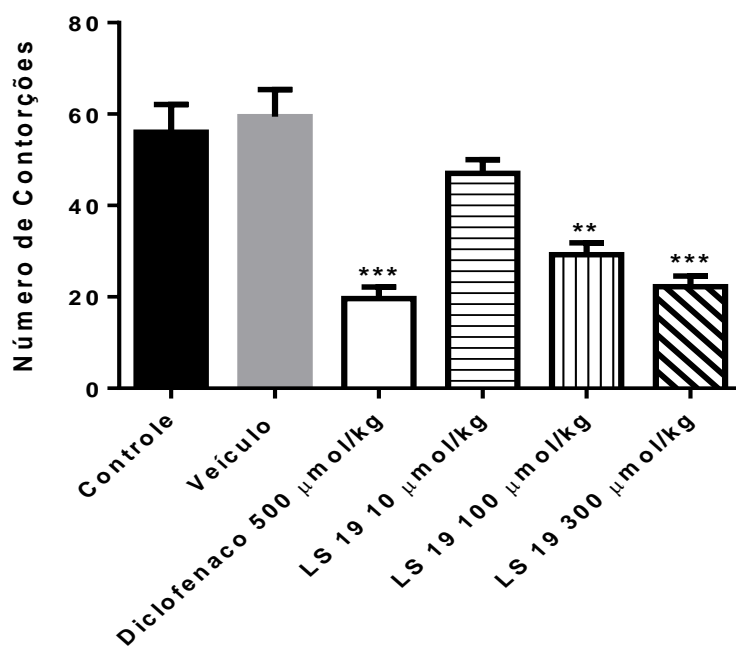


Figura 21 - Efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, diclofenaco (500 $\mu\text{mol/kg}$) e LS 19 - 10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (**p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com diclofenaco, veículo e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 1 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Tratamentos	Número de contorções (Média ± EPM)	Inibição (%)
Controle	56,0 ± 6,1	---
Veículo	58,8 ± 6,2	---
Diclofenaco 500 µmol/kg	19,7 ± 2,2***	64,8%
LS19 10 µmol/kg	47,0 ± 3,1	16,1%
LS19 100 µmol/kg	29,2 ± 2,6**	47,9%
LS19 300 µmol/kg	22,2 ± 2,4***	60,4%

**** p < 0,01 e ***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.**

No cálculo dos valores de DI₅₀ para os compostos LS19, CTHP e diclofenaco foram obtidos os valores de 7,16 µmol/kg, 61,94 µmol/kg e 27,19 µmol/kg, respectivamente. Dessa forma, o composto LS19 apresentou uma potência 8,65 vezes maior que CTHP e 3,79 vezes maior que o diclofenaco (Figura 21).

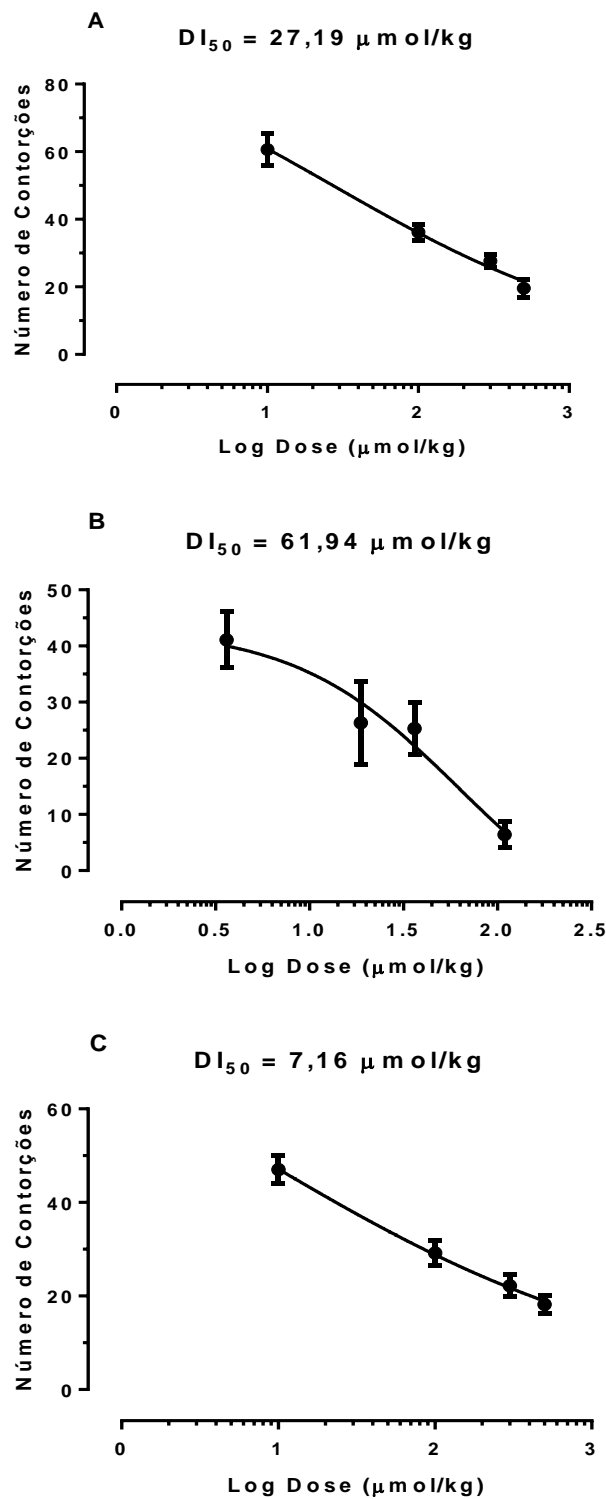


Figura 22 – Curvas dose-resposta do diclofenaco (A), do composto [(±)-(2,4,6-Cis)-4-cloro-6-(Naftaleno-1-il)-Tetrahydro-2H-Pirano-2-il]Metanol (CTHP - B) e do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 - C), no modelo contorções abdominais induzidas por ácido acético, e cálculo de DI_{50} . A análise estatística foi feita através da regressão não-linear.

5.2 Teste da formalina

O tratamento com o composto LS19 reduziu significativamente o tempo que os animais permaneceram lambendo as patas após a injeção de formalina em ambas as fases, demonstrando uma inibição de 40% na dose de 300 $\mu\text{mol/kg}$ na 1ª fase e de 87 % na 2ª fase, enquanto a dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ inibiu 33% na 2ª fase. A morfina foi capaz de inibir também ambas as fases (34% - 1ª fase e 68 % - 2ª fase), enquanto o diclofenaco inibiu somente a 2ª fase (60%) (Figura 22).

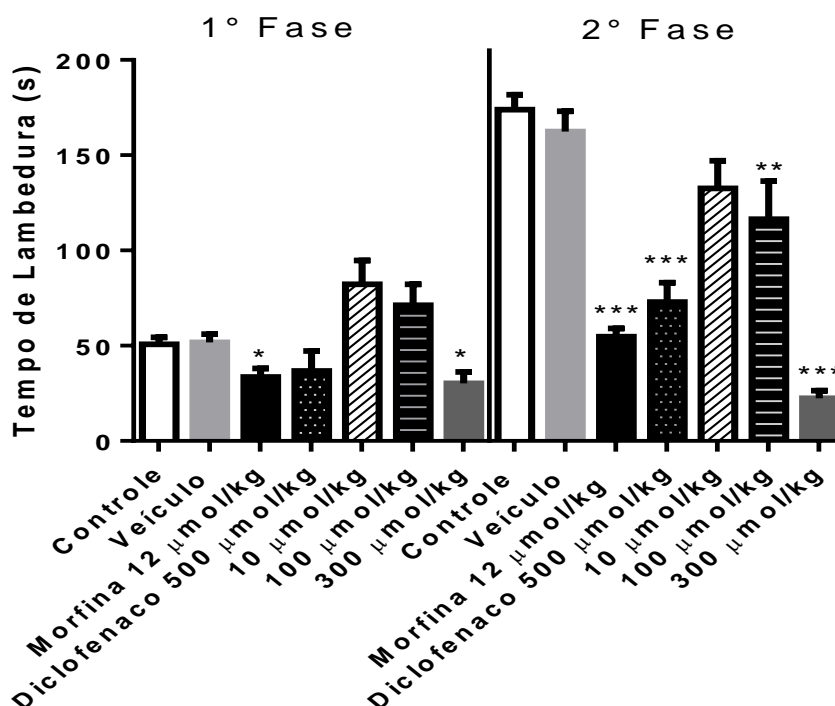


Figura 23 - Efeito antinociceptivo do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de formalina. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, morfina (12 $\mu\text{mol/kg}$), Diclofenaco (500 $\mu\text{mol/kg}$) e LS 19 - 10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 2 – Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina

Tempo de Lambedura (segundos – Média ± EPM)		
Tratamentos	1º Fase	2º Fase
Controle	50,8 ± 3,6	173,9 ± 7,8
Veículo	51,7 ± 4,3	162,4 ± 10,7
Morfina 12 µmol/kg	33,5 ± 4,6*	54,8 ± 4,2***
Diclofenaco 500 µmol/kg	36,7 ± 10,6	72,9 ± 7,3***
LS19 10 µmol/kg	82,2 ± 12,5	132,5 ± 14,6
LS19 100 µmol/kg	71,2 ± 11,1	116,4 ± 20,0**
LS19 300 µmol/kg	30,2 ± 6,0*	22,4 ± 4,0***

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.3 Modelo de imersão da cauda em água quente

Neste modelo, todas as doses testadas de LS19 apresentaram aumento significativo do tempo de latência, além do fentanil. LS19 apresentou percentuais máximos de aumento em relação a linha de base nos valores de 111%, 75% e 106% com as doses de 10, 100 e 300 µmol/kg, respectivamente; enquanto fentanil apresentou 182%. No cálculo da área sob a curva, fentanil e LS19, em todas as doses, apresentaram aumento na área (Figura 23).

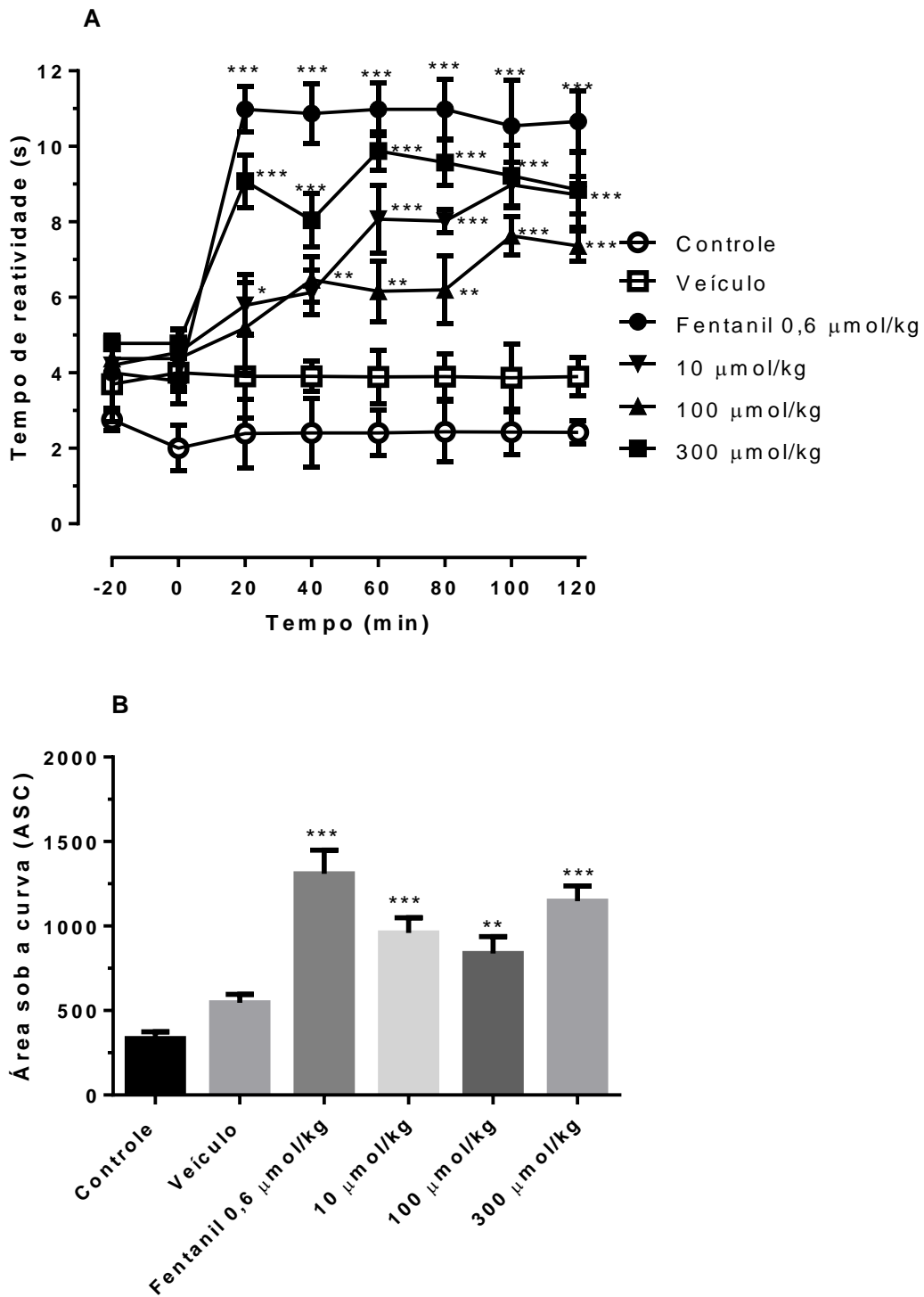


Figura 24 - Efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 - 10, 100 e 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6 µmol/kg) e doses crescentes do composto (10, 100 e 300 µmol/kg). Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como

média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (**p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 3 – Tempos de latência, em segundos, no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos – Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	2,38 ± 0,3	2,39 ± 0,9	2,41 ± 0,9	2,41 ± 0,6	2,44 ± 0,8	2,43 ± 0,6	2,42 ± 0,3
Veículo	3,85 ± 0,6	3,91 ± 1,1	3,91 ± 0,4	3,89 ± 0,7	3,90 ± 0,6	3,87 ± 0,9	3,90 ± 0,5
Fentanil	3,89 ± 0,4	10,98 ± 0,6***	10,87 ± 0,8***	10,98 ± 0,7***	10,98 ± 0,8***	10,54 ± 1,2***	10,66 ± 0,8***
LS19 10 µmol/kg	4,24 ± 0,4	5,79 ± 0,8*	6,13 ± 0,6**	8,07 ± 0,9***	8,02 ± 0,3***	8,98 ± 0,6***	8,71 ± 0,5***
LS19 100 µmol/kg	4,34 ± 0,6	5,19 ± 1,2	6,47 ± 0,6**	6,16 ± 0,8**	6,20 ± 0,9**	7,63 ± 0,5***	7,36 ± 0,4***
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7***	8,04 ± 0,7***	9,88 ± 0,5***	9,57 ± 0,6***	9,22 ± 0,8***	8,85 ± 1,0***

*p < 0,05, ** p < 0,01 e ***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.3.1 Avaliação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente

Foi observada uma redução do efeito antinociceptivo produzido pelo composto LS19 com a prévia administração de naloxona (antagonista não-seletivo opioide) em todos os tempos avaliados. Houve uma redução de 41% e 60% na área sob a curva com a prévia administração de 9 e 15 µmol/kg de naloxona, respectivamente (Figura 24).

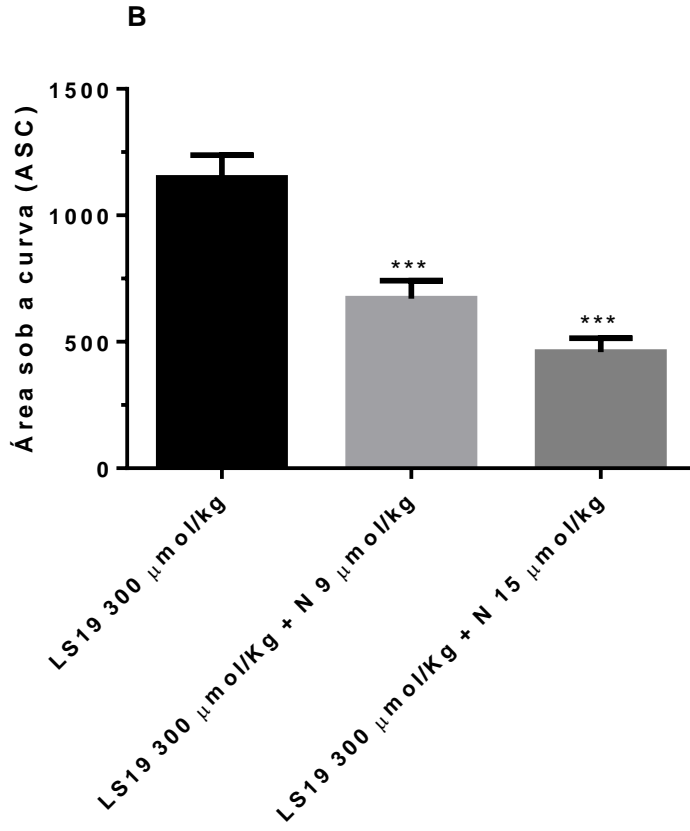
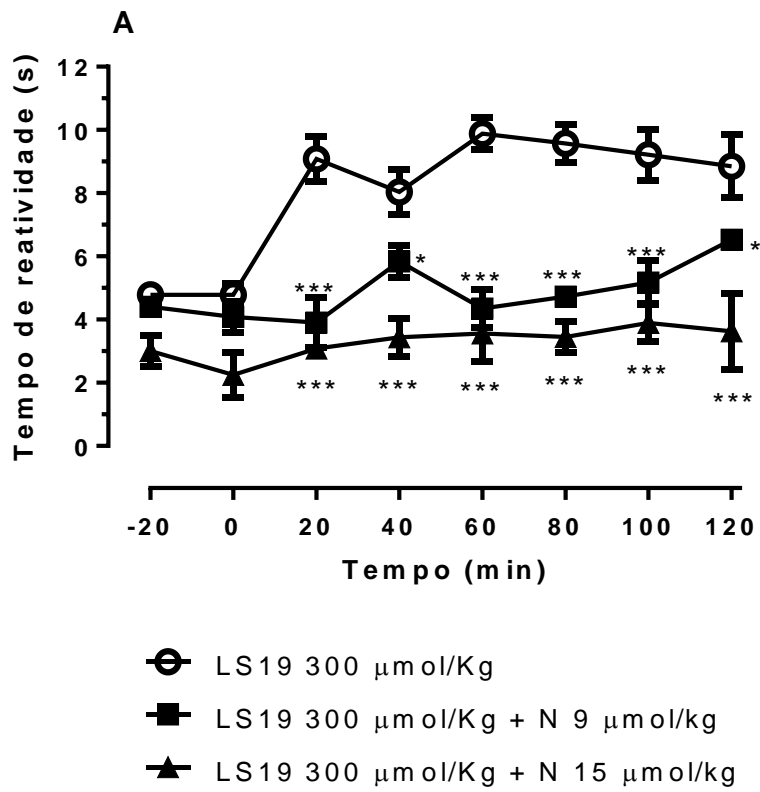


Figura 25 - Influência da administração prévia de naloxona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naloxona (9 e 15 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (*p < 0,05 e *p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (***p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de naloxona, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 4 – Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 9 µmol/kg N	4,24 ± 0,6	3,91 ± 0,8***	5,84 ± 0,5*	4,35 ± 0,6***	4,73 ± 0,3***	5,17 ± 0,7***	6,53 ± 0,3*
LS19 300 µmol/kg + 15 µmol/kg N	2,63 ± 0,8	3,08 ± 0,2***	3,44 ± 0,6***	3,56 ± 0,9***	3,45 ± 0,5***	3,89 ± 0,6***	3,63 ± 1,2***

* p < 0,05 e ***p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Considerando a possível participação do sistema opioide no mecanismo de ação do composto, foi então avaliada a participação seletiva de receptores opioides (μ , δ e κ). Na figura 25 estão apresentados os resultados da avaliação da interferência da administração prévia de naltrindol (antagonista seletivo do receptor δ opioide), nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor κ opioide) e metilnaltrexona (antagonista seletivo periférico do receptor μ opioide) sobre o efeito antinociceptivo do composto LS 19, sendo observado que o uso dos 3 antagonistas foi capaz de inibir o efeito do composto em todos os tempos testados. No cálculo da área sob a curva pode ser constatado a redução do efeito do composto em 54%, 48% e 51%, respectivamente para metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina.

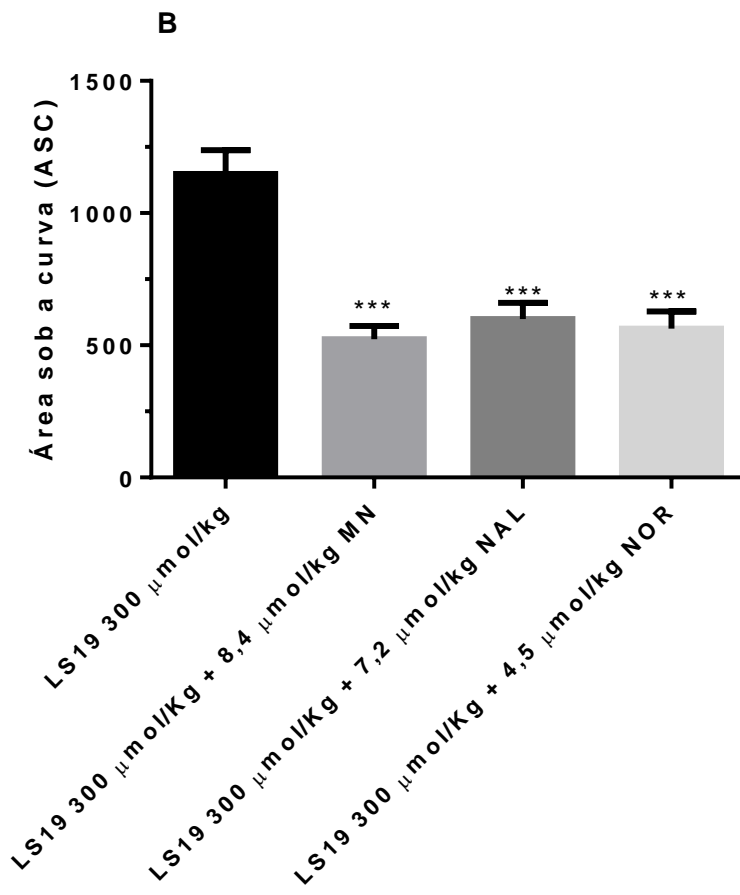
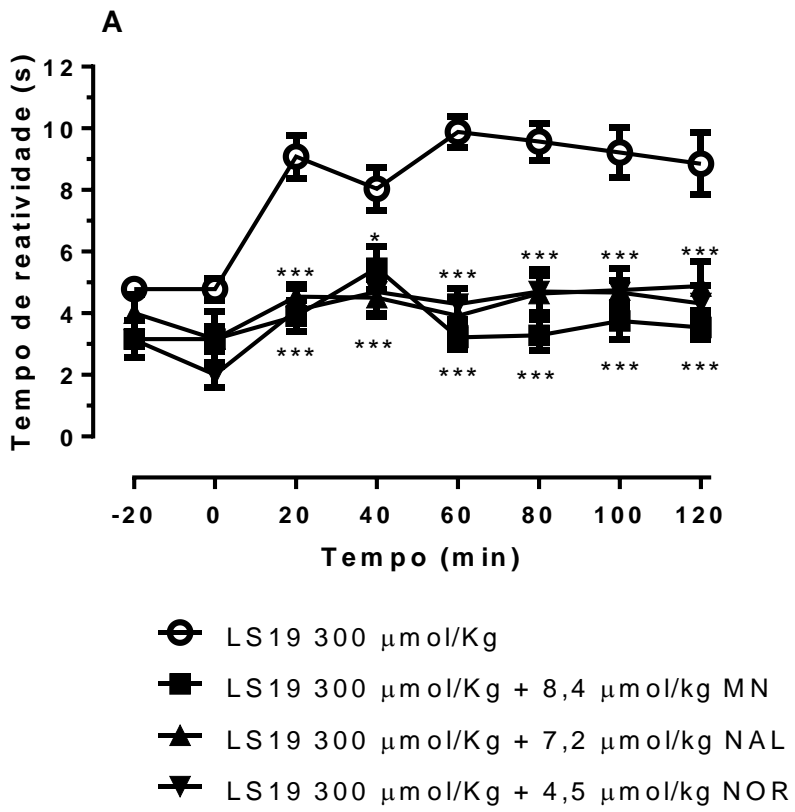


Figura 26 - Influência da administração prévia de antagonistas seletivos opióides (metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com os antagonistas 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (*p < 0,05 e *p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado aos antagonistas, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (***p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado aos antagonistas, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 5 – Avaliação da influência da administração prévia de metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 8,4 µmol/kg MN	3,16 ± 0,5	3,91 ± 0,5	5,46 ± 0,7	3,22 ± 0,4	3,28 ± 0,5	3,75 ± 0,6	3,54 ± 0,4
LS19 300 µmol/kg + 7,2 µmol/kg NAL	3,58 ± 0,7	4,54 ± 0,4	4,50 ± 0,6	3,92 ± 0,6	4,64 ± 0,6	4,75 ± 0,7	4,88 ± 0,8
LS19 300 µmol/kg + 4,5 µmol/kg NOR	2,57 ± 0,5	4,09 ± 0,7	4,69 ± 0,7	4,29 ± 0,5	4,71 ± 0,7	4,67 ± 0,4	4,32 ± 0,6

* p < 0,05 e ***p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

MN – metilnaltrexona, NAL – naltrindol e NOR – nor-binaltorfimina

5.4 Avaliação da via NO/GMP_c/K_{ATP} sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente

Para avaliar a possível participação da via NO/GMP_c/K_{ATP} no mecanismo de antinocicepção do composto LS19, os animais foram pré-tratados com N-nitro-arginina-L-metil éster - L-NAME (3,7 e 18,5 µmol/kg, i.p.; inibidor da óxido nítrico sintase), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one – ODQ (10,7 e 26,7 µmol/kg, i.p.; inibidor da guanilato ciclase) e glibenclamida (2,02 e 10,1 µmol/kg, i.p.; bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis a ATP) . Os resultados demonstram que a inibição da NO

sintase foi capaz de reduzir a área sob a curva em 42% e 47%, respectivamente para as doses de 3,7 e 18,5 $\mu\text{mol/kg}$ (Figura 26).

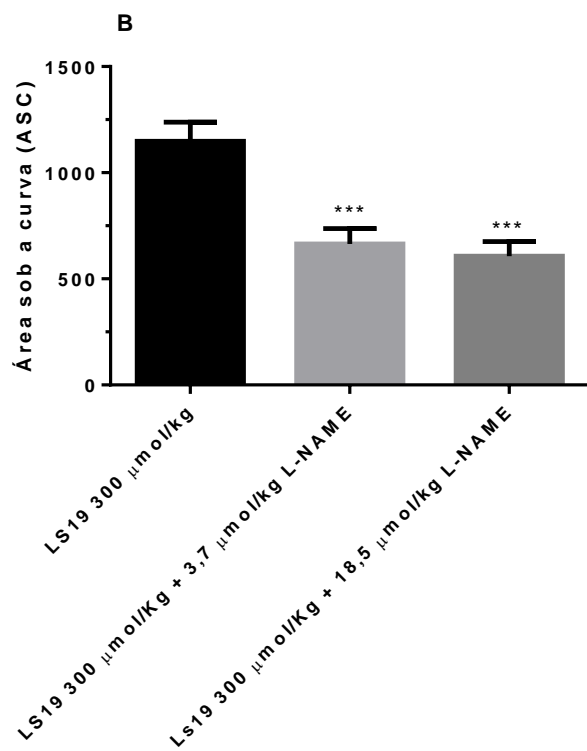
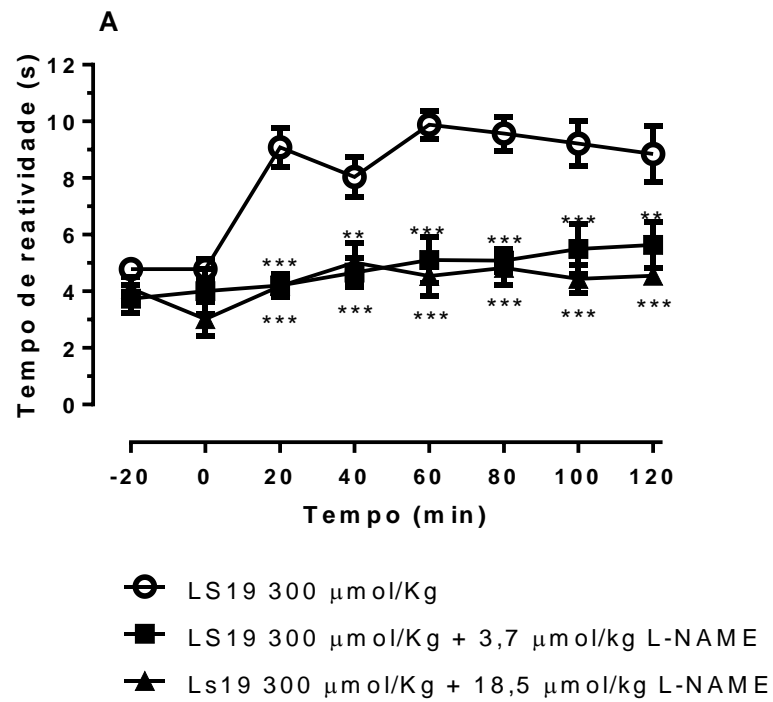


Figura 27 - Influência da administração prévia de L-NAME sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com L-NAME (3,7 e 18,5 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (***p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de L-NAME, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 6 – Avaliação da influência da administração prévia de L-NAME sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 3,7 µmol/kg L-NAME	3,87 ± 0,5	4,21 ± 0,4***	4,66 ± 0,5***	5,11 ± 0,8***	5,08 ± 0,4***	5,49 ± 0,9***	5,64 ± 0,8**
LS19 300 µmol/kg + 18,5 µmol/kg L-NAME	3,56 ± 0,6	4,18 ± 0,2***	5,02 ± 0,7**	4,54 ± 0,7***	4,83 ± 0,6***	4,44 ± 0,5***	4,55 ± 0,3***

**** p < 0,01 e ***p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.**

Na figura 27 observa-se redução do efeito do composto com a prévia administração de ODQ em todos os tempos avaliados, alcançando redução de 56% e 59%, respectivamente para as doses de 10,7 e 26,7 µmol/kg, no cálculo da área sob a curva.

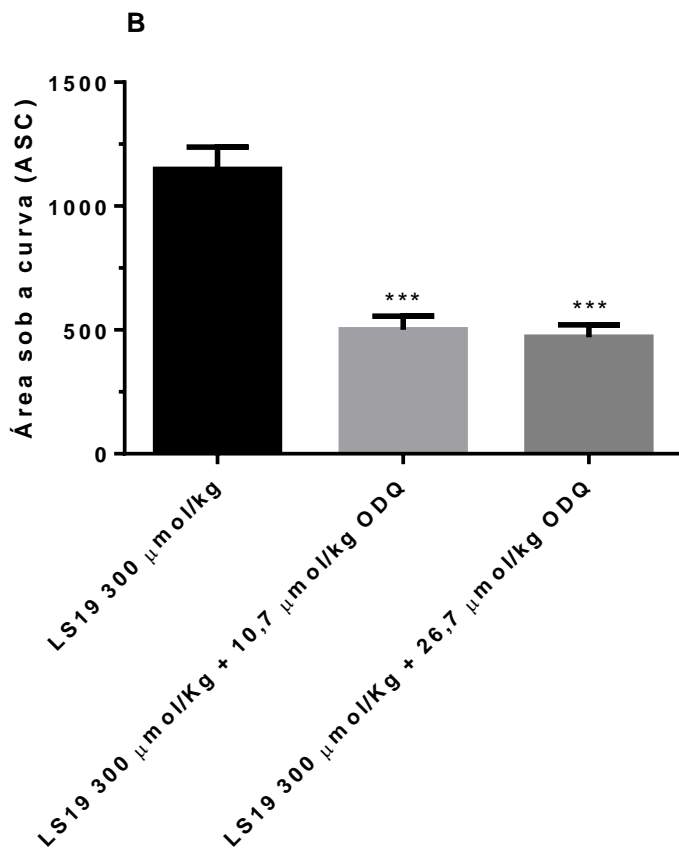
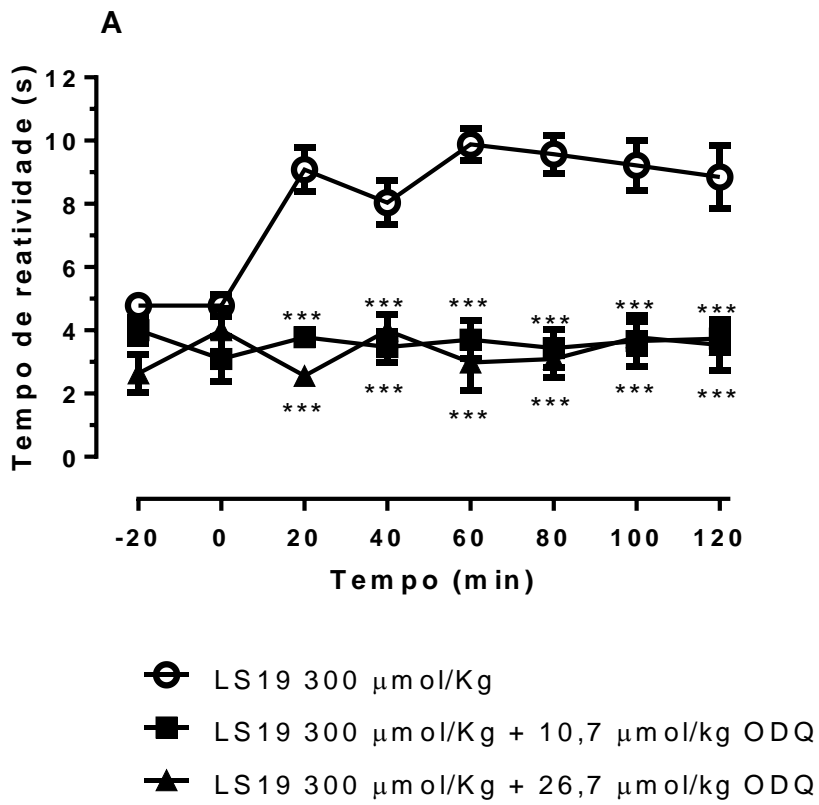


Figura 28 - Influência da administração prévia de ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com ODQ (10,7 e 26,7 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de ODQ, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (**p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de ODQ, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 7 – Avaliação da influência da administração prévia de ODQ sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 10,7 µmol/kg ODQ	3,55 ± 0,9	3,78 ± 0,2***	3,47 ± 0,5***	3,71 ± 0,6***	3,44 ± 0,6***	3,66 ± 0,8***	3,74 ± 0,4***
LS19 300 µmol/kg + 26,7 µmol/kg ODQ	3,32 ± 0,4	2,56 ± 0,3***	3,99 ± 0,5***	2,98 ± 0,9***	3,10 ± 0,6***	3,78 ± 0,5***	3,54 ± 0,8***

*****p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a doses crescentes de ODQ, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.**

ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

Na figura 28, a administração de glibenclamida reduziu a atividade antinociceptiva do composto em 56% e 57%, respectivamente para as doses de 2,02 e 10,1 µmol/kg no cálculo da área sob a curva.

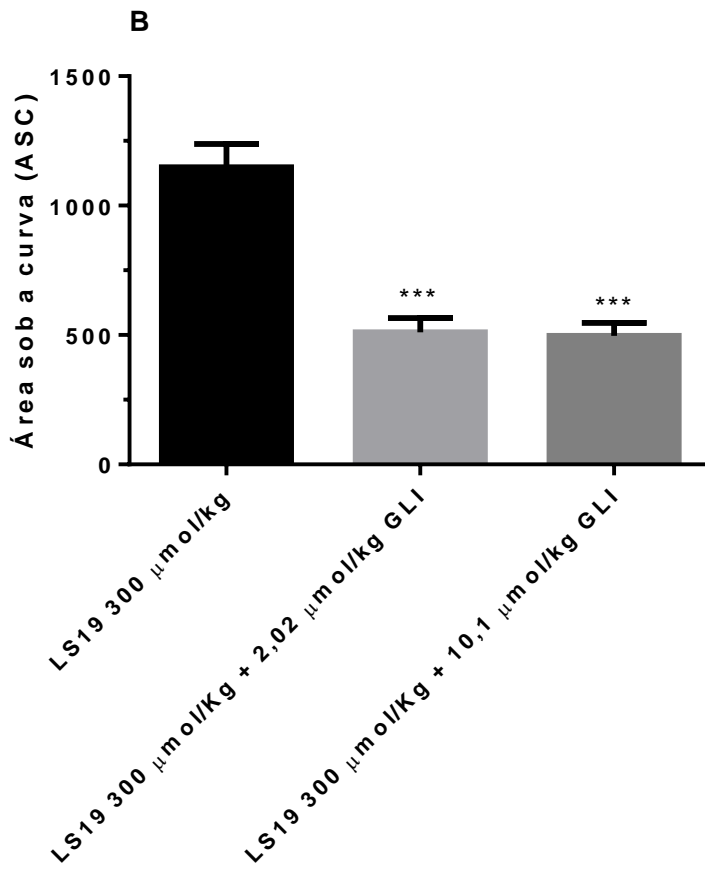
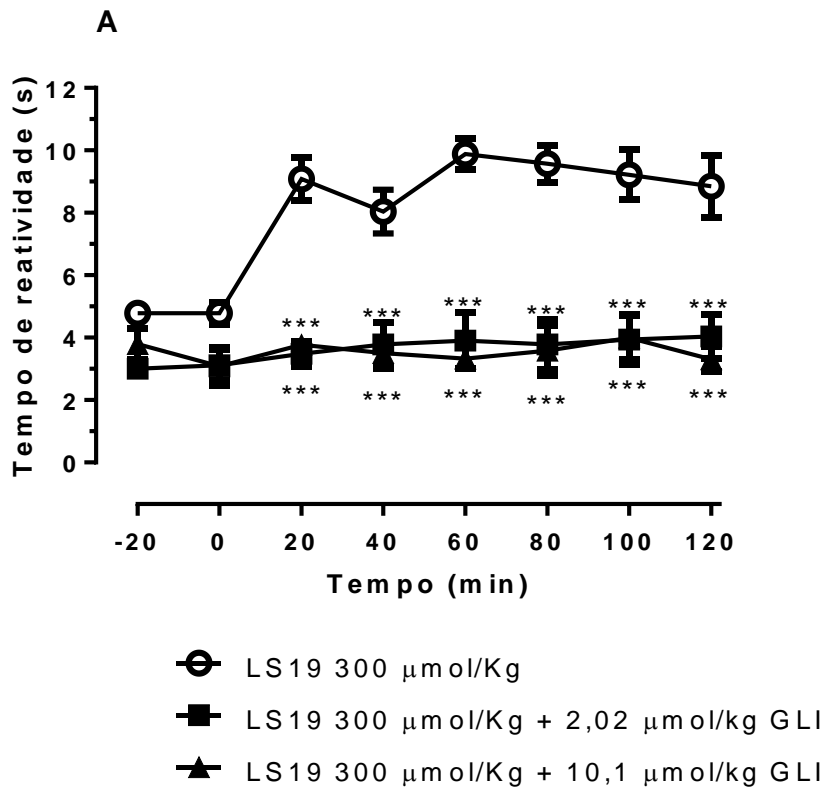


Figura 29 - Influência da administração prévia de glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com glibenclamida (2,02 e 10,1 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de glibenclamida, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (**p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de glibenclamida, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 8 – Avaliação da influência da administração prévia de Glibenclamida sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 2,02 µmol/kg GLI	3,06 ± 0,9	3,48 ± 0,4***	3,78 ± 0,7***	3,91 ± 0,9***	3,78 ± 0,8***	3,94 ± 0,8***	4,04 ± 0,7***
LS19 300 µmol/kg + 10,1 µmol/kg GLI	3,44 ± 0,4	3,77 ± 0,3***	3,51 ± 0,5***	3,33 ± 0,3***	3,58 ± 0,8***	3,99 ± 0,7***	3,31 ± 0,4***

***p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a doses crescentes de glibenclamida, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Gli – Glibenclamida

5.5 Avaliação da via colinérgica muscarínica sobre o efeito antinociceptivo do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila no modelo de imersão da cauda em água quente

Avaliou-se também o envolvimento da via colinérgica muscarínica no mecanismo de ação do composto LS19 administrando-se atropina previamente à administração do composto. A atropina reduziu completamente o efeito antinociceptivo com as doses de 10,3 e 17,2 µmol/kg, apresentando uma redução de 61% e 75% da área sob a curva, respectivamente, em relação ao composto isolado (Figura 29).

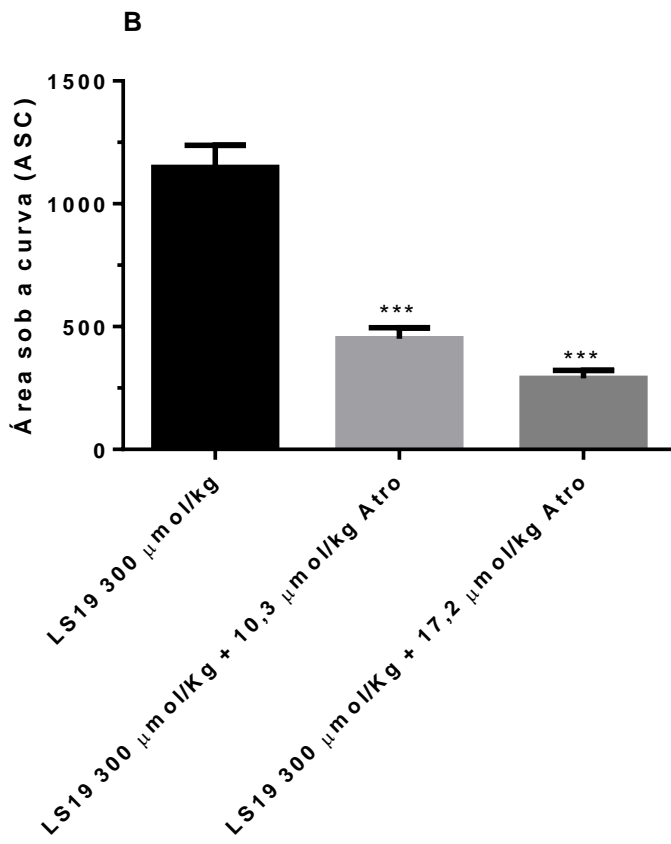
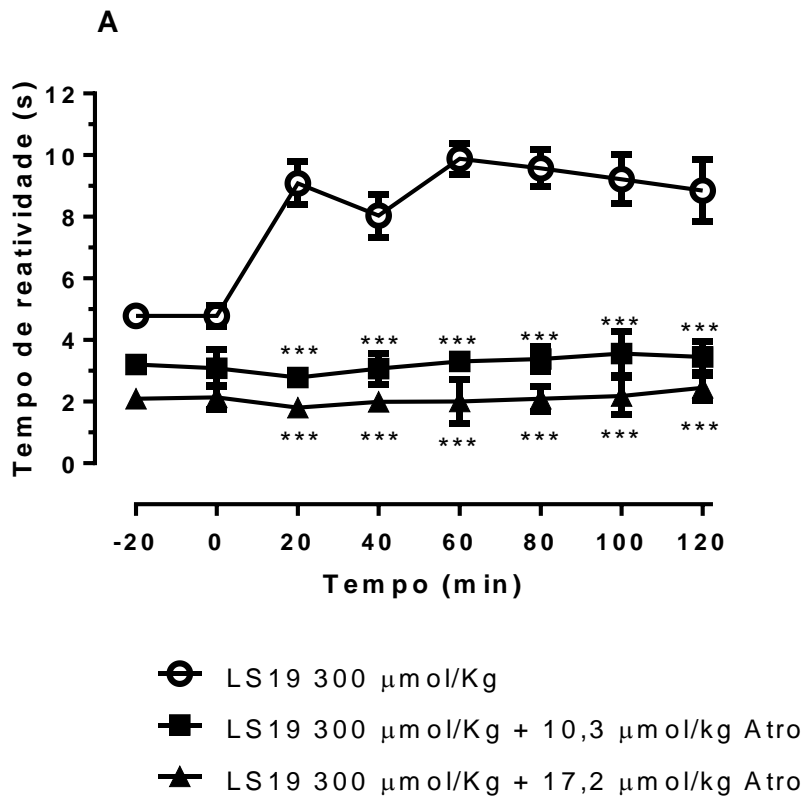


Figura 30 - Influência da administração prévia de atropina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19 – 300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com atropina (10,3 e 17,2 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de atropina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (**p < 0,001) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a doses crescentes de atropina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 9 – Avaliação da influência da administração prévia de Atropina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS19 no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS19 300 µmol/kg	4,78 ± 0,4	9,08 ± 0,7	8,04 ± 0,7	9,88 ± 0,5	9,57 ± 0,6	9,22 ± 0,8	8,85 ± 1,0
LS19 300 µmol/kg + 10,3 µmol/kg ATRO	3,14 ± 0,7	2,78 ± 0,2***	3,07 ± 0,5***	3,31 ± 0,3***	3,38 ± 0,4***	3,56 ± 0,7***	3,45 ± 0,5***
LS19 300 µmol/kg + 17,2 µmol/kg ATRO	2,12 ± 0,3	1,81 ± 0,2***	1,99 ± 0,3***	2,00 ± 0,7***	2,10 ± 0,4***	2,18 ± 0,6***	2,45 ± 0,4***

*****p < 0,001 entre o composto isolado e o composto associado a doses crescentes de atropina, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.**

ATRO – Atropina

5.6 Modelo de nociceção induzida por capsaicina

Neste modelo, os animais foram tratados com o composto LS19 por via oral nas doses de 100 e 300 µmol/kg. A capsazepina (13,3 µmol/kg via i.p) foi utilizada como controle positivo. Podemos observar na figura 30 que na maior dose, de 300 µmol/kg, o tempo de lambertura em segundos diminuiu significativamente, quando comparado ao grupo controle. Demonstrando então, que os receptores TRPV1 podem estar envolvidos no mecanismo de ação do composto.

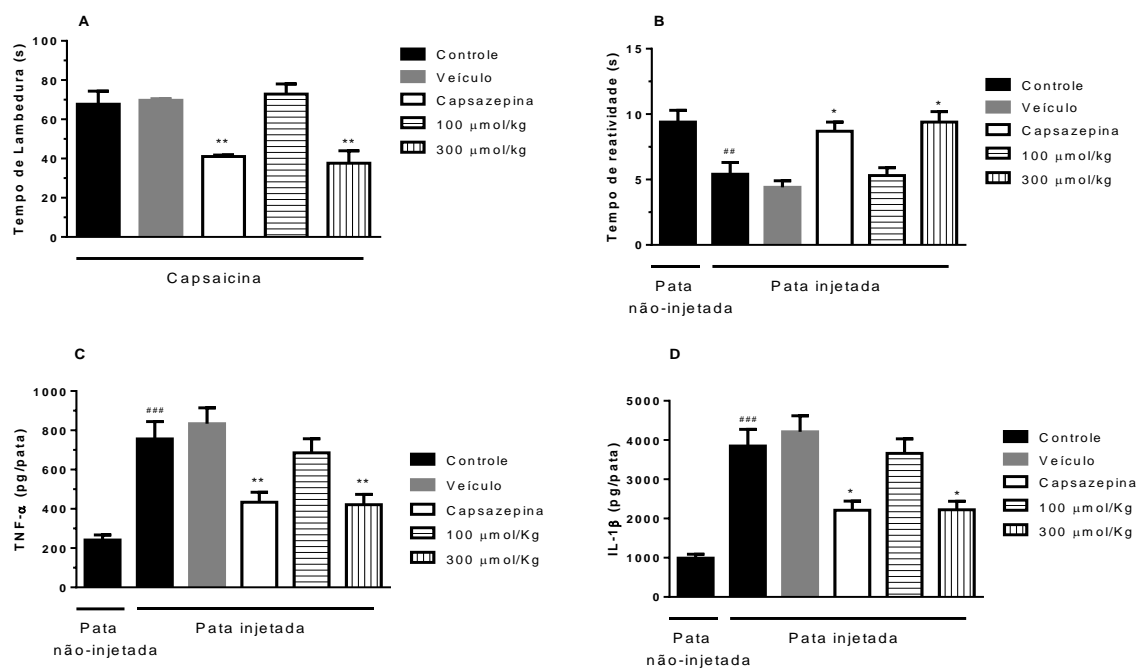


Figura 31 - Avaliação do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no modelo de nociceção induzida por capsaicina e no modelo de placa quente, além da quantificação de citocinas. Os tratamentos com solução salina, veículo e composto (100 e 300 μmol/kg) foram realizados por via oral, e a capsazepina (13,3 μmol/kg) foi administrada por via intraperitoneal (i.p). Em A foi avaliado o tempo de lambedura induzido por capsaicina em segundos. Em B foi avaliado o tempo de reatividade em segundos no modelo de placa quente. Em C foi quantificada a concentração de TNF-α. Em D foi quantificada a concentração de IL-1β. A significância estatística p < 0,05 (*) e p < 0,01 () foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com composto, veículo e capsazepina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. A significância estatística p < 0,001 (###) foi calculada entre os valores da pata injetada com capsaicina do grupo controle e os da pata não-injetada do grupo controle, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 10 – Avaliação o tempo de lambedura e quantificação de citocinas no modelo de capsaicina.

Tratamentos	Tempo de Lambedura (segundos Média ± EPM)	Tempo de reatividade (segundos Média ± EPM)	TNF-α (pg/pata) (Média ± EPM)	IL-1β (pg/pata) (Média ± EPM)
Controle (pata não-	---	9,4 ± 0,9	241,2 ± 25,6	989,9 ± 101,2

injetada)				
Controle (pata injetada)	67,7 ± 6,6	5,4 ± 0,9##	756,5 ± 88,0###	3848,2 ± 423,1###
Veículo	69,7 ± 0,8	4,4 ± 0,5	833,8 ± 81,1	4210,1 ± 410,3
LS19 100 µmol/kg	72,9 ± 5,2	5,3 ± 0,6	685,1 ± 72,3	3658,4 ± 374,1
LS19 300 µmol/kg	37,6 ± 6,4**	9,4 ± 0,8*	421,3 ± 52,3**	2223,4 ± 215,4*
Capsazepina 13,3 µmol/kg	41,1 ± 0,7**	8,7 ± 0,7*	433,7 ± 51,2**	2212,0 ± 231,1*

*P < 0,05 e **P < 0,01 entre os grupos veículo, capsazepina e doses crescentes do composto com o grupo controle, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ## p < 0,01 e ### p < 0,001 entre os valores da pata injetada com capsaicina do grupo controle e os da pata não-injetada do grupo controle, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.7 Modelo da Placa Quente

A injeção de capsaicina foi capaz de reduzir o tempo de reatividade no modelo de placa quente em 43%. O composto LS19 (300 µmol/kg) e a capsazepina aumentaram o tempo de reatividade nos animais injetados com capsaicina em 74% e 61%, respectivamente (Figura 30).

As patas administradas com capsaicina demonstraram uma redução nos níveis de TNF-α e IL-1β nos animais administrados com capsazepina e LS19 (300 µmol/kg). A injeção intraplantar de capsaicina aumentou a concentração de TNF-α e IL-1β em 213% e 288%, respectivamente, quando comparado a pata não-injetada. As concentrações de TNF-α foram reduzidas em 43% e 44% respectivamente para capsazepina e LS19, enquanto as concentrações de IL-1β foram reduzidas em 43% e 42% respectivamente para capsazepina e LS19 (Figura 30).

5.8 Modelo de Rotarod

Neste teste, os animais foram tratados por via oral com o composto LS19 – 300 µmol/kg; v.o, água destilada, veículo e morfina (12 µmol/kg). A dose de 300 µmol/kg

do composto não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, enquanto que a morfina demonstrou um aumento no número de quedas (Figura 31).

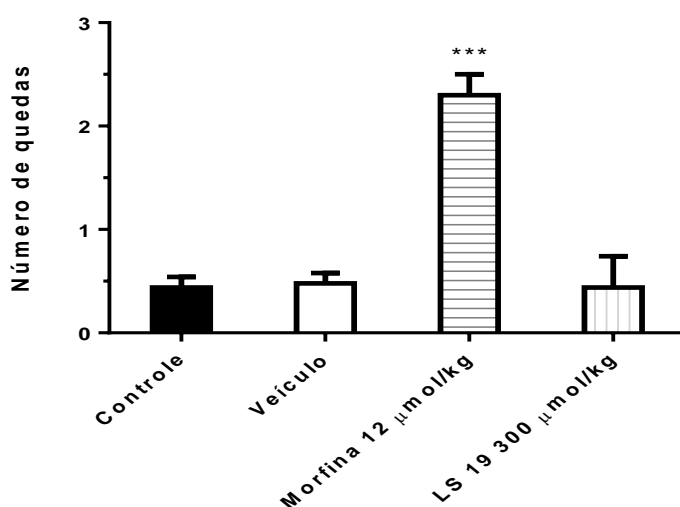


Figura 32 - Avaliação do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no teste de rotarod. Os tratamentos com solução salina, veículo, composto (300 µmol/kg) e morfina (12 µmol/kg) foram realizados por via oral. A significância estatística (p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 11 – Avaliação no modelo de rotarod.

Tratamentos	Número de quedas (Média ± EPM)	Aumento (%)
Controle	0,4 ± 0,1	---
Veículo	0,5 ± 0,1	---
Morfina 12 µmol/kg	2,3 ± 0,2***	475
LS19 300 µmol/kg	0,4 ± 0,3	---

***p < 0,001 entre os grupos veículo, morfina e composto com o grupo controle, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.9 Modelo de edema de pata

Os animais foram tratados com o composto LS19 (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$; v.o). O fármaco padrão dexametasona (5,7 $\mu\text{mol/kg}$; s.c) foi utilizado como controle positivo. Na figura 32 podemos observar que todas as doses do composto LS 19 obtiveram diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentando assim efeito anti-edematogênico em todos os tempos avaliados, sendo também observada 65%, 70% e 72% de redução na área sob a curva, respectivamente para as doses de 10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$.

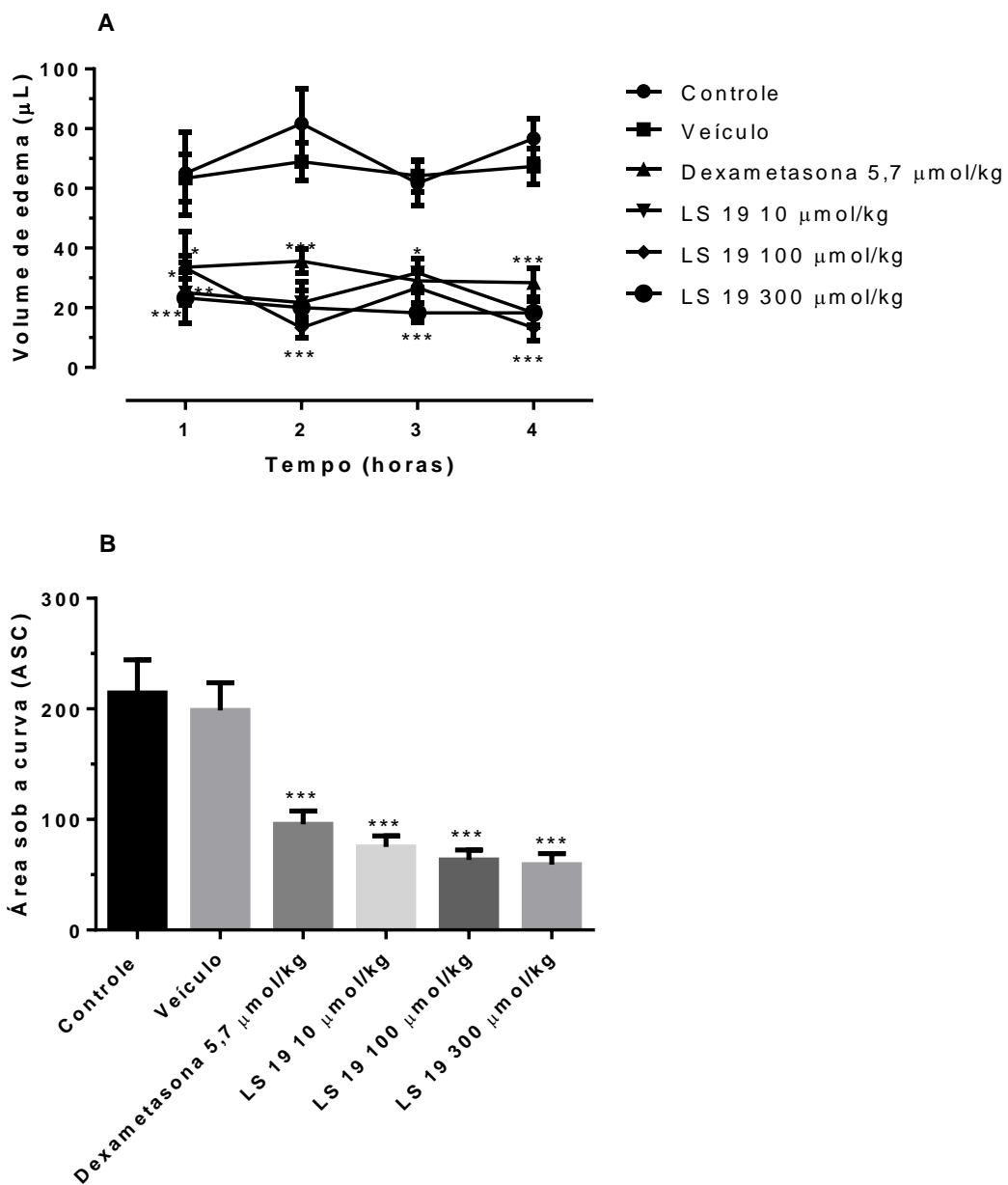


Figura 33 - Avaliação do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) no modelo de edema de pata. Em A, os tratamentos com solução salina, veículo e doses crescentes do composto (10, 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$) foram realizados por via oral, e a dexametasona (5,7 $\mu\text{mol/kg}$) por via subcutânea. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. A solução de carragenina (1%) foi aplicada nas patas dos animais em todos os grupos. Em A, a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 12 – Avaliação no modelo de edema de pata

Tratamentos	Volume de edema (μL)			
	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas
Controle	65,0 \pm 13,8	81,7 \pm 11,7	61,7 \pm 7,5	76,7 \pm 6,8
Veículo	63,4 \pm 8,0	68,9 \pm 6,3	64,2 \pm 5,3	67,4 \pm 6,1
Dexametasona 5,7 $\mu\text{mol/kg}$	33,5 \pm 4,3*	35,6 \pm 4,2***	29,0 \pm 4,3***	28,4 \pm 5,7***
LS19 10 $\mu\text{mol/kg}$	25,0 \pm 10,3***	21,7 \pm 7,0***	31,7 \pm 4,8*	18,3 \pm 4,8***
LS19 100 $\mu\text{mol/kg}$	33,3 \pm 12,3*	13,3 \pm 3,3***	26,7 \pm 4,9***	13,3 \pm 4,2***
LS19 300 $\mu\text{mol/kg}$	23,3 \pm 8,4**	20,0 \pm 5,8***	18,3 \pm 3,1***	18,3 \pm 4,1***

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.10 Modelo da bolsa de ar subcutâneo

Os animais foram tratados com o composto LS 19 (100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$; v.o). A dexametasona (5,7 $\mu\text{mol/kg}$) administrada por via subcutânea foi usada como controle positivo. A figura 33 demonstra que houve uma diminuição na migração de

leucócitos totais nos grupos tratados com todas as doses utilizadas, indicando que o composto LS 19 foi capaz de reduzir a migração leucocitária na inflamação existente na bolsa de ar subcutâneo.

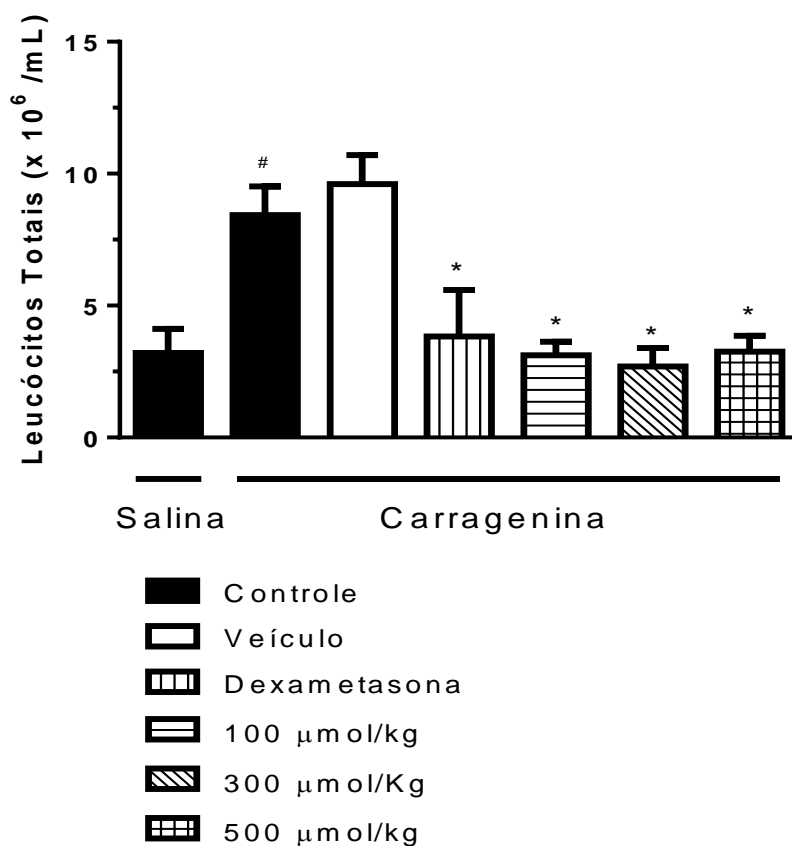


Figura 34 - Efeito do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de leucócitos totais a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 μmol/kg; s.c.) e o composto (100, 300 e 500 μmol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do número de leucócitos totais. A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (#p < 0,05) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 13 – Quantificação do número de leucócitos totais no modelo de bolha de ar subcutâneo.

Tratamentos	Número de leucócitos totais (x 10⁶/mL) (Média ± EPM)	Inibição (%)
Controle solução salina	3,2 ± 0,2	---
Controle solução carragenina	8,4 ± 1,0#	---
Veículo	9,6 ± 1,1	---
Dexametasona 5,7 µmol/kg	3,8 ± 1,8*	54,8
LS19 100 µmol/kg	3,1 ± 0,5*	63,1
LS19 300 µmol/kg	2,7 ± 0,7*	67,9
LS19 500 µmol/kg	3,3 ± 0,6*	60,7

*p < 0,05 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. #p < 0,05 entre o grupo que recebeu salina e o que recebeu solução carragenina pela via subcutânea, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Ainda no mesmo modelo, mediadores inflamatórios foram quantificados a partir do lavado coletado, e pôde ser observado uma redução na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , em todas as doses, e TNF- α com as maiores doses (Figura 34), além de aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em todas as doses (Figura 35). Não foi observado efeito do composto sob a quantificação de IL-6, IL-4, IFN- γ e NO.

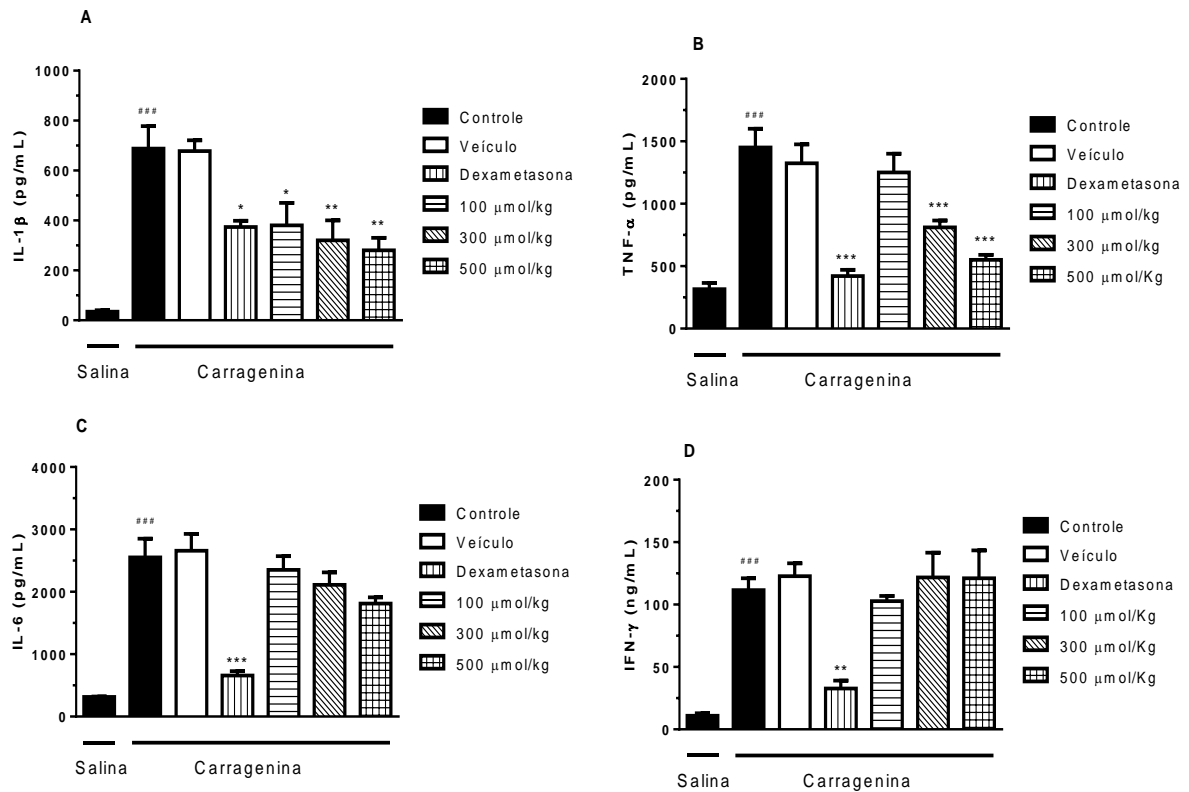


Figura 35 - Efeito do composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de citocinas (A- IL-1 β , B- TNF- α , C- IL-6 e D- IFN- γ) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 μ mol/kg; s.c.) e o composto (100, 300 e 500 μ mol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do número de citocinas. A significância estatística (*p < 0,05; **p < 0,01 e *p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 14 – Quantificação de citocinas no modelo de bolha de ar subcutâneo.

Tratamentos	IL-1β (pg/mL) (Média \pm EPM)	TNF-α (pg/mL) (Média \pm EPM)	IL-6 (pg/mL) (Média \pm EPM)	IFN-γ (ng/mL) (Média \pm EPM)
Controle solução salina	34,2 \pm 6,0	315,2 \pm 50,6	314,2 \pm 6,6	10,9 \pm 2,1
Controle solução carragenina	688,0 \pm 90,2###	1450,2 \pm 150,6###	2550,7 \pm 306,7###	111,5 \pm 9,6###
Veículo	678 \pm 43,1	1324,2 \pm 152,0	2658,0 \pm 270,1	122,7 \pm 10,4
Dexametasona 5,7 μ mol/kg	374,0 \pm 25,4*	420,2 \pm 50,4***	658,1 \pm 70,5***	32,7 \pm 6,5**
LS19 100 μ mol/kg	380,0 \pm 90,1*	1250,4 \pm 150,5	2350,3 \pm 226,8	102,7 \pm 4,3
LS19 300 μ mol/kg	322,2 \pm 81,5**	810,1 \pm 55,3***	2110,5 \pm 206,4	121,8 \pm 19,8
LS19 500 μ mol/kg	283,1 \pm 50,8**	550,4 \pm 46,3***	1810,3 \pm 104,6	121,0 \pm 22,5

*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ###p < 0,001 entre os grupos controle solução salina e o grupo controle carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

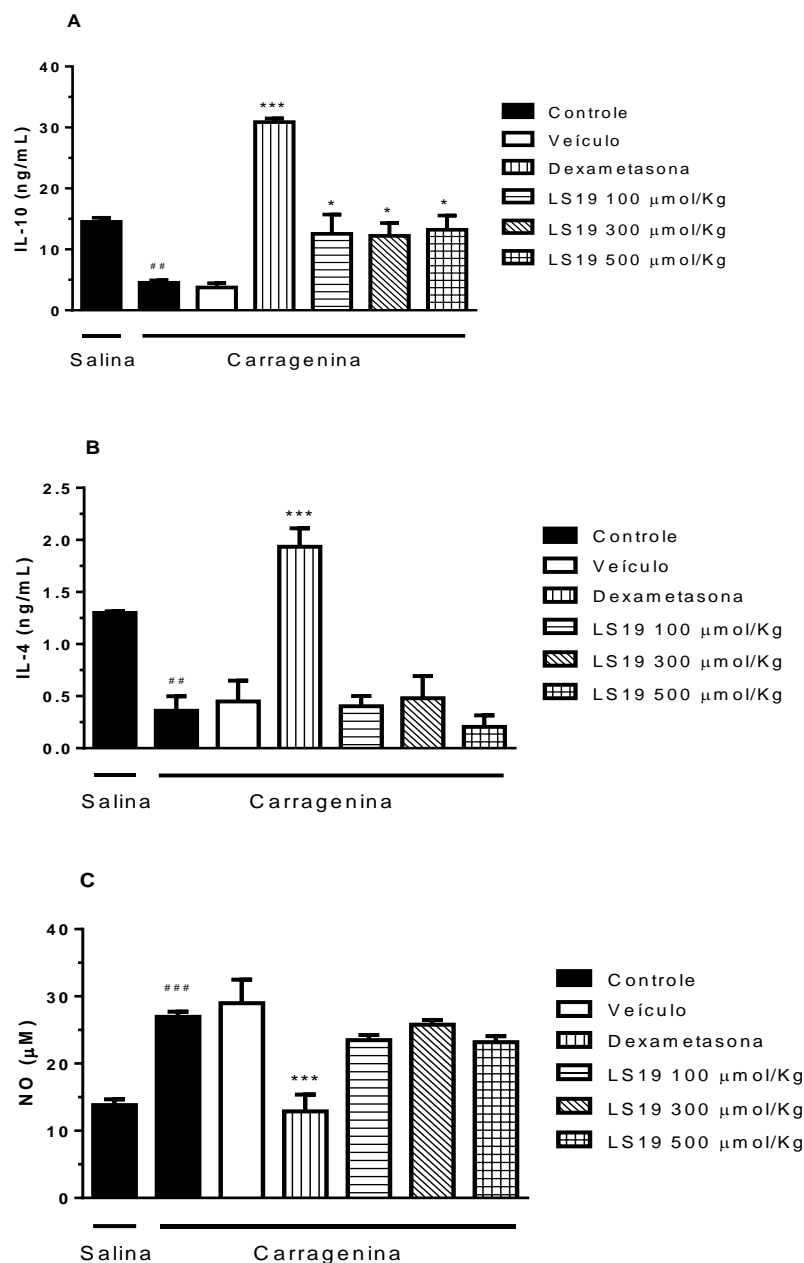


Figura 36 - Efeito do composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) na quantificação de citocinas e óxido nítrico (A-IL-10, B- IL-4 e C- NO) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 µmol/kg; s.c.) e o composto (100, 300 e 500 µmol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6). A significância estatística (*p < 0,05 e *p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 15 – Quantificação de citocinas e óxido nítrico no modelo de bolha de ar subcutâneo.

Tratamentos	IL-10 (ng/mL) (Média ± EPM)	IL-4 (ng/mL) (Média ± EPM)	NO (µM) (Média ± EPM)
Controle solução salina	14,5 ± 0,7	1,3 ± 0,1	13,8 ± 2,1
Controle solução carragenina	4,5 ± 0,4###	0,4 ± 0,1##	27,0 ± 0,8###
Veículo	3,7 ± 0,7	0,5 ± 0,2	29,0 ± 3,5
Dexametasona 5,7 µmol/kg	30,9 ± 0,6***	1,9 ± 0,2***	12,9 ± 2,5***
LS19 100 µmol/kg	12,5 ± 3,2*	0,4 ± 0,1	23,5 ± 0,8
LS19 300 µmol/kg	12,2 ± 2,1*	0,5 ± 0,2	25,8 ± 0,7
LS19 500 µmol/kg	13,2 ± 2,3*	0,2 ± 0,1	23,2 ± 0,9

*p < 0,05 e ***p < 0,001 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ## p < 0,01 e ###p < 0,001 entre os grupos controle solução salina e o grupo controle carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.11 Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

Por meio desta avaliação pode se observar a capacidade do composto em diretamente inibir a enzima cicloxigenase (COX), tendo como consequência uma redução na síntese de prostaglandina. A partir da concentração de prostaglandina sintetizada, construiu-se os gráficos para determinação do CI₅₀ (concentração inibitória 50%). A CI₅₀ do composto LS19 frente à COX-1 foi de 47,32 µg/mL, enquanto a CI₅₀ do composto frente à COX-2 foi de 32,95 µg/mL. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 1,44; sendo que $IS = CI_{50}COX-1/CI_{50}COX-2$; IS > 1 – seletividade para COX-2, IS < 1 – seletividade para COX-1. Esta inibição enzimática promovida pelo composto se dá de forma seletiva para a isoforma COX-2, pois apresenta um CI₅₀ inferior para a COX-2, ou seja, o composto consegue inibir 50% da

atividade enzimática com a utilização de uma concentração mais baixa do composto (Figura 36). Apesar dos resultados matemáticos no cálculo de IS indicarem seletividade do composto para COX-2, o valor é bem próximo de 1, demonstrando uma seletividade discreta para COX-2.

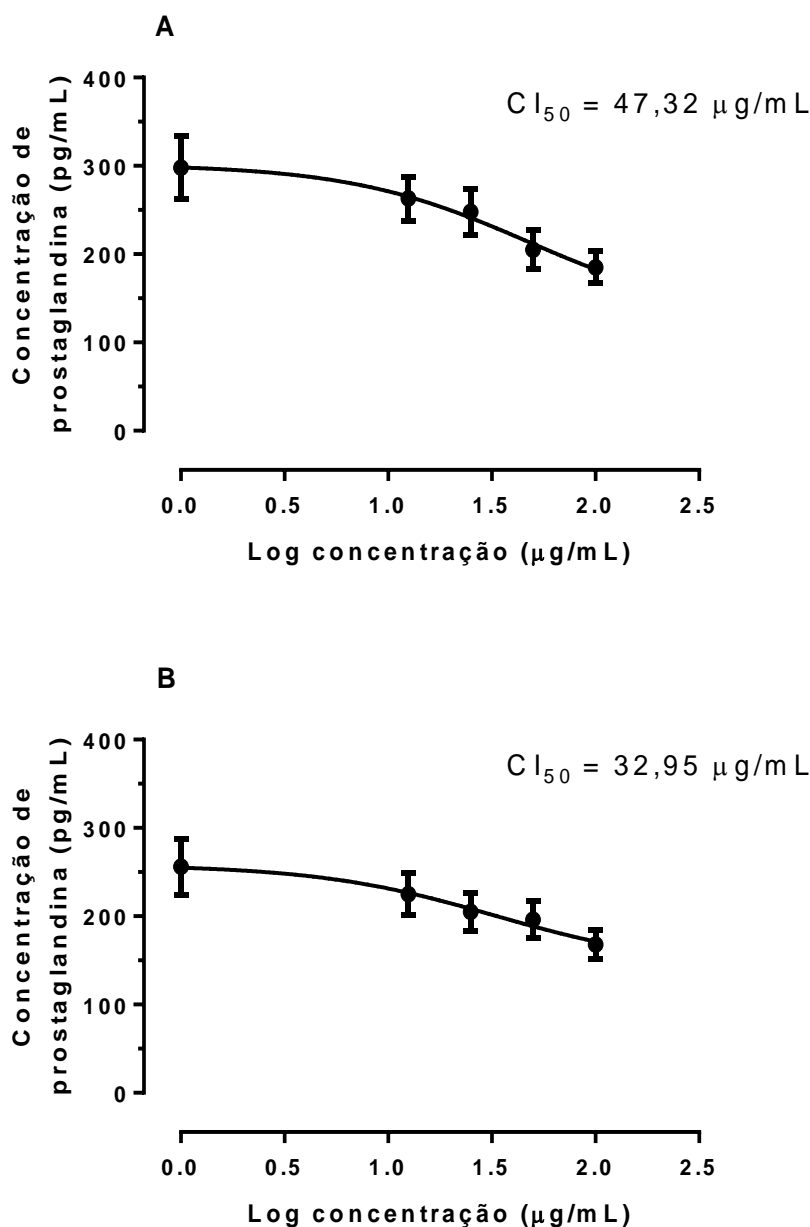


Figura 37 - Efeito de concentrações crescentes cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2. Os resultados são expressos como concentração de prostaglandina. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de CI₅₀. O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 1,44; sendo que IS>1 – seletividade para COX-2, IS<1 – seletividade para COX-1.

Tabela 16 - Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoensaio enzimático.

Concentração do composto (µg/mL)	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-1	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-2	Inibição enzimática da COX-1(%)	Inibição enzimática da COX-2(%)
0	298,2 ± 36,1	256,3 ± 32,4	0	0
12,5	263,3 ± 25,1	225,1 ± 24,9	11,7	12,2
25	248,4 ± 26,4	205,2 ± 22,5	16,7	19,9
50	205,7 ± 22,2	196,7 ± 21,2	31,0	23,3
100	185,6 ± 18,8	168,8 ± 16,6	37,8	34,1

5.12 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica

O LS 19 não produziu toxicidade após administração oral aguda, demonstrando que a DL₅₀ é maior que 900 µmol/kg (DL₅₀ > 900 µmol/kg). Os animais submetidos a avaliação toxicológica aguda e subcrônica não demonstraram nenhum sintoma de intoxicação (convulsão, hiperatividade, perda de reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação). Na avaliação subcrônica não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os valores de ganho ponderal de peso, média de consumo de ração e peso dos órgãos (Tabelas 17 e 18), e também das análises macroscópica e microscópica (Figura 37) entre os grupos controle e o grupo administrado com o composto.

Tabela 17 - Avaliação toxicológica sub-crônica com análise do peso corporal e consumo de ração:

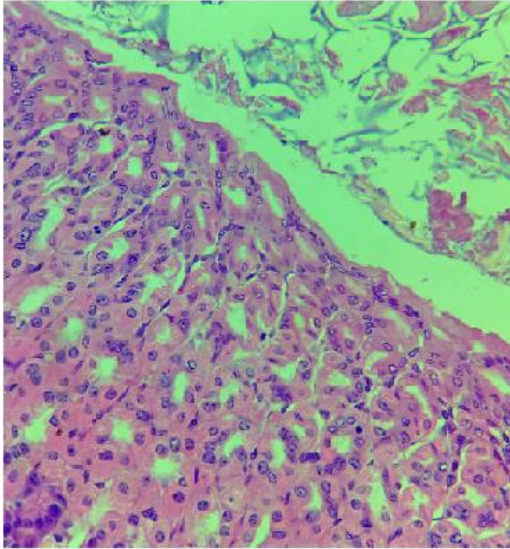
Grupos N=6	Média de massa corporal inicial \pm EPM / final \pm EPM (g)	Ganho ponderal de peso em 14 dias (g) \pm EPM	Média do consumo diário de ração/animal \pm EPM (g)	Alterações comportamentais	Morte natural
Controle	37,3 \pm 2,4/38,6 \pm 2,6	1,3 \pm 0,2	6,7 \pm 0,4	Ausentes	0
LS19 100 μ mol/kg	26,6 \pm 1,1/27,9 \pm 0,8	1,3 \pm 0,3	8,3 \pm 0,3	Ausentes	0

Tabela 18 - Análise macroscópica e peso dos órgãos:

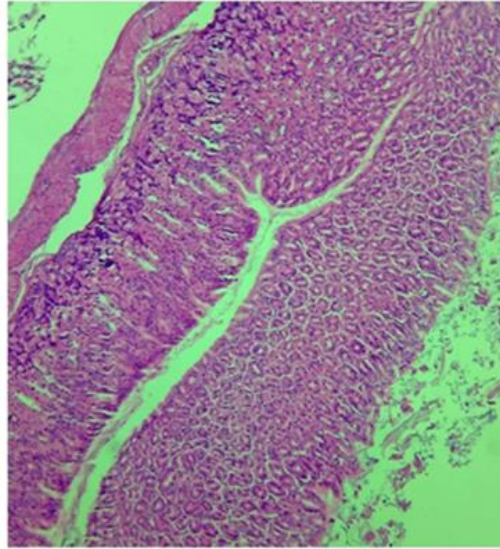
Órgãos	GRUPOS (N=6) /Pesos dos órgãos (g) \pm EPM	
	Controle	LS19 100 μ mol/kg
Fígado	1,52 \pm 0,14	1,26 \pm 0,04
Pulmões	0,22 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
Rim (D)	0,52 \pm 0,05	0,36 \pm 0,01
Estômago	0,8 \pm 0,05	0,54 \pm 0,03
Intestino	0,24 \pm 0,06	0,18 \pm 0,01
Alterações Macroscópicas	Ausente	Ausente

Figura 38 - Análise microscópica dos órgãos:

A1 – Estômago do animal controle (HE, objetiva de 10x)

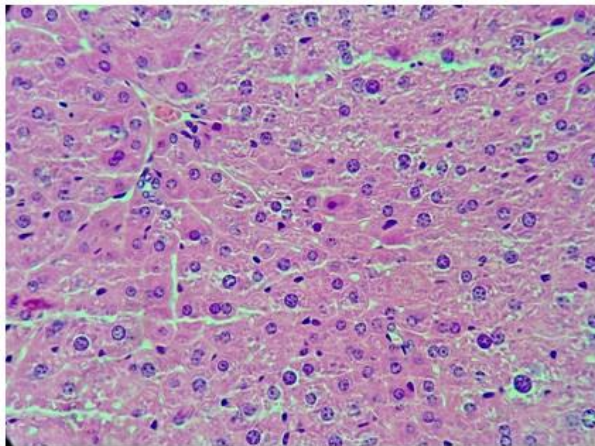


A2 – Estômago do animal tratado com LS19 (HE, objetiva de 40x)

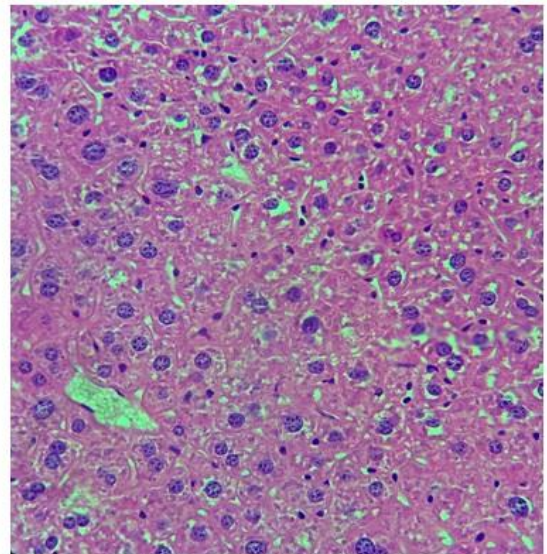


A1 e A2: Corte histológico de estômago: camada mucosa, submucosa e muscular apresentando morfologia usual.

B1 – Fígado do animal controle (HE, objetiva de 40x)

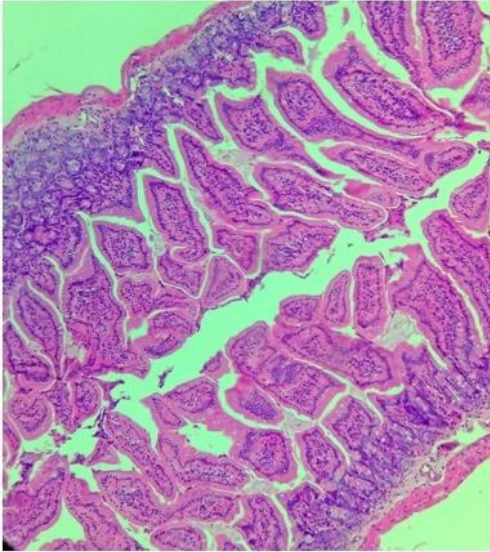


B2 – Fígado do animal tratado com LS19 (HE, objetiva de 40x)

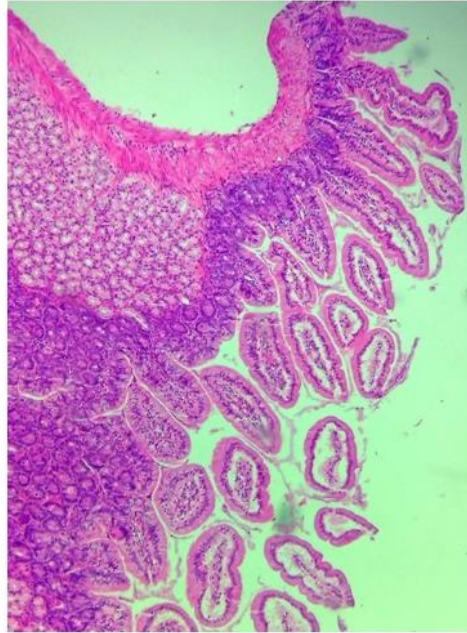


B1 e B2: corte histológico de fígado: placas de hepatócitos em meio a capilares sinusóides apresentando morfologia usual.

C1 – Intestino do animal controle (HE, objetiva de 10x)

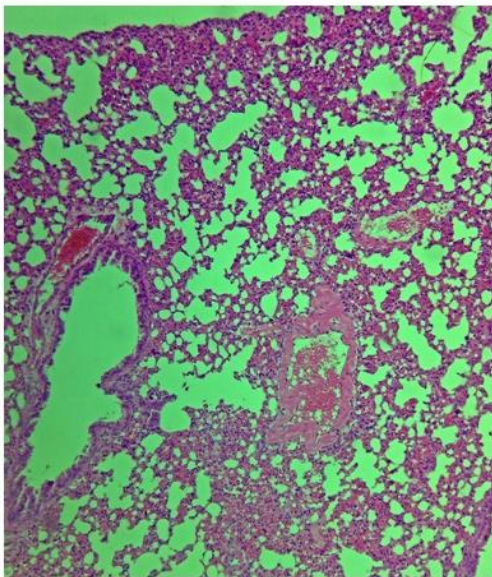


C2 – Intestino do animal tratado com LS19 (HE, objetiva de 10x)

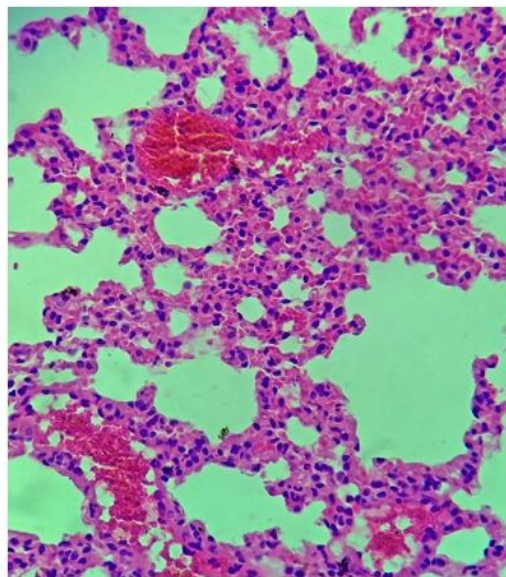


C1 e C2: corte histológico de intestino: camada mucosa exibindo vilosidades intestinais, submucosa e camada muscular de morfologia usual.

D1 – Pulmão do animal controle (HE, objetiva de 10x)

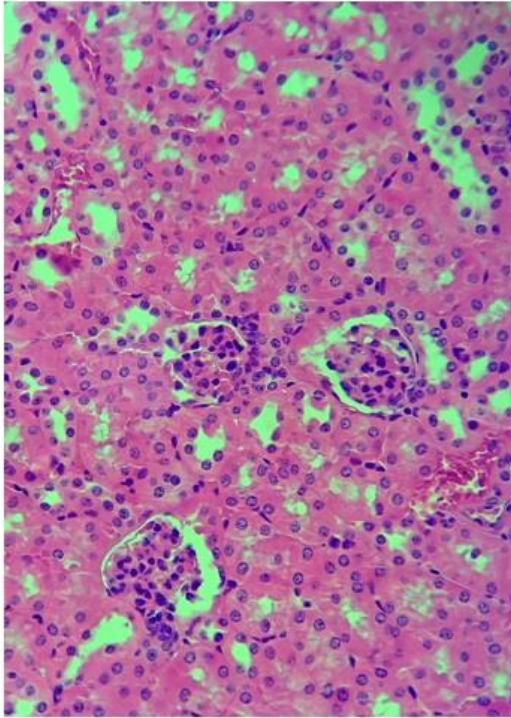


D2 – Pulmão do animal tratado com LS19 (HE, objetiva de 40x)

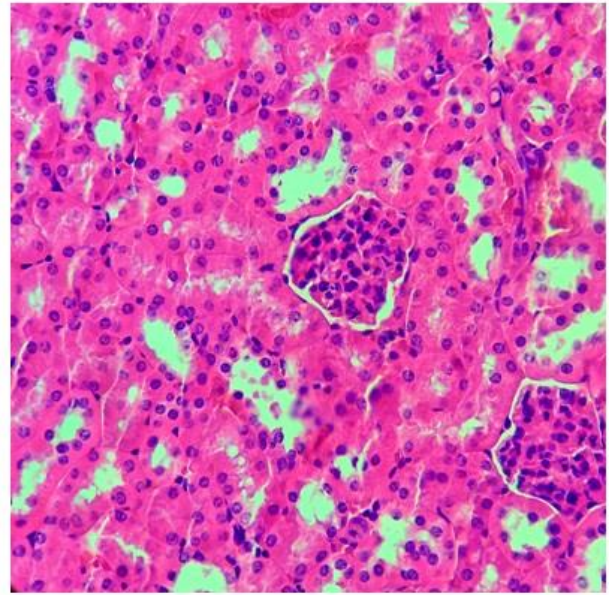


D1: corte histológico de pulmão: mostrando bronquíolos, alvéolos e capilares sanguíneos com áreas discretas de atelectasia; D2: corte histológico de pulmão: mostrando alvéolos e capilares sanguíneos com leve quantidade de sangue entre septos interalveolares e em grandes vasos.

E1 – Rim do animal controle (HE, objetiva de 40x)



E2 – Rim do animal tratado com LS19 (HE, objetiva de 40x)



E1 e E2: corte histológico de rim: mostrando região de córtex com presença de túbulos contorcidos e glomerulos de morfologia usual.

6 DISCUSSÃO

O tratamento adequado da dor inflamatória assume um aspecto clínico de alta prioridade. A terapia farmacológica é a mais utilizada e inclui uma ampla variedade de fármacos. O diagnóstico preciso e a causa da dor devem ser levados em consideração para que o tratamento seja o mais eficaz possível (MAO e cols., 2011).

Na terapia analgésica e anti-inflamatória, as classes farmacológicas mais utilizadas são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticóides), analgésicos antipiréticos e principalmente os fármacos opioides (TRANQUILLI e cols., 2013; PEREIRA, 2016).

Devido ao caráter multidimensional que a dor inflamatória apresenta, aumenta-se o interesse pela busca de novos fármacos mais eficazes e mais seguros. Estratégias de combinações farmacológicas podem maximizar a eficácia terapêutica e ao mesmo tempo minimizar os efeitos secundários nocivos (CHONG e cols., 2007).

Doenças incuráveis e com alto impacto socioeconômico ainda representam um desafio no setor farmacêutico. Patologias como câncer, tuberculose, hanseníase, doenças infecciosas relacionadas a microorganismos resistentes (por exemplo, a malária), viroses e doenças tropicais exigem um esforço contínuo na busca de novas tecnologias e avanços para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas mais eficientes, com maior seletividade, menor toxicidade e ainda economicamente acessível.

Uma das estratégias promissoras na síntese de novos fármacos é a hibridação molecular, definida como uma conjugação de estruturas de compostos bioativos diferentes em uma única molécula (ARAÚJO e cols., 2015).

Esta técnica de hibridação pode trazer vantagens farmacológicas bastante interessantes, como a terapia de dupla ação (um fármaco sendo, por exemplo, analgésico e anti-inflamatório), sinergismo (quando o efeito de dois ou mais agentes químicos combinados, é maior do que a soma dos efeitos individuais) e diminuição dos efeitos adversos (NEPALI e cols., 2014).

Com o estudo aprofundado de protótipos já conhecidos e avaliados quanto ao mecanismo de ação, propriedades físico-químicas, toxicidade e efeito terapêutico, é possível a síntese de um composto híbrido capaz de combater a doença de modo mais eficaz, seguro e ainda utilizando uma dose menor quando comparado aos seus precursores (NEPALI e cols., 2014).

Neste presente estudo, o composto híbrido cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) foi avaliado frente à modelos de nocicepção e inflamação *in vivo* e *ex vivo*, bem como seu potencial toxicológico e seu mecanismo de ação.

De início, foi realizado o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizado para triagem da atividade antinociceptiva. O composto, nas doses de 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$, foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle. Estudos experimentais anteriores feitos com seus precursores reforçam o efeito antinociceptivo neste modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o precursor CTHP foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg (GONÇALVES e cols., 2016). O outro precursor, diclofenaco de sódio, quando administrado por via oral nas doses entre 1 e 4 mg/kg , demonstrou efeito antinociceptivo, estando entre os compostos mais utilizados tanto em condições clínicas quanto experimentais (SCHOLER e cols., 1986). O composto LS19 foi mais potente que seus precursores neste modelo, apresentando DI_{50} 8,65 vezes menor que o composto CTHP e 3,79 vezes menor que o diclofenaco.

Quando o ácido acético é administrado por via intraperitoneal nos camundongos, ocorre uma reação dolorosa, conseqüente a uma inflamação aguda na área peritoneal. A estimulação dos nociceptores é indireta e ocorre com a liberação de substâncias endógenas, que por sua vez, estimulam terminações nervosas (ALVARENGA e cols., 2013). A nocicepção observada neste modelo tem sido relacionada a mediadores como PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGI_2 , bem como produtos da lipoxigenase (PARVEEN e cols., 2007). Este modelo também induz a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, mediadores diretamente ligados ao processo inflamatório e nociceptivo, tendo sido caracterizado que anticorpos anti- $\text{TNF-}\alpha$ e anti- $\text{IL-1}\beta$ inibem as contorções abdominais (VERRI e cols., 2006), comprovando o envolvimento destas citoninas na nocicepção induzida neste modelo.

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é o mais sensível na avaliação nociceptiva, porém é um modelo de nocicepção inespecífico, e incapaz de esclarecer sobre a ação central ou periférica do composto (NESS e GEBHART, 1990). Neste sentido, apesar do composto LS19 ter apresentado resultados relevantes neste modelo, o modelo da formalina foi utilizado na sequência para discriminação do processo nociceptivo.

O modelo da formalina é caracterizado por duas fases, as quais permitem distinguir entre dor neurogênica e dor inflamatória (CAPONE e cols., 2004).

A primeira fase ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção intraplantar da formalina, a resposta é proveniente de um estímulo químico direto das fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, sobretudo a fibra C, sendo sensível principalmente a fármacos que agem em nível central, como por exemplo, o opioide morfina (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Já a segunda fase acontece entre 15 a 30 minutos após a administração da formalina. Mediadores inflamatórios formados nos tecidos periféricos, como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas, induzem mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, promovendo assim a facilitação da transmissão em nível espinhal (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Nesta fase também ocorre aumento do nível dos mediadores excitatórios na medula espinhal, como por exemplo, o óxido nítrico e o glutamato (TJOLSEN e cols., 1992).

Fármacos que possuem ação central, tais como os analgésicos opioides, inibem ambas as fases do modelo de formalina, entretanto, fármacos de ação periférica, como os anti-inflamatórios são eficazes somente na segunda fase do teste (MIÑO e cols., 2002).

Os resultados demonstrados neste trabalho sugerem que o composto apresentou atividade sobre ambas as fases do teste de formalina, na maior dose utilizada (300 $\mu\text{mol/kg}$), bem como o fármaco de ação central utilizado que foi a morfina. Assim, o composto possivelmente tem uma atividade antinociceptiva não-inflamatória, enquanto o diclofenaco somente teve ação na segunda fase, apresentando atividade contra a dor inflamatória. O precursor CTHP, nas doses de 10 e 30 mg/kg, demonstrou atividade sobre as duas fases deste modelo, sugerindo também uma atividade antinociceptiva não-inflamatória (GONÇALVES e cols., 2016).

O modelo de imersão da cauda em água quente tem sido extensivamente utilizado como modelo experimental para medir a nocicepção de natureza não-inflamatória, especialmente para fármacos analgésicos com ação central (DEWEY e cols., 1969). Neste estudo, foi demonstrado que o composto LS19 prolongou a latência de retirada da cauda dos animais. Esse resultado indica que o composto foi eficaz em inibir a nocicepção térmica. Esse teste envolve o processo de reflexo espinhal, mas também podem envolver estruturas neurais superiores e, portanto, identifica

principalmente analgésicos de ação central (LE BARS e cols., 2001). Além disso, é sensível para identificar a atividade de compostos, naturais ou sintéticos, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opioides (OLIVEIRA e cols., 2008).

Subsequentemente, utilizando ainda o teste de imersão da cauda em água quente, os resultados demonstram que a naloxona (antagonista não-seletivo opioide) foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo do composto LS 19, evidenciando a participação da via opioide no seu mecanismo de ação. Foi realizada também uma investigação mais aprofundada em relação ao mecanismo de ação envolvendo opioides. Grupos experimentais receberam antagonistas seletivos opioides (metilnaltrexona, nor-binaltorfimina e naltrindol). Os resultados revelam que todos os antagonistas seletivos reduziram o efeito antinociceptivo do composto LS 19. Este resultado sugere que o composto pode ser um agonista não-seletivo opioide ou um liberador de opióides endógenos; diferente de seu precursor, CTHP, que demonstrou seletividade para o receptor opioide κ (GONÇALVES e cols., 2016).

Historicamente, a modulação endógena da dor tem sido vista como a atenuação da transmissão no corno dorsal da medula espinhal por estímulos descendentes inibitórios provenientes do encéfalo. A teoria de Melzack e Wall do “portão da dor” lançou esta ideia em 1965 (MELZACK; WALL, 1965). Atualmente está bem definido que a modulação endógena da dor pode ocorrer em todos os níveis do sistema nervoso, a saber, periféricamente, em receptores localizados em terminais nervosos; na medula espinhal, em especial no corno dorsal da medula espinhal; ou em sítios supra-espinhais, sendo dependente do contexto da lesão, bem como de fatores endógenos.

No nosso organismo há poderosos mecanismos endógenos que combatem a dor. Na medula espinhal os sinais nociceptivos são inibidos pela liberação de peptídeos opioides endógenos ou interneurônios GABAérgicos que ativam receptores GABA tanto pré quanto pós sinápticos responsáveis por diminuir a liberação de neurotransmissores excitatórios. A abertura de canais de K^+ ou Cl pós-sinápticos por opioides ou GABA evocam potenciais de ação hiperpolarizantes que inibem neurônios na região dorsal (STEIN e cols., 2018). No sistema nervoso central as principais regiões envolvidas são a substância cinzenta periaquedutal e o prosencéfalo (SCHUMACHER e cols., 2015).

Após a ligação do opioide com seu respectivo receptor (μ , δ ou κ), mudanças conformacionais ocorrem e permitem o acoplamento intracelular de proteínas Gi/Go. Na subunidade $G\alpha$, GDP é substituído por GTP e há uma dissociação das subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Cascatas intracelulares são ativadas, inibindo adenilil ciclase, AMPc e ocorre também uma interação diretamente com canais de íons da membrana (STEIN, 2016). As interações intracelulares podem modular as correntes iônicas pré e pós-sinápticas de cálcio e diminuem a excitabilidade de neurônios e reduzem a liberação de neuropeptídeos pronociceptivos/pró-inflamatórios (BASBAUM e cols., 2009). Além disso, o receptor opioide ativado pode levar a abertura de canais de potássio acoplado à proteína G (GIRK), impedindo a propagação de potenciais de ação (NOCKEMANN e cols., 2013). A combinação de todos estes mecanismos de ação culmina na diminuição da transmissão de estímulos nociceptivos e reduz profundamente a dor.

O NO tem sido consistentemente confirmado como mediador do efeito analgésico central da morfina e tido como potencializador das ações da morfina administrada sistemicamente (CHEN e PAN, 2003). Além disso, tem sido mostrado que a morfina, via ativação de receptores opioides, induz a elevação dos níveis de mRNA para NO sintase com elevada expressão de nNOS (NO sintase neuronal) (TODA e cols., 2009). Dados também sugerem que a produção de NO supraespinal é capaz de modular a transmissão de sinais inibitórios opioides no sistema nervoso central (JAVANMARDI e cols., 2005).

Para avaliar a participação do óxido nítrico no mecanismo de ação do composto, o L-NAME (inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase) foi administrado previamente ao composto no modelo de imersão da cauda em água quente. De acordo com o resultado, o L-NAME foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do composto LS19, sugerindo uma participação do NO.

O óxido nítrico desempenha um papel complexo e diverso na modulação do processamento nociceptivo, apresentando um duplo efeito sobre a transmissão e o controle da dor (CURY e cols., 2011). O óxido nítrico é um mediador importante de nocicepção. No entanto, as evidências experimentais e clínicas demonstraram que o NO também é capaz de induzir a analgesia. Este efeito é consequência da ativação da guanilato ciclase, com subsequente elevação dos níveis intracelulares de GMPc, ativação de proteína quinase G (PKG) e abertura de canais de potássio (ALVES e DUARTE, 2002).

Uma vez produzido, o NO ativa a enzima guanilato ciclase, que aumenta os níveis intracelulares de GMPc. Esse mecanismo leva a abertura dos canais K⁺ATP gerando uma hiperpolarização dos neurônios aferentes primários e, finalmente resultando na antinocicepção (NGUELEFACK e cols., 2010).

Diversos estudos indicam que o NO e o GMPc podem ativar canais de K⁺ em diferentes tecidos. O efluxo de potássio tem efeito significativo na regulação da excitabilidade neuronal, induzindo hiperpolarização. A prévia administração de ODQ, um inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase, e também da glibenclamida, bloqueador seletivo de canais de K⁺ATP, foram capazes de reduzir a atividade antinociceptiva do composto LS19. A partir desta evidência, sugere-se que a via NO/GMPc/K⁺ATP está diretamente envolvida no mecanismo de ação do composto. A evidência é reforçada com estudos anteriores feitos por GONÇALVES e cols., 2016 em que o composto precursor do LS19, o composto CTHP, também envolve a participação desta via em seu mecanismo de ação.

Estudos mostram que a acetilcolina exerce ação analgésica periférica através da sua capacidade de induzir a liberação de NO, e desta forma o NO mediará a ação analgésica da acetilcolina (DUARTE e cols., 1990). Muitos estudos também têm demonstrado que o NO interage com mecanismos noradrenérgicos e colinérgicos envolvidos na via inibitória descendente de controle da dor. E uma interação recíproca entre NO, acetilcolina e α 2-adrenoreceptor foi observada na medula espinhal (XU e cols., 2000).

Sendo assim, deu-se início a investigação da participação da via colinérgica sobre o mecanismo de ação do composto LS 19. Muitos estudos sugerem que a acetilcolina (ACh) exibe efeito antinociceptivo, podendo atuar através de várias vias monoaminérgicas e, que a ACh desempenha um papel de modulador do processo doloroso, participando do processo de inibição descendente. Os receptores muscarínicos modulam a nocicepção em nível de medula espinhal (JAIN, 2004; JONES, 2007). A administração de agonistas colinérgicos aumenta a liberação de neurotransmissores inibitórios, como o GABA e a glicina, demonstrando que o sistema colinérgico é essencial no controle endógeno da dor (SHI e cols., 2011).

Com relação então à influência do sistema colinérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS 19, os nossos resultados sugerem que este sistema pode estar envolvido no mecanismo de ação do composto, pois houve reversão da

antinociceção no modelo de imersão da cauda em água quente, após a administração prévia de atropina (antagonista competitivo não-seletivo de receptores muscarínicos).

A nociceção induzida por capsaicina permite avaliar se o composto em estudo atua de alguma forma via TRPV1. O papel dos receptores TRPV1 na nociceção aguda e crônica tem sido estabelecido pelo uso de antagonistas TRPV1 (p.ex capsazepina) e por camundongos TRPV1 *knockout* (WALKER e cols., 2003). Diversos estudos demonstram que a antinociceção pode ser atribuída a dessensibilização induzida por agonistas dos receptores TRPV1, mais intimamente relacionado na inibição da dor crônica, enquanto os antagonistas desse receptor atuam inibindo sua ativação e consequentemente a liberação de mediadores químicos algésicos como, por exemplo, a substância P. Os antagonistas TRPV1 são apontados como agentes poderosos no tratamento da dor pós operatória, inflamatória e também na artrite (LOPEZ e cols., 2003; EL KOUHEN e cols., 2005). No modelo de nociceção induzida por capsaicina o composto LS19 foi capaz de inibir significativamente o tempo de lambadura comparado ao controle. Esse resultado demonstra que, de alguma forma, os receptores TRPV1 podem estar envolvidos no mecanismo do composto.

Em seguida, o modelo de placa quente foi utilizado para avaliação do composto sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por capsaicina, e posterior quantificação de citocinas. Foi observado a capacidade do composto em aumentar o tempo de reatividade (efeito antinociceptivo) relacionada a redução na concentração de citocinas pró-inflamatórias na pata. A literatura mostra o envolvimento de receptores TRPV1/TRPA1 não-neuronais na dor e inflamação neurogênica. Queratinócitos expressam receptores TRPV1/TRPA1, sendo assim estas células desempenham um papel importante na integridade da resposta imunológica na pele, bem como estimula a inflamação cutânea via liberação de prostanóides e citocinas (GRÖNE e cols., 2002). A ativação de receptores TRPV1 pela capsaicina é responsável por aumento na produção de mediadores, tais como prostanóides e citocinas. Mediadores inflamatórios, liberados a partir da ativação de receptores TRPV1/TRPA1 nos queratinócitos, podem ativar as terminações nervosas sensoriais, presentes em alta densidade na pele (ATOYAN e cols., 2009).

Desta forma o composto LS19 pode, através de sua ação sobre receptores TRPV1, inibir a ação da capsaicina reduzindo a liberação de citocinas e sua consequente ativação de terminações sensoriais, controlando a dor inflamatória induzida pela

capsaicina. Acredita-se que o composto também possa atuar sobre os receptores TRPV1 nas células neuronais, controlando assim a dor de natureza não-inflamatória.

Algumas evidências sugerem que o controle da atividade motora pode interferir na avaliação da resposta nociceptiva, uma vez que os modelos *in vivo* utilizados dependem da resposta motora dos animais frente ao estímulo nocivo (LE BARS e cols., 2001), e para conferir isso, a atividade locomotora foi avaliada no teste de rotarod. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre camundongos pré-tratados com o composto LS 19 e os grupos controle. Isso descarta uma possível interferência do composto na atividade motora e, conseqüentemente, uma resposta falso-positiva nos modelos nociceptivos realizados.

Em terminais periféricos, diversos mediadores endógenos com efeitos pró- ou antinociceptivos podem ser liberados por células locais lesionadas, células do sistema imune ativadas, e até mesmo pelos queratinócitos da pele. Dentre os mediadores de efeito pró-nociceptivo, podemos citar o fator de ativação plaquetária (PAF), as prostaglandinas, a bradicinina e citocinas pró-inflamatórias diversas, tais como a interleucina IL-1 β e o fator de necrose tumoral TNF- α (OPREE e cols., 2000). Neste contexto, o composto LS 19 foi testado frente a condições relacionadas ao processo inflamatório.

A inflamação induzida pela injeção de carragenina em cavidades pleural e peritoneal é geralmente caracterizada por um acúmulo de exsudato e intensa migração de células inflamatórias. Da mesma forma, a injeção intraplantar desse agente induz uma resposta inflamatória marcante com desenvolvimento de edema e hiperalgesia (NAKAMURA e cols., 1987; POSADAS e cols., 2004).

A investigação do efeito anti-inflamatório do composto LS19 foi feita primeiramente através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, o método mais comumente aplicado em estudos experimentais (SHEJAWAL, MENON & SHAILAJAN, 2014).

A carragenina é um agente flogístico composta por hidratos de carbono de cadeia longa e possui ação irritante. O processo inflamatório resultante por essa substância tem caráter bifásico, na primeira hora os mediadores inflamatórios envolvidos são principalmente histamina, serotonina e bradicina; na segunda fase ocorre alta produção de prostaglandinas, liberação de radicais livres derivados de neutrófilos e

citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β e TNF- α) (HALICI e cols., 2007; ZHU e cols., 2011).

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, o composto LS19 foi capaz, em todas as doses utilizadas, de reduzir significativamente o edema, quando comparado ao grupo controle. A partir deste efeito, o composto tem um caráter anti-edematogênico. Um de seus precursores, o fármaco diclofenaco de sódio, exibe atividade anti-edematogênica com dose oral única na faixa de 0,3 a 10 mg/kg, exibindo uma inibição de forma dose-dependente (Scholer e cols., 1986). A outra molécula precursora, CTHP, foi capaz de reduzir o edema de forma significativa em todas as doses testadas (5, 10 e 30 mg/kg) (GONÇALVES e cols., 2016).

A injeção de carragenina em outro modelo, na bolsa de ar subcutânea, produz uma reação inflamatória não imunológica, caracterizada pela produção acentuada de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, bem como influxo significativo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estes parâmetros podem ser quantificados e utilizados para determinar o grau de inflamação, a resolução da inflamação ou a atividade anti-inflamatória de fármacos (DUARTE e cols., 2012).

A administração oral do composto LS19 diminuiu significativamente a migração de leucócitos decorrentes do agente inflamatório carragenina no teste de bolsa de ar subcutâneo, com todas as doses utilizadas (10, 100 e 300 μ mol/kg), demonstrando que o composto tem capacidade em reduzir o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação.

A função da resposta inflamatória na geração do efeito nociceptivo não é exclusivamente feita pela migração de leucócitos. Acredita-se que citocinas pró-inflamatórias podem ter origem em células imunológicas, neuronais e gliais (microglia e astrócitos), tanto no sistema nervoso periférico quanto central. As respostas geradas pelas citocinas, de modo geral, podem causar uma hiperexcitabilidade crônica e uma exacerbação do processo algésico (MILLER e cols., 2009).

Durante uma lesão tecidual e inflamação, uma das citocinas geradas é a IL-1 β . O composto LS19 diminuiu a produção desta citocina em todas as doses experimentais. A IL-1 β participa da inflamação sistêmica através da ativação da expressão de COX-2, induzindo a formação da prostaglandina E2, resultando no sinal clínico de febre. Além disso, auxilia na produção de moléculas de adesão endotelial, óxido nítrico e substância P (WOLF e cols., 2008).

O composto também foi testado frente a IL-6, porém não apresentou diferenças significativas relacionadas à produção desta citocina. A IL-6 está relacionada à síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, de leucócitos na medula óssea e produção de febre (LIN e cols., 2000).

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória presente principalmente em monócitos, macrófagos e linfócitos T. Exerce um papel relevante na hiperalgesia inflamatória e também na dor neuropática. Outras funções envolvem a expressão ou liberação de moléculas de adesão, de PGE2 e podem influenciar a apoptose das células (RAEBURN e cols., 2002). O TNF- α também ativa os neutrófilos, participando da adesão, quimiotaxia e desgranulação destas células (COMMINS e cols., 2010). O composto LS19 demonstrou envolvimento do TNF- α em sua atividade anti-inflamatória, já que nas maiores doses testadas (300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$) os níveis deste mediador foram significativamente menores. Estudos feitos por AMAYA e cols., em 2013 demonstraram hiperalgesia no local de administração tanto de TNF- α quanto de IL-1 β . O composto CTHP, um dos precursores do LS19, foi capaz de reduzir somente a concentração da citocina TNF- α no exsudato inflamatório da bolsa de ar subcutânea, porém os níveis de IL-1 β não foram alterados (GONÇALVES e cols., 2016).

O composto LS19 também foi testado utilizando citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10, aumentando a produção somente da última citada. A IL-4 é produzida por linfócitos T-CD4, mastócitos e basófilos, induz a diferenciação de linfócitos B para produzir as imunoglobulinas IgG e IgE, importantes nos processos de alergia e anti-helmínticos. Além disso, inibe a produção de radicais livres de oxigênio e das citocinas TNF- α e IL-1 β (SOMMER e cols., 2010). A IL-10 é produzida por células imunológicas e tecidos neuroendócrinos. Tem propriedades anti-inflamatórias já que é responsável pela inibição de citocinas como IL-6, IL-1 β e TNF- α . Outra ação da IL-10 envolve o aumento da proliferação de mastócitos e inibição da produção de IFN- γ pelas células natural killer (ZHANG e cols., 2007).

O IFN- γ é uma proteína solúvel capaz de proteger as células principalmente de infecções causadas por vírus. Produzido por linfócitos Th1, T citotóxicos e células natural killer, promovendo assim atividade anti-tumoral dos linfócitos T citotóxicos e aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade 1 e 2 (MHC I e MHC II), que por sua vez, são moléculas que apresentam os antígenos aos linfócitos T (ARAÚJO-SOUZA e cols., 2015).

A ativação de células natural killer pela citocina pró-inflamatória IFN- γ pode levar a destruição de células tumorais que possuem expressão diminuída de moléculas do tipo MHC I (PEGRAM e cols., 2010). Os resultados com o composto LS19 referentes à produção de IFN- γ não foram diferentes significativamente quando comparados aos grupos controle.

O composto LS19 não interfere na produção de óxido nítrico (NO) perifericamente, como foi possível observar na quantificação deste mediador a partir do exsudato da bolha de ar subcutânea, porém diante do envolvimento da via NO/GMPc/K⁺ATP no mecanismo de ação do composto, sugere-se que o NO é de suma importância no efeito antinociceptivo do mesmo.

Dados da literatura demonstram a participação do óxido nítrico no efeito antinociceptivo de vários compostos analgésicos, como opioides (MIXCOATL-ZECUATIL e cols., 2000; JAVANMARDI e cols., 2005; CHENA e cols., 2006), AINES (VENTURA-MARTINEZ e cols., 2004; LOZANO-CUENCA e cols., 2005) e fármacos originados a partir de produtos naturais (PICOLO e cols., 2000; GUGINSKI e cols., 2009).

A partir daí, diversas linhas de pesquisas investigam o papel do óxido nítrico na antinocicepção e de acordo com: a similaridade do local de ação da ACh e dos opioides, a demonstração que o NO medeia o efeito analgésico de ACh e ainda que os opioides induzem a produção neuronal de GMPc, (MINNEMAN e cols., 1976; CURY e cols., 2011) fortes evidências sugerem o envolvimento dos sistemas opioide, colinérgico e a via NO/GMPc/K⁺ATP no efeito antinociceptivo de fármacos, incluindo o composto LS19.

Nossos resultados demonstram uma pequena preferência de seletividade do composto LS19 sobre a inibição da enzima COX-2. Até o momento há três isoformas descritas na literatura, a COX-1 é considerada constitutiva e é responsável pela síntese de prostaglandinas (PGs), funções extremamente relevantes são exercidas por esta enzima, como produção de muco no trato gastrointestinal, atividade antiplaquetária e produção de tampão bicarbonato (HCO₃⁻) (BATLOUNI e cols., 2010). Já a COX-2 é conhecida como induzível ou inflamatória, após uma injúria há a indução de síntese de PGs que tem participação na formação do edema, febre e hiperalgesia. Além desses efeitos, pode exercer também funções fisiológicas principalmente nos rins, células vasculares endoteliais, medula espinhal, ovários, entre outros órgãos que secretam

prostaciclina (PGI₂) (DA SILVA e cols., 2014). A COX-3 é a terceira isoforma da enzima COX, está presente no córtex cerebral, medula espinhal e coração e produz substâncias anti-inflamatórias (MOSQUINI e cols., 2011).

Fármacos inibidores seletivos de COX-2 podem ser utilizados como uma primeira escolha em pacientes que tenham algum acometimento no trato gastrointestinal, já que a inibição de COX-2 não apresenta efeitos adversos gástricos (DA SILVA e cols., 2014).

Um dos cuidados na utilização dessa classe de fármacos é um possível desequilíbrio entre alguns eicosanoides, como a PGI₂ e o tromboxano A₂ (TXA₂). A PGI₂ é importante no controle homeostático do sistema cardiovascular, inibe a agregação de plaquetas e funciona como vasodilatador, o TXA₂ é oposto, responsável por um efeito vasoconstritor e provoca agregação plaquetária (MENDES e cols., 2012). A administração prolongada e contínua de alguns fármacos inibidores de COX-2 pode aumentar o risco de eventos trombóticos. Deve-se levar em consideração esses fatores na conduta terapêutica do paciente (FIGUEIREDO e cols., 2015).

Diante dos resultados obtidos nessa tese, o composto cis - (±) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS 19) apresenta um efeito antinociceptivo e anti-inflamatório promissor e demonstra segurança em sua utilização em camundongos nas doses testadas e pelo tempo avaliado, já que nos ensaios de toxicidade aguda e subcrônica não houve alterações. Os animais não apresentaram nenhum sintoma clínico tóxico tanto na análise aguda quanto subcrônica. A média de consumo de ração, ganho de peso corporal e peso dos órgãos não apresentaram diferença significativa quando comparado os grupos tratados com o composto LS19 e os animais do grupo controle. Além disso, o composto não comprometeu os órgãos avaliados (rins, pulmões, estômago, fígado e intestino). Não houve alterações macro nem microscópicas, preservando a estrutura morfológica dos órgãos. Esses dados sugerem o uso seguro do composto na terapêutica de patologias relacionadas a dor e a inflamação.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir os seguintes pontos:

- O composto cis - (\pm) - acetato de 4-cloro-6- (naftaleno-1-il)-tetraidro-2H-pirano-2-il) metil 2- (2-(2,6-diclorofenilamino) fenila (LS19) possui atividade antinociceptiva, sob estímulo químico e térmico, de acordo com os resultados obtidos nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, imersão da cauda em água quente e placa quente;
- Participação dos sistemas opioide, colinérgico, nitrérgico e vaniloide no mecanismo de ação antinociceptivo do composto LS19;
- O composto LS19 demonstra efeito anti-inflamatório através da confirmação de sua atividade anti-edematogênica, capacidade em reduzir a migração leucocitária e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e atividade inibitória da enzima COX;
- Nas condições avaliadas, o composto demonstra exibir segurança terapêutica. Não houve alterações toxicológicas agudas e subcrônicas a nível macro e microscópico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S; SULTANA, M; HASAN, M. M. U; AZHAR, I. **Analgesic and Antiemetic Activity of *Cleome Viscosa L.*** Pakistan Journal of Botany, v. 43, p. 119-122, 2011.

AIRES, M. M. **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1252p; 2008.

ALESSIO, P.D; MOUTET, M; COUDRIER, E; DARQUENN, E.S; CHAUDIERE, J. **ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF- are inhibited by a glutathione peroxidase mimic.** Free Radic. Biol. Med., v.24, p. 979-987, 1998.

ALVARENGA, F.Q.; MOTA, B.C.F.; LEITE, M.N.; FONSECA, J.M.S.; OLIVEIRA, D.A.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; ESPERANDIM, V.; BORGES, A.; LAURENTIZ, R.S. **In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine.** Journal of Ethnopharmacology 150, 280–284, 2013.

ALVES, D; DUARTE, I.D. **Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrrone.** Eur. J. Pharmacol.; 444: 47-52. 2002.

AMAYA, F; IZUMI, Y; MATSUDA, M; SASAKI, M. **Tissue Injury and Related Mediators of Pain Exacerbation.** Curr Neuropharmacol.; 11(6): 592–597, 2013.

APKARIAN A.V; BUSHNELL M.C; TREEDE R.D: **Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease.** Eur J Pain: 9:463–484, 2005.

ARAÚJO, C. R. M., LEITE FILHO, C. A., SANTOS, V. L. DOS A., MAIA, G. L. DE A., & GONSALVES, A. DE A. **Drug development by molecular hybridization: a medicinal chemistry practice class using paracetamol and sulfadiazine tablets and the virtual toolscifinder®.** Química Nova. Vol. 38, No. 6, 868-873, 2015.

ARAÚJO-SOUZA, P. S.; HANSCHKE, S. C. H.; VIOLA, J. P. B. **Epigenetic Control**

of Interferon-Gamma Expression in CD8+ T Cells. *Journal of Immunology Research*, p. 849573, 2015.

ARVIDSON U, RIED M, CHAKRABARTI S, VULCHANOVA L, LEE J-H, NAKANO AH, LIN X, LOH HH, LAW P-Y, WESSENDORF MW & ELDE R. **The κ -opioid receptor is primarily postsynaptic: combined immunohistochemical localization of the receptor and endogenous opioids.** *Proc Natl Acad Sci* 92: 5062-5066, 1995.

ATOYAN, R.; SHANDER, D.; BOTCHKAREVA, N.V. **Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin.** *J Invest Dermatol* 129, 2312–2315. 2009.

BASBAUM A.I, BAUTISTA D.M, SCHERRER G, JULIUS D. **Cellular and molecular mechanisms of pain.** *Cell*. 139:267–284, 2009.

BATLOUNI, M. **Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais.** *Arq Bras Cardiol*, v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

BEN-BASSAT J, PERETZ E, SULMAN FG. **Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method.** *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 122:434-47, 1959.

BEVAN, S; HOTH, S; HUGHES, G; JAMES, I.F; RANG, H.P; SHAH, K; WALPOLE, C.S; YEATS, J.C. **Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin.** *Br. J. Pharmacol*. 107, 544-552, 1992.

BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M; DIEFENBACH, A. **Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity.** *Curr Opin Immunol*, 12 (1):64-76, 2000.

BOOTH, M. **Opium - a History**. New York, St Martin's Griffin, 1998.

BOOTHE, D.M. **Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 281-311, 2001.

BOWEN, C.A; NEGUS, S.S; ZONG, R; NEUMEYER, J.L; BIDLACK, J.M; MELLO, N.K. **Effects of mixed-action kappa/mu opioids on cocaine self-administration and cocaine discrimination by rhesus monkeys**. *Neuropsychopharmacology*.; 1125-39, 2003.

BRADLEY, J.R. **TNF-mediated inflammatory disease**. *J. Pathol.*, v. 214, p. 149-60, 2008.

BREDT, D.S; HWANG, P.M; SNYDER, S.H. **Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide**. *Nature*; 347:768-770, 1990.

BROWN, M.A; MILLER, J; HURAL, J. **Functions of IL-4 and Control of Its Expression**. *Critical Reviews in Immunology*, 37(2-6):197-229, 2017.

BRUCKDORFER, R. **The basics about nitric oxide**. *Mol Asp Med*; 26: 3-31, 2005.

BUDSBERG, S. C. **Tendencias actuales y futuras en el uso de los AINEs para el tratamiento de la osteoartritis en los perros**. *Waltham Focus, Hannover*, v. 9, n. 2, p. 26-31, 1999.

CAPIM, S.L; CARNEIRO, P.H.P; CASTRO, P.C; BARROS, M.R.M; MARINHO, B.G; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **Design, Prins-cyclization, reaction promoting diastereoselective synthesis of 10 new tetrahydropyran derivatives and in vivo antinociceptive evaluations**. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 58:1-11, 2012.

CAPIM, S. L; GONÇALVES, G. M; DOS SANTOS, G. C. M; MARINHO, B. G; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **High analgesic and anti-inflammatory in vivo**

activities of six new hybrids NSAIDs tetrahydropyran derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(19), 6003–6010, 2013.

CAPONE, F.; ALOISI, A. M.; **Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test.** *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v.40, p.223-229, 2004.

CARVALHO, W.A; LEMÔNICA, L. **Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos.** *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.48, p. 137-158, 1998.

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

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

CHEN S.R., PAN, H.L. **Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats.** *Anesthesiology* 99: 1409–1414. 2003

CHENA, L.X; QIA, Y.M; WANGB, R; DUAN, X; GAO, Y.F; YANG, D.J. **Roles of nitric oxide synthase inhibitor on antinociceptive effects of mu-opioid agonist in mice.** *Protein Pept. Lett.* 13, 993–997, 2006.

CHONG, C.R.; SULLIVAN, D.J.Jr. **New uses for old drugs.** *Nature*, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.

CLYDESDALE GJ, DANDIE GW, MULLER HK. **Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects.** *Immunol. Cell Biol.* 79: 547–568, 2001.

CRUVINEL, W.M. **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

COGGESHALL, R.E. **Opioid receptors on peripheral sensory axons.** Brain. Res., v.764, p. 126-132, 1997.

COMMINS, S.P; BORISH, L; STEINKE, J.W. **Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines.** The Journal of allergy and clinical immunology. 125(2 Suppl 2):S53-72., 2010.

CORDERO-ERAUSQUIN, M; CHANGEUX, J.P. **Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 2803–2807, 2001.

CUI JG, HOLMIN S, MATHIESEN T, MEYERSON BA, LINDEROTH B. **Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy.** Pain 88: 239-48, 2000.

CULOTTA, E; KOSHLAND, D.E. **NO news is good news.** Science; 258:1862-5, 1992.

CUNHA, T.M; ROMAN-CAMPOS, D; LOTUFO, C.M; DUARTE, H.L; SOUZA, G.R; VERRI, W.A., JR; FUNEZ, M.I; DIAS, Q.M; SCHIVO, I.R; DOMINGUES, A.C; SACHS, D; CHIAVEGATTO, S; TEIXEIRA, M.M; HOTHERSALL, J.S; CRUZ, J.S; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. **Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ / AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:4442–4447, 2010.

CURY, Y; PICOLO, G; GUTIERREZ, V.P; FERREIRA, S.H. **Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system.** Nitric Oxide 25: 243–254, 2011.

DA SILVA, J, M. **Antiinflamatórios não esteróides e suas propriedades gerais.** Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v.7, n.4, 2014.

DAL, D; SALMAN, M.A; SALMAN, A.E. **The involvement of nitric oxide on the analgesic effect of tramadol.** Eur J Anaesthesiol; 23: 175-177, 2006.

DANI J.A. **Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine.** Int Rev Neurobiol;124:3–19, 2015.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M. **IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms.** J. Clin. Invest., 109: 1271–1277, 2002.

DEMOPOULOS, C.A. **State of lipid research in greece.** Euro. J. Lipid Sci. Technol. 102, 665–666, 2000.

DEMOPOULOS, C.A.; KARANTONIS, H.C.; ANTONOPOULOU, S. **Platelet-activating factor—a molecular link between atherosclerosis theories.** Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 705–716, 2003.

DEMPSEY, P.W; DOYLE, S.E; HE, J.Q; CHENG, G. **The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily.** Cytocine Growth Factor Rev, 14:193-209, 2003.

DEVLIN, T.M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.** 6th Edition, Wilwy-Liss publication, 2006.

DEWEY, W. L. **The effect of narcotics and narcotic antagonists on the tail- flick response in spinal mice.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 21, n. 8, p. 548-50; 1969.

DICKINSON, A.L.; LEACH, M.C.; FLECKNELL, P.A. **Influence of early neonatal experience on nociceptive responses and analgesic effects in rats.** Lab. Anim, 2009.

DINARELLO, C.A. **The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome.** J. Infect. Dis., v.163, p. 1177-84, 1991.

DUARTE, I.D; LORENZETTI, B.B; FERREIRA, S.H. **Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway.** Eur. J. Pharmacol. 186, 289–293, 1990.

DUARTE, D.F. **Uma Breve História do Ópio e dos Opióides.** Rev Bras Anesthesiol.; 55: 1: 135 – 146, 2005.

DUARTE, D.B.; VASKO, M.R.; FEHRENBACHER, J.C. **Models of inflammation: carrageenan air pouch.** Current protocols in pharmacology. v. 56, p. 561-568, 2012.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. **A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice.** *Journal of American Pharmacy.* v. 46, p. 208-209, 1957.

EL KOUHEN, R., SUROWY, C.S., BIANCHI, B.R, NEELANDS, TR.; MCDONALD HA NIFORATOs, w GOMTSYAN, Ai LEE, C.H., HONORE, P., SULLIVAN, J.P JARVIS, M F., FALTYNEK, C.R. **A 425619[1-soquinolin 5-yl-3(4 trifluoromethyl- benzyl ureal, a novel and selective transient receptor potential type v1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid.** The Journal pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 314, n. 1, p. 400-409, 2005.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor.** Petrov P, Francischi JN, Ferreira SH, et al. tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 106 p., 2011.

FELDMAN, M.; McMAHON, A. T. **Do Cyclooxygenase-2 Inhibitors Provide Benefits Similar to Those of Traditional Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs,**

with Less Gastrointestinal Toxicity? *Annuary International Medicine*, v. 132, p.134-143, 2000.

FENG, Y.; XIAOZHOU, H.; YANG, Y.; CHAO, D.; LAZARUS, L.H.; XIA, Y. **Current research on opioid receptor function.** *Curr Drug Targets*, v. 13, n. 2, p. 230-46, 2012.

FERREIRA, S.H; VAN ARMAN, C.G. **Oedema and increased vascular permeability.** In: Vane JR, Van Arman CG, editors. *Handbook of experimental pharmacology*. New York 7 Springer-Verlag; p. 75-91, 1979.

FERREIRA, S.H; FERRARI, L.F; CUNHA, T.M; NASCIMENTO, P.G.B.D; JUNIOR, W.A.V; CUNHA, F.Q. **Dor: Princípios e Prática. Capítulo 19: Dor Inflamatória.** 2010.

FIGUEIREDO, L. M. F.; ALVES, T.C.A. **Uso dos anti-inflamatórios não esteróides no controle da dor aguda: revisão sistemática.** *Rev Neurocienc*, v. 23, p. 463-67, 2015.

FIORINO D.F; GARCIA-GUZMAN, M. **Muscarinic pain pharmacology: realizing the promise of novel analgesics by overcoming old challenges.** In: Fryer A.D., Christopoulos A., Nathanson N.M., editors. *Muscarinic Receptors*. Springer Berlin Heidelberg; pp. 191–221. (*Handbook of Experimental Pharmacology*), 2012.

FRANCISCHETTI, I; MORENO, J.B; SCHOLZ, M; YOSHIDA, W.B. **Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury.** *Rev Bras Cir Cardiovasc.*; 25(4): 575-584, 2010.

FRENZEL, L; HERMINE, O. **Mast cells and inflammation.** *Joint Bone Spine* 80: 141-145, 2013.

FRIAS, B; MERIGHI, A. **Capsaicin, Nociception and Pain.** *Molecules*, 21, 797, 2016.

FRIEBE, A; KOESLING, D. **Regulation of nitric-oxide-sensitive guanylyl cyclase.** Circ Res; 93:96-105, 2003.

GARCIA, X.; STEIN, F. **Nitric oxide.** Semin Pediatr Infect Dis 17:55-57, 2006.

GARLAND, E: **Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways.** Prim Care: 39:561–571, 2012.

GARTHWAITE, J; CHARLES, S.L; CHESS-WILLIAMS, R. **Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.** Nature 336: 385–388, 1998.

GARTHWAITE, J. **Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission.** Eur J Neurosci; 27: 2783-2802, 2008.

GAWEL, K; GIBULA-BRUZDA, E; DZIEDZIC, M; JENDA-WOJTANOWSKA, M; MARSZALEK-GRABSKA, M; SILBERRING, J; KOTLINSKA, J.H. **Cholinergic activation affects the acute and chronic antinociceptive effects of morphine.** Physiol Behav.;169:22–32, 2017.

GENZEN, J.R; MCGEHEE, D.S. **Short- and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors.** Proc Natl Acad Sci.;100:6807–6812, 2003.

GHELARDINI, C; MANNELLI, L.D; BIANCHI, E. **The pharmacological basis of opioids.** Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism; 12(3): 219-221, 2015.

GILROY, D.W; LAWRENCE, T; PERRETTI, M; ROSSI, A.G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.** Nat. Rev. Drug. Disc., 3:401-416, 2004.

GOENKA, S; KAPLAN, M.H. **Transcriptional regulation by STAT6.** Immunol Res.;50:87–96, 2011.

GONÇALVES, G. M; CAPIM, S. L; VASCONCELLOS, M. L. A. A; MARINHO, B. G. **Antihyperalgesic effect of [(±)-(2,4,6-cis)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methanol: participation of the NO/cGMP/KATP pathway and κ-opioid receptor..** Behavioural Pharmacology, 27(6), 506–515, 2016.

GOODMAN & GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.**, Ed. Guanabara Koogan, 12ª Edição., 2012.

GREEN, J.P; GLICK, S.D; CRANE, A.M; SZILAGYI, P.I. **Acute effects of morphine on regional brain levels of acetylcholine in mice and rats.** Eur J Pharmacol.;39:91–99, 1976.

GRINT, N.J.; BETHS, T.; YVORCHUK, K.; TAYLOR, P.M.; DIXON, M.; WHAY, H.R.; MURRELL, J.C. **The influence of various confounding factors on mechanical nociceptive thresholds in the donkey.** J. Vet. Anaesth. Analg. 41, 421–429, 2014.

GRÖNE, A.; FONFARA, S.; BAUMGÄRTNER, W. **Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection.** Viral Immunol 15, 493–505. 2002

GUGINSKI, G; LUIZ, A.P; SILVA, M.D; MASSARO, M; MARTINS, D.F; CHAVES, J; MATTOS, R.W; SILVEIRA, D; FERREIRA, V.M; CALIXTO, J.B; SANTOS, A.R. **Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice.** Pharmacol. Biochem. Behav. 93, 10–16, 2009.

GUTIERREZ, V; ZAMBELLI, V; PICOLO, G; CHACUR, M; SAMPAIO, S; BRIGATTE, P; CURY, Y. **Peripheral L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats.** Behav. Pharmacol., (1):14-24, 2012.

GUZIK, T.J; KORBUT, R; ADAMEK-GUZIK, T. **Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation and Immune Regulation.** J Physiol Pharmacol, 54(4):469-87, 2003.

HALICI, Z.; DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; HALICI, M. **Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema.** Eur J Pharmacol. 566:215-21, 2007.

HALLER, J.R. **Opium usage in nineteenth century therapeutics.** Bull N Y Acad Med, ;65:591-607, 1989.

HAMILTON, G.R; BASKETT, T.F. **In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief.** Can J Anaesth;47:367-374, 2000.

HANADA, T; YOSHIMURA, A. **Regulation of cytokine signaling and inflammation.** Cytokine and Growth Factor Review. v. 13, p. 4130421, 2002.

HAWES, B.E; GRAZIANO, M.P; LAMBERT, D.G. **Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms.** Peptides 21: 961–967, 2002.

HEBA, G; KRZEMINSKI, T; PORC, M. **Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats.** J Physiol Pharmacol; 52: 39-52, 2001.

HEINZMANN, S; MCMAHON, S.B. **New molecules for the treatment of pain.** Curr Opin Support Palliat Care 5: 111–115, 2011.

HERVERA, A; LEANEZ, S; NEGRETE, R; POL, O. **The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 380: 345–352, 2009.

HUA, F; RIBBING, J; REINISCH, W; CATALDI, F; MARTIN, S. **A pharmacokinetic com-parison of anrukinzumab, an anti-IL-13 monoclonal antibody, among healthy volunteers, asthma and ulcerative colitis patients.** Br J Clin Pharmacol 80:101–9, 2015.

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

I-CHENG, HO; SHI-CHUEN. **Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases.** Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology 941, 2016.

IKEDA, S.R. **Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits.** Nature 380: 255-258, 1996.

IKEDA, K; KOBAYASHI, T; KUMANISHI, T; YANO, R; SORA, I; NIKI, H. **Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys?** Neurosci Res 44: 121-131, 2002.

JAIN, K.D. **Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics.** Current Opinion in Investigational Drugs, v.5, n.1, p. 76-78, 2004.

JAMIE, R.S; CHRISTOPHER, B.W. **Regulation of IFN- γ during innate and adaptative immune responses.** Adv Immunol, 96:41-101, 2007.

JAVANMARDI, K, M; PARVIZ, S.S; SADR, M; KESHAVARZ, B; MINAI; DEHPOUR, A.R. **Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating morphine pain-inhibitory signals from the periaqueductal grey matter in rats.** Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32: 585–589, 2005.

JEANJEAN, A.P; MOUSSAOUI, S.M; MALOTEAUX, J.M. **Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P.** *Neuroscience*;68:151–157, 1995.

JENSEN, T.S & YAKSH, T.L. **Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique.** *Brain Res* 372: 301-312, 1986.

JEONG, S.-G; CHOI, I.-S; CHO, J.-H; JANG, I.-S. **Cholinergic modulation of primary afferent glutamatergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons.** *Neuropharmacology.*;75:295–303, 2013.

JOHNSON, C. **Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception.** *Animals*: 6, 71, 2016.

JONES, P.G; DUNLOP, J. **Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain.** *Neuropharmacology*, v.53, p. 197-206, 2007.

JONGKAMONWIWAT, N; PHANSUWAN-PUJITO, P; SARAPOKE, P; CHETSAWANG, B; CASALOTTI, S.O; FORGE, A; DODSON, H; GOVITRAPONG, P. **The presence of opioid receptors in rat inner ear.** *Hear Res*;181(1-2):85-93, 2003.

JUNTTILA, I.S. **Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes.** *Front. Immunol.* 9:888, 2018.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princípios de Neurociência.** Editora Manole, 2003.

KELLEY, N.E; TEPPER, D.E. **Rescue therapy for acute migraine, part 3: opioids, NSAIDs, steroids, and post-discharge medications.** *Headache.*;52(3):467-82, 2012.

KHALID S, TUBBS, R. **Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain.** Cureus 9(10): e1754, 2017.

KIEFFER, B.L; EVANS, C.J. **Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo.** Neuropharmacology, v. 56. Suppl 1, p. 205-212, 2009.

KIM, N; LUSTER, A.D. **Regulation of immune cells by eicosanoid receptors.** Scientific World Journal, 7:1307-1510, 2007.

KNOWLES, R.G; MONCADA, S. **Nitric oxide synthases in mammals.** Biochem J; 298:249-58, 1994.

KLEIN, M.A; MOLLER, J.C; JONES, L.L. **Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice.** Glia; 19:227–233, 1997.

KOCH, C. **Consciousness: confessions of a romantic reductionist.** Cambridge, Massachusetts: MIT press; 2012.

KOSTER, R; ANDERSON, M; DE BEER, E.J. **Acetic acid for analgesic screening.** Federation Proceedings. v. 18, p. 412, 1959.

LAWRENCE, T; GILROY, D.W. **Chronic inflammation: a failure of resolution?** Int. J. Exp. Path., v. 88: 85-94, 2007.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. **Animal models of nociception.** Pharmacological Reviews, v. 53, p. 628-651, 2001.

LEE, F; YOKOTA, T; OTSUKA, T; MEYERSON, P; VILLARET, D; COFFMAN, R; MOSMANN, T; RENNICK, D; ROEHM, N; SMITH, C; ZLOTNICK, A; ARAI, K. **Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor activities and T-cell and mast cell-stimulating activities.** Proc Natl Acad Sci USA ;83:2061, 1986.

- LEWIS, R; PALEVITZ, B. **Nobel honors pioneers of NO.** *The Scientist*; 12:1, 1998.
- LIN, E; CALVANO, S.E; LOWRY, S.F. **Inflammatory cytokines and cell response in surgery.** *Surgery*;127:117-126, 2000.
- LOESER, J.D; TREEDE, R.D. **The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology.** *Pain*. 137:473-477, 2008.
- LOPES, S.C; DA SILVA, A.V.I; ARRUDA, B.R; MORAIS, T.C; RIOS, J.B; TREVISAN, M.T.S; RAO, V.S; SANTOS, F.A. **Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110: 19-26. 2013.
- LOPEZ RODRIGUEZ, M.L; VISO, A; ORTEGA-GUTIERREZ, S. **VR1 receptor modulators as potential drugs for neuropathic pain.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 7, p. 729-748, 2003.
- LORDAN, R.; TSOUPRAS, A.; ZABETAKIS, I. **Phospholipids of animal and marine origin: Structure, function, and anti-inflammatory properties.** *Molecules*, 22, 1964, 2017.
- LORDAN, R.; TSOUPRAS, A.; ZABETAKIS, I. **The potential role of dietary platelet-activating factor inhibitors in cancer prevention and treatment.** *Adv. Nutr.* 10, 148–164, 2019.
- LORKE, D. **A new approach to practical acute toxicity testing.** *Arch Toxicol*; 54:275–87, 1983.
- LÖTSCH, J; GEISLINGER, G. **Pharmacogenetics of new analgesics.** *Brit J Pharmacol* 163: 447–460, 2011.
- LOVE, E.J.; MURRELL, J.; WHAY, H.R. **Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: A review.** *Vet. Anaesth. Analg.* 38, 3–14, 2011.

LOZANO-CUENCA, J.; CASTANEDA-HERNANDEZ, G.; GRANADOS-SOTO, V. **Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib.** Eur. J. Pharmacol. 513: 81–91, 2005.

MACHT, D.I. **The history of opium and some of its preparation and alkaloids.** JAMA; 64:477-461, 1915.

MANNION, R.J; COSTIGAN, M; DECOSTERD, I: **Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity.** Proc Natl Acad Sci. 96:9385–9390, 1999.

MAO, J; GOLD, M.S; BACKONJA, M.M. **Combination Drug Therapy for Chronic Pain: A Call for More Clinical Studies.** J Pain. Elsevier Ltd;12(2):157–66, 2011.

MARINHO B.G; MIRANDA L.S.M; GOMES N.M; MATHEUS M.E; LEITÃO S.G; VASCONCELLOS M.L.A.A; FERNANDES P.D. **Antinociceptive action of (±)-cis-(6-ethyl-tetrahydropyran-2-yl)-formic acid in mice.** European Journal of Pharmacology. 550: 47-53, 2006.

MARTIN, W.R. **Pharmacology of opioids.** Pharmacol Ver; 35:283-303, 1983.

MATTA, J.A; AHERN, G.P. **Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels.** J Physiol 585(Pt 2):469–482, 2007.

MATSUKAWA, A.; HOGABOAM, C.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLIN, P.M.; EVANOFF, H.L.; KUNKEL, S.L. **Pivotal role of the CC chemokine, macrophage derived chemokine, in the innate immune response.** Journal of Immunology, Boston, v.164, p.5362–5368, 2000.

MATSUMOTO, M; XIE, W; INOUE, M; UEDA, H. **Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents.** Mol Pain.;3:41, 2007.

MATSUNO, R; ARAMAKI, Y; ARIMA, H. **Contribution of CR3 to nitric oxide production from macrophages stimulated with high-dose of LPS.** Biochem Biophys Res Commun; 244: 115-119, 1998.

MÁZAK, K.; HOSZTAFI, S.; RÁCZ, Á.; NOSZÁL, B. **Structural and physicochemical profiling of morphine and related compounds of therapeutic interest.** Mini-reviews in Med. Chem., v.9, p. 984-995, 2009.

MBIANTCHA, M; WEMBE, A.N; DAWE, A; NANA, W,Y; ATEUFACK, G. **Antinociceptive activities of the methanolic extract of the stem bark of *Boswellia dalzielii* Hutch (Burseraceae) in rats are NO/cGMP/ATP-sensitive-K⁺ channel activation dependent.** Evidence-based complementary and alternative medicine, 5: 1-13. 2017.

McMAHON, S.B; BENNET, D.L.H; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon, S.B; Koltzenburg, M. **Wall and Melzack's textbook of pain.** Elsevier, p. 49-72, 2008.

MELLER, S.T; GEBHART, G.F. **Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord.** Pain: 52: 127-136, 1993.

MELLER, S.T; DYKSTRA, C; GRZYBYCKI, D; MURPHY, S; GEBHART, G.F. **The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat.** Neuropharmacology 33: 1471-8, 1994.

MELZACK, R.; WALL, P. D. **Pain mechanisms: a new theory.** Science, v. 150, n. 3699, p. 971-9, 1965.

MENDES, R.T. **Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios.** Rev. bras. reumatol, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.

MERRER,J.L.; JECKER, J.A.; BEFORT, K.; KIEFFER, B.L. **Reward processing by the opioid system in the brain.** Physiol Rev. Oct;89(4):1379-412, 2009.

MESNAGE, B; GAILLARD, S; GODIN, A.G; RODEAU, J.-L; HAMMER, M; VON ENGELHARDT, J; WISEMAN, P.W; DE KONINCK, Y; SCHLICHTER, R; CORDERO-ERAUSQUIN, M. **Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord.** J Comp Neurol.;519:3139–3158, 2011.

MESULAM, M. M; GUILLOZET, A; SHAW, P; LEVEY, A; DUYSSEN, E.G; LOCKRIDGE, O. **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.** Neuroscience, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MICLESCU, A; GORDH, T. **Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'.** Acta Anaesthesiol Scand. 53(9):1107-20, 2009.

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

MILLAN, M.J. **Descending control of pain.** Prog. Neurobiol. 66:355–474, 2002.

MILLER, R.J; JUNG, H; BHANGOO, S.K. **Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function.** Handb Exp Pharmacol.;(194):417-449, 2009.

MILLIGAN, E.D; SLOANE, E.M; LANGER, S.J. **Controlling neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10.** Mol Pain;1:9, 2005.

MINNEMAN, K.P; IVERSEN, I.L. **Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum.** Nature 262, 313–314, 1976.

MIÑO, J; ACEVEDO, C; MOSCATELLI, V; FERRARO, G; HNATYSZYN, O. **Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*.** Journal of Ethnopharmacology, v. 79, p. 179-182, 2002.

MIXCOATL-ZECUATL, T; AGUIRRE-BAÑUELOS, P; GRANADOS-SOTO, V. **Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test.** *Eur. J. Pharmacol.* 400, 81–87, 2000.

MIXCOATL-ZECUATL, T; FLORES-MURRIETA, F; GRANADOS-SOTO, V. **The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin.** *Eur J Pharmacol*; 531: 87-95, 2006.

MIWA, M.; STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. **Nitrosation of amines by stimulated macrophages.** *Carcinogenesis*, 8, 955, 1987.

MOHAPATRA, D.P; NAU, C. **Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway.** *J Biol Chem* 278(50):50080–50090, 2003.

MOHAPATRA, D.P; NAU, C. **Regulation of Ca²⁺ -dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase.** *J Biol Chem* 280 (14):13424–13432, 2005.

MORAN, T.D; ABDULLA, F.A; SMITH P,A. **Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ.** *Peptides* 21: 969–976, 2000.

MURPHREE, H.B. **Analgésicos Narcóticos: Analgésicos Sintéticos.** DiPalma JR, Drill-Farmacologia Médica, México, La Prensa Médica Mexicana; 291-299, 1969.

MOSQUINI,A.F; ZAPPA, V; MONTANHA, F. P. **Características farmacológicas dos antiinflamatórios não esteroidais – revisão de literatura.** *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, n. 17, Julho de 2011.

NAKAMURA, M.C; FERREIRA, S.H. **A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia.** *Eu J Pharmacol*, v. 135, p.145-153, 1987.

NAPIMOGA, C.J.T; PELLEGRINI-DA-SILVA, A; FERREIRA, V.H; NAPIMOGA, M.H; PARADA, C.A; TAMBELI, C.H. **Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia.** Eur. J. Pharmacol. 617: 41–47, 2009.

NASER, P.V; KUNERA, R. **Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain.** Neuroscience; 387: 135–148, 2018.

NATHAN C. **Points of control in inflammation.** Nature; 420: 846-852, 2002.

NELMS, K; KEEGAN, A.D; ZAMORANO, J; RYAN, J.J; PAUL, W.E. **The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions.** Annu Rev Immunol. 17:701–38. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.701, 1999.

NELSON, E.K. **The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. II.** J. Am. Chem. Soc. 42, 597–599, 1920.

NEMECZ, Á; PREVOST, M.S; MENNY, A; CORRINGER, P.-J. **Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels.** Neuron;90:452–470, 2016.

NEPALI, K; SHARMA, S; SHARMA, M; BEDI, P.M.S; DHAR, K.L. **Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids.** Eur J Med Chem, 77:422-87., 2014.

NESS, T.J., GEBHART, G.F. **Visceral pain: a review of experimental studies.** Pain 41:167–234, 1990.

NICHOLSON B. **Responsible prescribing of opioid for the management of chronic pain.** Drugs, 63: 13–32, 2003.

NGUELEFACK, T.B; DUTRA, R.C; PASZCUK, A.F; ANDRADE, E.L; TAPONDJOU, L.A; CALIXTO JB. **Antinociceptive activities of the methanol**

extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L.var *sativa* in mice is dependent of NO-cGMP-ATP- sensitive-K⁺ channel activation. J. Ethnopharmacol. 128:567-574, 2010.

NILIUS, B; OWSIANIK, G. **The transient receptor potential family of ion channels.** Genome Biol 12: 218, 2011.

NOCKEMANN, D; ROUAULT, M; LABUZ, D. **The K channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia.** EMBO Mol Med; 5(8):1263-77, 2013.

NOMA, Y; SIDERAS, T; NAITO, T; BERGSTEDT-LINDQVIST, S; AZUMA, C; SEVERINSON, E; TAKABE, T; KINASHI, K; MATSUDA, F; YAOITA, Y; HONJO, T. **Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter.** Nature; 319:640, 1986.

NOVAKOVA-TOUSOVA, K; VYKLIČKY, L; SUSANKOVA, K; BENEDIKT, J; SAMAD, A; TEISINGER J. **Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization.** Neuroscience 149(1):144–154, 2007.

NUMAZAKI, M; TOMINAGA, T; TOYOOKA, H; TOMINAGA, M. **Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues.** J Biol Chem 277(16):13375–13378, 2000.

OBERHOLZER, A; OBERHOLZER, C; BAHJAT, K.S; UNGARO, R; TANNAHILL, C.L; MURDAY, M; BAHJAT, F.R; ABOUHAMZE, Z; TSAI, V; LAFACE, D; HUTCHINS, B; MOLDAWER, L.L; CLARE-SALZLER, M.J. **Increased survival in sepsis by in vivo adeno-virus-induced expression of IL-10 in dendritic cells.** J. Immunol., v.168: 3412-3418, 2002.

OBREJA, O; SCHMELZ, M; POOLE, S; KRESS, M. **Interleukin-6 in combination with its soluble il-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo.** Pain 96: 57-62, 2002.

OKAMOTO, K; MARTIN, D.P; SCHMELZER, J.D; MITSUI, Y; LOW, P.A. **Pro and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain.** Exp Neurol 169: 386-91, 2001.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. **Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone.** Biol Pharm Bull 31(4): 588 – 591, 2008.

O'NEILL, L.A; PERCIVAL, M.D. **Mechanisms of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms.** Arch Biochem Biophys, 387:273-280, 2001.

OPREE, A.; KRESS, M. **Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin.** J Neurosci, v. 20, n. 16, p. 6289-93, 2000.

ORTIZ, M.I; MEDINA-TATO, D.A; SARMIENTO-HEREDIA, D; PALMA-MARTÍNEZ, J; GRANADOS-SOTO, V. **Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway by gabapentin on the formalin test.** Pharmacol Biochem Behav; 83:420-7, 2006.

O'SULLIVAN, S.T.; LEDERER, J.A.; HORGAN, A.F.; CHIN, D.H.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. **Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection.** Ann. Surg.; 222: 482–490, 1995.

PALMER, R.M.J; ASHTON, D.S; MONCADA, S. **Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine.** Nature; 333: 664-6, 1988.

PAPICH, M. G. **Principles of analgesic drug therapy.** Seminar Veterinary Medicine Surgery v.12, p. 80-93, 1997.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. **Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinese Turcz extracts and its major flavonoids, kaampferol and kaempferol-3-O-glucoside.** Yakugaku Zasshi, v.127, p.1275-1279, 2007.

PEGRAM, H. J., HAYNES, N. M., SMYTH, M. J., KERSHAW, M. H., DARCY, P. K. **Characterizing the anti-tumor function of adoptively transferred NK cells in vivo.** Cancer Immunol Immunother, v. 59, n. 8, 2010.

PEREIRA, R. J.; MUNECHIKA, M.; SAKATA, R. K. **Pain management after outpatient surgical procedure.** Revista Dor, v. 14, n. 1, p. 61-67, 2013.

PERL, E.R. **Ideas about pain, a historial view.** Nature reviews neuroscience 8:71-80, 2007.

PERL, E.R. **Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues.** Progress in neurobiology 94:20-28, 2011.

PICOLO, G; CASSOLA, A.C; CURY, Y. **Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom.** Eur. J. Pharmacol. 469, 57–64, 2003.

PIPER, A.S; YEATS, J.C; BEVAN, S; DOCHERTY, R.J. **A study of the voltage dependence of capsaicinactivated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization.** J Physiol 518(Pt 3):721–733, 1999.

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.** Br J Pharmacol, v. 142, p.331-338, 2004.

PRADO, M; REIS, R.A; PRADO, V.F; DE MELLO, M.C; GOMEZ, M.V; DE MELLO, F.G. **Regulation of Acetylcholine synthesis and storage.** *Neurochemistry International*, v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002.

PREMKUMAR, L.S; ABOOJ, M. **TRP channels and analgesia.** *Life Sciences in press*, 2012.

PRZEWŁOCKI, R; PRZEWŁOCKA, B. **Opioids in chronic pain.** *Eur J Pharmacol.*;429(1-3):79-91, 2001.

RAEBURN, C.D; SHEPPARD, F; BARSNESS, K.A. Cytokines for surgeons. *Am J Surg*;183:268-273, 2002.

RAINER, E.G.; CHIMEN, M.; HARRISON, M.J.; YATES, C.M.; HARRISON, P.; WATSON, S.P.; LORDKIPANIDZÉ, M.; NASH, G.B. **The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease.** *Platelets*, 26, 507–520, 2015.

RAMER, M.S; MURPHY, P.G; RICHARDSON, P.M. **Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice.** *Pain*;78:115–121, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. RANG & DALE. **Farmacologia.** Rio de Janeiro, Elsevier, 8^a ed. 808 p, 2012.

RIBEIRO-DA-SILVA, A; PIORO, E.P; CUELLO, A.C. **Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: An ultrastructural double-labeling study.** *J Neurosci* 11: 1068-1080, 1991.

RIKU, K; ALEKSI, L. H. K; MOILANEN, E. **Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation.** *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4, 471-479 471, 2005.

ROBINSON, D.S. **The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease.** Chem. Immunol., 78: 50–61, 2000.

ROBBINS & COTRAN. **Patologia: Bases patológicas das doenças.** 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 1458 p, 2010.

ROCHA APC, KRAYCHETE DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK — **Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization.** Rev Bras Anesthesiol Review article 57: 1: 94-105, 2007.

ROSAS-BALLINA, M; OLOFSSON, P.S; OCHANI, M; VALDES-FERRER, S.I; LEVINE, Y.A; REARDON, C; TUSCHE, M.W; PAVLOV, V.A, ANDERSSON, U; CHAVAN, S; MAK, T.W; TRACEY, K.J. **Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit.** Science 334: 98-101. 2011.

SAHLEY, T. L, BERNTSON, G. G. **Antinociceptive effects of central and systemic administration of nicotine in the rat.** Psychopharmacology. 65: 279-283. 1979.

SAKURADA, T., WAKO, K., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TAN-NO, K., KISARA, K., **Involvement of spinal NMDA receptors in capsaicin-induced nociception.** Pharmacol. Biochem. Behav. 59, 339–345. 1998.

SANDOVAL, A. C. **O uso indiscriminado dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES).** Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, v.8, n. 2, 2017.

SANTOS, G.C.M. FERNANDES, R.D; BARROS, T.R. ABREU, H.S. SUZART L.R., DE CARVALHO, M.G. BRAZ FILHO, R. MARINHO B.G.. **Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract from the Stem Bark of Lophanthera lactescens.** Planta Medica, 81: 1688–1696. 2015.

SAWYNOK, J. **Topical and peripherally acting analgesics.** Pharmacol Ver., 55, 1-20, 2003.

SCHMIDTKO, A; RUTH, P; GEISSLINGER, G; TEGEDER, I. **Inhibition of cyclic guanosine 5'- monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation.** Nitric Oxide; 8: 89–94, 2003.

SCHMITT, N; UENO, H. **Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines.** Curr Opin Immunol.;34:130–6, 2015.

SCHOLER, D. W; KU, E. C; BOETTCHER, I; SCHWEIZER, A. **Pharmacology of diclofenac sodium.** The American Journal of Medicine, 80(4), 34–38, 1986.

SCHOLZ, J; WOOLF, C.J. **Can we conquer pain?** Nature Neurosci v.5: 1062–1067, 2002.

SCHULZ, R; EISINGER, D.A; WEHMEYER, A. **Opioid control of MAP Kinase cascade.** Eur J Pharmacol 500: 487-497, 2004.

SCHUMACHER, M.A; BASBAUM, A.I; NAIDU, R.K. **Opioid agonists and antagonists.** In: Katzung BG, Trevor AJ, eds. Basic and clinical pharmacology. 13th ed. New York: McGraw-Hill Medical :531-51, 2015.

SEVERINO, A.L; SHADFAR, A; HAKIMIAN, J.K; CRANE, O; SINGH, G; HEINZERLING, K; WALWYN, W.M. **Pain Therapy Guided by Purpose and Perspective in Light of the Opioid Epidemic.** Front. Psychiatry 9:119, 2018.

SHARMA, S.K.; VIJ, A.S.; SHARMA, M. **Mechanisms and clinical uses of capsaicin.** Eur. J. Pharmacol. 720, 55–62, 2013.

SHEJAWAL, N.; MENON, S.; SHAILAJAN, S. **A simple, sensitive and accurate method for rat paw volume measurement and its expediency in preclinical animal studies.** Hum Exp Toxicol. 33(2):123-9, 2014.

SHELUKHINA, I; PADDENBERG, R; KUMMER, W; TSETLIN, V. **Functional expression and axonal transport of $\alpha 7$ nAChRs by peptidergic nociceptors of rat dorsal root ganglion.** Brain Struct Funct.;220:1885–1899, 2015.

SHERWOOD, E.R; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammatory response.** Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol., v.18, 385-405, 2004.

SHI, G; LIU, Y; LIN, H; YANG, S; FENG, Y; REID, P.F; QIN, Z. **Involvement of cholinergic system in supression of formalin-induced inflammatory pain by cobra toxin.** Acta Pharmacologica Sinica, v. 32, p. 1233-1238, 2011.

SHUKLA, P.K; TANG, L; WANG, Z.J. **Phosphorylation of neurogranin, protein kinase C, and Ca⁺⁺/calmodulin dependent protein kinase II in opioid tolerance and dependence.** Neurosci Lett 404: 266-269, 2006.

SIKANDAR, S; H DICKENSON, A. **Visceral Pain – the Ins and Outs, the Ups and Downs.** Curr Opin Support Palliat Care, v. 6, n. 1, p. 17–26. 2012.

SILVA, P. **Farmacologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SKELDON, A; SALEH, M. **The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections.** Frontiers in Microbiology, v. 2, p.15, 2011.

SLOMIANY, B.L; SLOMIANY, A. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase during oral mucosal ulcer healing.** J Physiol Pharmacol; 53: 159-169, 2002.

SMITH, W.L; LAGENBACH, R. **Why there are two cyclooxygenase isoenzymes.** J Clin Invest, 107:1491-1495, 2001.

SOMMER, C; WHITE, F. **Cytokines, Chemokines, and Pain.** Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press,;279-302, 2010.

SPINOSA, H. S; GÓRNIAK, S.L; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.** 6 ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

STACK, E; DUBOIS, R.N. **Regulation of cyclo-oxygenase-2**. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., v. 15, p. 787-800, 2001.

STEFANO, G.B; SCHARRER, B; SMITH, E.M; HUGHES, T.K.J; MAGAZINE, H.I; BILFINGER, T.V; HARTMAN, A. R; FRICCHIONE, G.I; LIU, Y; MAKMAN, M.H. **Opioid and opiate immunoregulatory processes**. Crit. Rev. Immunol. 37 (2-6): 213-248. 2017.

STEIN C. **Opioid Receptors**. Annu Rev Med;67:433-51, 2016.

STEPHEN, D. R. **TRPs in Taste and Chemesthesis**. Handb Exp Pharmacol.; 23: 827–871, 2014.

STERIN, G.M; GALLEGGO, F.C. **Fundamentos da fisioterapia na terapêutica da dor**. In: OTERO, P. E. Avaliação e tratamento em pequenos animais. São Paulo: Interbook. p. 212-225, 2005.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. **Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia Coli Lipopolysaccharide**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7738.; 1985.

TAK, P.P; FIRESTEIN, G.S. **NF-kappaB: A Key Role in Inflammatory Diseases**. J Clin Invest;107(1):7-11, 2001.

TAKAYAMA, Y.; UTA, D.; FURUE, H.; TOMINAGA, M. **Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons**. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 5213–5218, 2015.

TIWARI, P; DWIVEDI, S; ANISH, C. **Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review**. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 3, n. 5, p. 413–420, 1, 2013.

TJOLSEN, A; BERGE, O.G; HUNSKAAR,S; ROSLAND, J.H; HOLE, K. **The formalin test: an evaluation of the method.** *Pain*, v.51, p. 5-17, 1992.

TODA, N.; KISHIOKA, S.; HATANO, Y.; TODA, H. **Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling.** *Anesthesiology* 110: 166–181. 2009.

TRANQUILLI, W. J; THURMON, J. C. **Anestesiologia e analgesia veterinária.** 4. ed. Roca, 2013.

TSOUPRAS, A.; LORDAN, R.; ZABETAKIS, I. **Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease.** *Nutrients*, 10, 604, 2018.

VAY, L; GU, C; MCNAUGHTON, P.A. **The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications.** *Brit J Pharmacol* 165: 787–801, 2012.

VELLANI, V; KINSEY, A.M; PRANDINI, M; HECHTFISCHER, S.C; REEH, P; MAGHERINI, P.C. **Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones.** *Mol Pain* 6:61, 2010.

VENTURA-MARTINEZ, R; DECIGA-CAMPOS, M; DIAZ-REVAL, M.I; GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. **Peripheral involvement of the nitric oxide–cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat.** *Eur J Pharmacol*; 503: 43–48, 2004.

VERRI, W.A; CUNHA, T.M; PARADA, C.A; POOLE, S; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?** *Pharmacol Ther.* :116-38, 2006.

VYKLICKY, L; VLACHOVA, V; VITASKOVA, Z; DITTERT, I; KABAT M; ORKAND R,K. **Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat.** *J Physiol* 517(Pt 1):181–192, 1999.

VIGIL, S.V.G; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDETS. **Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch.** *Transpl Immunol*; 19:25-29, 2008.

WALDHOER, M; BARTLETT, S.E; WHISTLER, J.L. **Opioid receptors.** *Annu Ver Biochem*; 73:953-90, 2004.

WALKER, K.M; URBAN, L; MEDHURST, S.J; PATEL, S; PANESAR, M; FOX, A.J; MCINTYRE, P. **The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 56-62, 2003.

WALPOLE, C.S; BEVAN, S; BOVERMANN, G; BOELSTERLI, J.J; BRECKENRIDGE, R; DAVIES, J.W; HUGHES, G.A; JAMES, I; OBERER, L; WINTER, J. **The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin.** *J Med Chem.* 24;37(13):1942-54, 1994.

WESS, J; EGLIN, R.M; GAUTAM, D. **Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development.** *Nat Rev Drug Discov.*;6:721–733, 2007.

WHITE, F.A; MILLER, R.J. **Insights into the regulation of chemokine receptors by molecular signaling pathways: functional roles in neuropathic pain.** *Brain Behav Immun* 24: 859–865, 2010.

WIESELER-FRANK, J; MAIER, S.F, WATKINS, L.R. **Glial activation and pathological pain.** *Neurochem Int*; v.45:389–395, 2004.

WOLF, G; LIVSHITS, D; BEILIN, B. **Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice.** *Brain Behav Immun*;22:1072-1077, 2008.

WOLK, K; DÖCKE, W.D; VON BAEHR, V; VOLK, H.D; SABAT, R. **Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance.** Blood, 96: 218–223, 2000.

WOODWORTH, R.S; SHERRINGTON, C.S. **A pseudoaffective reflex and its spinal path.** The Journal of physiology. 31:234–243, 1904.

WOOLF, C.J; THOMPSON, S.W: **The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states.** Pain. 44:293–299, 1991.

WOOLF, C.J: **Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord.** Pain. 67:97–106, 1996.

WOOLF, C.J; ALLCHORNE, A; SAFIEH-GARABEDIAN, B; POOLE, S: **Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumour necrosis factor alpha.** Br J Pharmacol 121: 417-24, 1997.

WOOLF C.J, SALTER M.W. **Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.** Science.288:1765–1769, 2000.

WOOLF, C.J. **What is this thing called pain?** J Clin Invest 120:3742–3744, 2010.

YAKSH, T.L; JESSELL, T.M; GAMSE, R. **Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo.** Nature.; 286:155-157, 1980.

YANG, J; ZHAO, Y; PAN, Y; LU, G; LU, L; WANG, D; WANG, J. **Acetylcholine participates in pain modulation by influencing endogenous opiate peptides in rat spinal cord.** World J Neurosci.;02:15, 2012.

XIE Q, NATHAN C. **The high-output nitric oxide pathway: Role and regulation.** J Leukocyte Biol; 56: 576-582, 1994.

XU, Z.; CHEN, S.R.; EISENACH, J.; PAN, H.L. **Role of spinal muscarinic and nicotinic receptors in clonidine-induced nitric oxide release in a rat model of neuropathic pain.** Brain Res. 861: 390–398. 2000.

YOST, C.C.; WEYRICH, A.S.; ZIMMERMAN, G.A. **The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses.** Biochimie, 92, 692–697, 2010.

ZHANG, J.M, AN, J. **Cytokines, inflammation, and pain.** Int Anesthesiol Clin, 45:27, 37, 2007.

ZHU, Z. Z.; MA, K. J.; RAN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; ZHANG, Q. Y.; QIN, L. P. **Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*.** Journal of Ethnopharmacology. v. 133, n. 3, p. 1126 – 1131, 2011.