



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE DOIS
NOVOS N-MORFOLINA-3-HIDROXI-2-OXINDOL,
ANÁLOGOS DA CONVOLUTAMIDINA A**

LARISSA JARDIM RAMALHO PAPA RAYMUNDO

RIO DE JANEIRO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E
QUÍMICA MEDICINAL

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE
DOIS NOVOS N-MORFOLINA-3-
HIDROXI-2-OXINDOL, ANÁLOGOS DA
CONVOLUTAMIDINA A

LARISSA JARDIM RAMALHO PAPA RAYMUNDO



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal)

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Potencial anti-inflamatório de dois novos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol, análogos da Convolutamidina A

Larissa Jardim Ramalho Papa Raymundo

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

Prof. Dra. Lígia Maria Torres Peçanha

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas

Prof. Dra. Patricia Franca Gardino

Profa. Dra. Tereza Sollero Claudio-da-Silva (Revisora)

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

RIO DE JANEIRO
Março de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Raymundo, Larissa Jardim Ramalho Papa

Potencial anti-inflamatório de dois novos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol, análogos da Convolutamidina A/ Larissa Jardim Ramalho Papa Raymundo. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015. xv, 77 f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f 72

1. Convolutamidina A. 2. Atividade anti-inflamatória. 3. Inflamação. 4. Migração celular. I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

“Se vi mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria e Willian pelo amor incondicional dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por serem minha base, meu incentivo e nunca me desepararem independente das circunstâncias.

A minha avó Olga pelos anos dedicados a minha educação e crescimento e a avó Marina pelo carinho, apoio e orações diárias.

A minha tia-mãe Rogéria que não só me ofereceu um lar, mas também amor, bondade e estímulo.

A minha tia Ana Néri pelos ensinamentos, trocas e por ser meu exemplo de força.

A todos os membros da minha família, que mesmo distantes sempre torceram por mim e enviaram mensagens de carinho e motivação.

As minhas amigas de mais de duas décadas, Ana Luíza, Emanuelle, Lorraine, Maiara e Raíça por estarem sempre presentes e dispostas a me ouvir e aconselhar.

Ao meu namorado Davi pelo apoio, paciência e palavras de conforto, principalmente nas etapas finais de elaboração dessa dissertação.

A professora Patrícia Dias Fernandes pela confiança, direcionamento e incentivo durante a minha jornada acadêmica e também por tornar possível a realização desse trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação que estiveram presentes nesses dois anos proporcionando um ótimo ambiente de trabalho e fazendo com que a rotina se tornasse mais leve.

Aos professores Lígia Peçanha, Luis Eduardo Quintas e Patricia Gardino pela participação na banca examinadora.

A professora Tereza Sollero pela atenção e contribuição durante a revisão desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal por partilharem seus conhecimentos e assim contribuírem para a minha formação.

A todos os funcionários da Farmacologia.

Ao Instituto Vital Brasil pela doação dos animais utilizados neste trabalho.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

Potencial anti-inflamatório de dois novos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol, análogos da Convolutamidina A

Larissa Jardim Ramalho Papa Raymundo

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

A Convolutamidina A, um alcaloide oxindólico, e seus análogos tem apresentado inúmeras ações biológicas, incluindo ação anticonvulsivante, neuroprotetora, antinociceptiva, anti-inflamatória, dentre outras. Devido a essas promissoras atividades farmacológicas, dois novos análogos da Convolutamidina A (CM02 e CM03) foram sintetizados e suas atividades biológicas avaliadas utilizando modelos de inflamação *in vivo*, como a lambadura de pata induzida pela formalina, hiperalgesia térmica induzida pela carragenina e bolsa de ar subcutânea (BAS). No método da BAS foram feitas dosagens de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio (ROS).

No modelo da formalina, ambos os análogos inibiram significativamente o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada com formalina tanto na primeira quanto na segunda fase, nas três doses testadas (0,1, 1 e 10 mg/kg). No modelo da hiperalgesia térmica, os dois análogos foram capazes de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente em um período de 6 horas e até 24 horas após o tratamento por via oral. No método da bolsa de ar subcutânea induzido por carragenina foi possível observar que o pré-tratamento com os análogos foi capaz de reduzir de maneira significativa a migração de leucócitos para a cavidade gerada no dorso dos animais. Para CM02 essa redução é percebida a partir da dose de 0,1 mg/kg e para CM03 a partir de 1 mg/kg. Com relação aos mediadores inflamatórios, CM02 foi capaz de reduzir a geração de NO e o extravasamento proteico, enquanto que CM03 além de promover a redução desses dois parâmetros avaliados, também promoveu a redução das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Com relação à geração de espécies reativas de oxigênio, CM02 não promoveu alteração na sua produção, e CM03 promoveu aumento da sua geração. Nossos dados indicam que os compostos testados possuem uma atividade anti-inflamatória e antinociceptiva uma vez que reduziram o tempo de lambadura no modelo da lambadura de pata induzida pela formalina e a hiperalgesia ao estímulo térmico induzida pela carragenina, além de promover a redução de diversos parâmetros avaliados no modelo da BAS.

Palavras-chave: 1. Convolutamidina A 2. Atividade anti-inflamatória 3. Inflamação 4. Migração celular

Rio de Janeiro
Março de 2015

ABSTRACT

Convolutamydine A, an oxindole alkaloid, and its analogues have presented several biological activities, including anticonvulsant, neuroprotective, antinociceptive, anti-inflammatory, among others. Because of these promising pharmacological activities, two new analogues of Convolutamydine A (CM02 and CM03) were synthesized and their biological activity assessed using *in vivo* models of inflammation such as, formalin-induced licking behavior test, carrageenan-induced thermal hyperalgesia and subcutaneous air pouch (SAP). In SAP model quantification of inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS) were made.

In the formalin model, both analogues significantly inhibited the time the animal spent licking the formalin injected paw in the first and the second phase at the three doses tested (0,1, 1 and 10 mg/kg). In the thermal hyperalgesia model, the two analogues were able to increase the latency of the animals on the hot plate for a period of 6 hours and 24 hours after oral treatment. In the subcutaneous air pouch model, induced by carrageenan, was observed that pre-treatment with the analogues were able to reduce significantly the migration of leukocytes into the cavity created in the backs of the animals. For CM02 this reduction started with the dose of 0,1 mg/kg and for CM03 with 1 mg/kg. About the inflammatory mediators, CM02 was able to reduce the generation of NO and protein extravasation, while CM03 besides promoting the reduction of these two parameters evaluated also promoted the reduction of inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . Regarding the generation of reactive oxygen species, CM02 showed no difference in their production, and CM03 promoted increased of its generation. Our data indicate that the compounds analyzed possess anti-inflammatory and antinociceptive activity since it reduced the licking response on formalin-induced licking behavior test and thermal hyperalgesia and in addition it also promotes the reduction of various parameters on SAP model.

Keywords: 1. Convolutamydine A 2. Anti-inflammatory activity 3. Inflammation 4. Cell migration

**Rio de Janeiro
Março de 2015**

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xiii
Lista de Esquemas	xiii
Lista de Gráficos	xiii
Lista de Abreviaturas	xv

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Convolutamidina A	2
1.2. O processo inflamatório	3
1.2.1. Eventos vasculares	5
1.2.2. Migração leucocitária	6
1.2.3. Dor inflamatória	8
1.2.4 Medidores inflamatórios	9
1.2.4.1. Mediadores lipídicos	9
1.2.4.2. Aminas vasoativas	13
1.2.4.3. Citocinas	14
1.2.4.4. Óxido nítrico	15
1.2.4.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS)	17
1.2.5. Resolução do processo inflamatório	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Preparo dos análogos <i>N</i> -morfolina-3-hidroxi-2-oxindol	22
3.2. Reagentes	23
3.3. Preparo das soluções utilizadas	24
3.4. Análogos e fármacos controle	26
3.5. Animais	26
3.6 Análise Estatística	27
3.7 Modelo da lambadura de pata induzida pela formalina	27
3.8 Modelo da hiperalgesia térmica induzida por carragenina	28
3.9 Modelo da bolsa de ar subcutânea	29

3.10 Toxicidade	31
3.11 Dosagem de proteínas	31
3.12 Dosagem de óxido nítrico (NO)	31
3.13 Dosagem de citocinas inflamatórias	32
3.14 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Efeito dos análogos da Convolutamidina A no modelo da lambadura de pata induzida pela formalina	35
4.2. Efeito dos análogos da Convolutamidina A no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina	38
4.3. Atividade dos análogos da Convolutamidina A no modelo da Bolsa de Ar Subcutânea	40
4.3.1. Contagem total de células	41
4.3.2. Quantificação de proteínas totais	47
4.3.3. Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	50
4.3.4. Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-1 β)	53
4.3.5. Dosagem de espécies reativas de oxigênio	57
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Convolutamidina A (a); Foto do briozoário <i>Amatia convoluta</i> (b)	3
Figura 2: Sinais cardinais da inflamação	4
Figura 3: Etapas da migração leucocitária	7
Figura 4: Dor inflamatória	9
Figura 5: Metabolismo dos prostanoídes	10
Figura 6: Metabolismo dos leucotrienos	12
Figura 7: Rota sintética do óxido nítrico	15
Figura 8: Análogos <i>N</i> -morfolina-3-hidroxi-2-oxindol	22
Figura 9: Rota sintética dos derivados <i>N</i> -morfolina-3-hidroxi-2-oxindol	23

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Protocolo do Modelo da lambadura de pata induzida por formalina	28
Esquema 2: Protocolo do modelo da hiperalgesia térmica	29
Esquema 3: Protocolo do modelo experimental da bolsa de ar subcutânea (BAS)	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do análogo CM02 no modelo da formalina	36
Gráfico 2: Efeito do análogo CM03 no modelo da formalina	37
Gráfico 3: Efeito do análogo CM02 no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina	39
Gráfico 4: Efeito do análogo CM03 no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina.....	40
Gráfico 5: Efeito do análogo CM02 na migração de células induzida por carragenina na BAS	42

Gráfico 6: Efeito do análogo CM03 na migração de células induzida por carragenina na BAS	43
Gráfico 7: Contagem total de leucócitos do sangue e medula no tratamento com CM02	44
Gráfico 8: Contagem total de leucócitos do sangue e medula no tratamento com CM03	45
Gráfico 9: Efeito do análogo CM02 na migração de células induzida por carragenina na BAS quando administrado pelas vias oral, intraperitoneal e local	46
Gráfico 10: Efeito do análogo CM03 na migração de células induzida por carragenina na BAS quando administrado pelas vias oral, intraperitoneal e local	47
Gráfico 11: Efeito de CM02 e CM03 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por carragenina na BAS	49
Gráfico 12: Efeito de CM02 na produção de NO induzido por carragenina na BAS ..	51
Gráfico 13: Efeito de CM03 na produção de NO induzido por carragenina na BAS ..	52
Gráfico 14: Efeito de CM02 e CM03 na produção de TNF- α induzido por carragenina na BAS	54
Gráfico 15: Efeito de CM02 e CM03 na produção de IL-1 β induzido por carragenina na BAS	56
Gráfico 16: Efeito de CM02 na produção de espécies reativas de oxigênio	57
Gráfico 17: Efeito de CM03 na produção de espécies reativas de oxigênio	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicinconínico
BK	Bradicinina
BAS	Bolsa de ar subcutânea
Conv. A	Convolutamidina A
COXs	Ciclo-oxigenases
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
cyPGs	Prostaglandinas ciclopentanonas
CM02	5-cloro- <i>N</i> -morfolina-3-hidroxi-2-oxindol
CM03	5-bromo- <i>N</i> -morfolina-3-hidroxi-2-oxindol
D.P.	Desvio padrão
DCF-DA	Diclorodihidrofluoesceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EET	Ácidos epoxieicosatrienoicos
ELISA	Ensaio imunoenzimático
i.p.	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IV	Infravermelho
IVB	Instituto Vital Brasil
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
LOXs	Lipoxigenases
LTs	Leucotrienos
LTB₄	Leucotrieno B ₄

LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
LTE₄	Leucotrieno E ₄
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NK	Células “natural killer”
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzida
NOX	NADPH oxidase
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Tampão fosfato salina
PGs	Prostaglandinas
PGI₂	Prostaciclina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMA	Forbol miristato acetato
q.s.p	Quantidade suficiente para
r.p.m.	rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TXA₂	Tromboxano A ₂
UI	Unidade Internacional
v.o.	Via oral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Convolutamidina A

A Convolutamidina A (Figura 1a) é um alcaloide oxindólico que possui o esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxi-2-oxindol e foi isolado pela primeira vez de um briozoário marinho chamado *Amathia convoluta*, originário da Flórida (Figura 1b). Como o isolamento gerava pequenas quantidades do composto e suas atividades biológicas eram promissoras, foi proposta uma rota de síntese para a obtenção de uma mistura racêmica de convolutamidina A pelo grupo do professor Angelo da Cunha Pinto, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química da UFRJ (Garden e cols., 1997).

Existem na literatura trabalhos que elucidam algumas atividades da convolutamidina A como sendo um composto que promove alteração em células de leucemia pró-mielocítica HL-60 (Kamano e cols., 1995) e alguns análogos que possuem ações como potente secretagogo do hormônio do crescimento (Tokunaga e cols., 2001), atividade anticonvulsivante (Popp e cols., 1980) e neuroproteção por ativação dos canais de potássio ativados por cálcio (Hewawasam e cols., 2002). Recentemente nosso grupo demonstrou atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da Convolutamidina A e de dois novos análogos (Figueiredo e cols., 2013; Fernandes e cols., 2014).

Devido à facilidade de obtenção de análogos e às promissoras atividades dessa classe química, nosso grupo, em parceria com o grupo liderado pela profa. Barbara Vasconcellos, do Instituto de Química da UFRJ, tem buscado verificar o potencial farmacológico de novos análogos da Convolutamidina A.

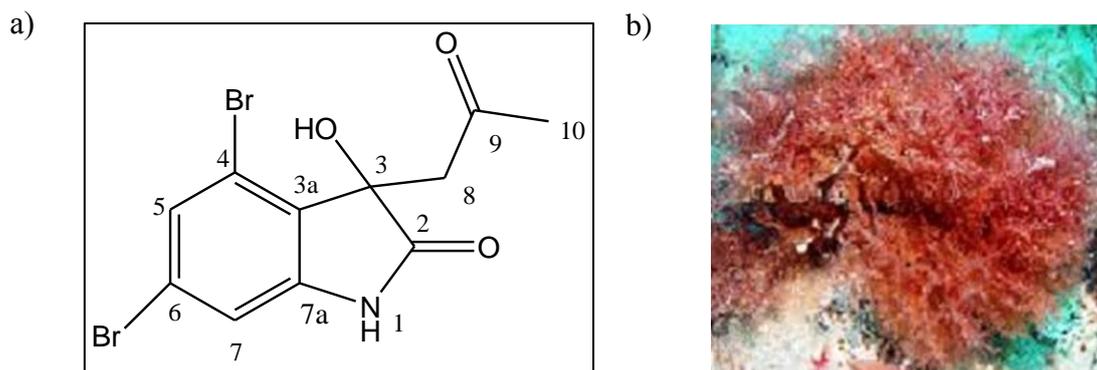


Figura 1: Estrutura da Convolutamida A (a); fotografia do briozoário *Amatia convoluta* (b)

(Adaptado de Kamano e cols., 1995).

1.2 O processo inflamatório

A inflamação é parte de um processo fisiológico para reparo de danos ocasionados por estímulos prejudiciais. Esse evento fisiológico tem como objetivo restaurar a estrutura e função do tecido e também remover o agente causador da injúria (Lawrence e cols., 2002; Aller e cols., 2006; Fernandes e cols., 2014).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas categorias – agudo e crônico - dependendo de suas características patológicas e duração. A inflamação aguda possui curta duração, de horas até dias e se caracteriza por vasodilatação, extravasamento de fluidos para o meio extravascular e migração de células, principalmente neutrófilos, para o local da injúria. Em alguns casos pode ocorrer ativação da cascata de coagulação. A inflamação crônica, por sua vez, pode durar semanas, meses ou até mesmo anos, e se caracteriza pela infiltração de células mononucleares e fibrose no tecido afetado. Nessa fase está ocorrendo simultaneamente um processo de inflamação ativa com destruição do tecido afetado e tentativas de reparo (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

As características macroscópicas da fase inicial do processo inflamatório foram descritas, no início do primeiro século, por Cornelius Celsius, como os sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, edema ou tumor e dor. Posteriormente foi adicionada a perda de

função, que pode ocorrer com o prolongamento desse processo (Figura 2) (Medzhitov, 2010; Alessandri e cols., 2013).

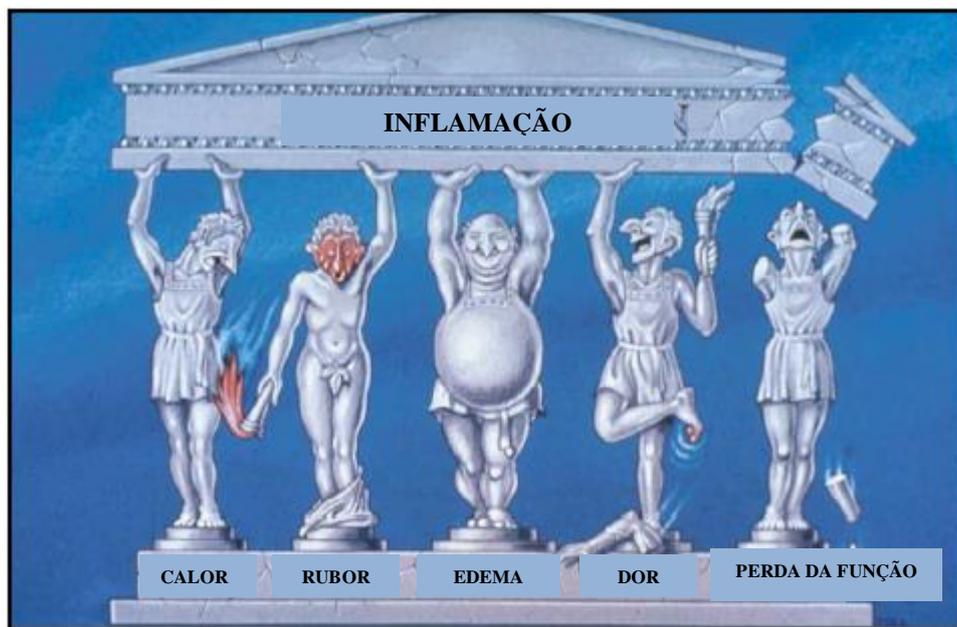


Figura 2: Sinais cardinais da inflamação (Adaptado de Lawrence e cols., 2002).

Além dos sinais cardinais da inflamação foi estabelecida a base celular dessa patologia, que conta com a participação da imunidade inata e adaptativa. Essas duas respostas são os componentes principais do sistema de defesa do organismo. A imunidade inata age como a primeira linha de defesa contra os estímulos nóxicos, providenciando os efetores necessários em forma de fagócitos e granulócitos para lidar com os estímulos danosos iniciais. E a partir daí, essa resposta dispõe dos sinais necessários para instruir o sistema de imunidade adaptativa a montar sua resposta (Lawrence e cols., 2002). A resposta adaptativa é geralmente mais rápida e de magnitude maior em uma exposição subsequente ao agente nocivo. Sua ativação é ocasionada através da apresentação de antígenos aos linfócitos T, que quando ativados produzem citocinas e ampliam os sistemas de imunidade inata e adaptativa (Cone, 2001; Lawrence, 2002; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

1.2.1 Eventos vasculares

Na reação inflamatória, logo após a injúria ao tecido, ocorre uma vasoconstrição inicial transitória que é rapidamente substituída pela vasodilatação. Essa vasodilatação é uma característica clássica da inflamação aguda, clinicamente caracterizada pela vermelhidão e calor local e tem como objetivo facilitar a chegada de mediadores solúveis e células inflamatórias ao local da injúria (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Alessandri e cols., 2013).

A transição da vasoconstrição para a vasodilatação é mediada por diversos mediadores, como por exemplo, produtos endoteliais e mediadores derivados de mastócitos como os leucotrienos, prostaglandinas e, em particular, a histamina. Contudo, a vasodilatação ocorre principalmente pela ação do óxido nítrico (NO) e das prostaglandinas (PGs).

O NO é sintetizado, a partir da L-arginina, através da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que é encontrada no endotélio (NOSe), nos neurônios (NOSn) e em leucócitos ativados (NOSi). Depois de produzido ele é capaz de promover relaxamento da musculatura lisa e consequente vasodilatação. As PGs com ação vasodilatadora são a PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}, que são sintetizadas a partir do ácido araquidônico pela ação das ciclo-oxigenases (COXs) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Simultaneamente à vasodilatação ocorre formação do edema, outro sinal inicial do processo inflamatório. O edema é causado pelo fluxo de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do complemento, substância P e o fator de ativação plaquetária (PAF). Esses mediadores alteram as funções de barreira dos vasos sanguíneos, causando contração das células endoteliais e permitindo a formação de lacunas entre elas aumentando a permeabilidade de capilares e vênulas. (Monaco e cols., 2003; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A vasodilatação e exsudação de fluido do sangue para o tecido são acompanhadas pela migração de leucócitos da circulação para a área afetada (Alessandri e cols., 2013).

1.2.2 Migração leucocitária

Os leucócitos são recrutados para o local da inflamação em uma série de etapas de adesão que permitem a sua ligação com a parede dos vasos sanguíneos, locomoção através das bordas das células endoteliais, travessia pelo endotélio e chegada ao tecido. Esse fenômeno de transmigração é dividido em etapas distintas, são elas: marginação, rolamento, adesão e diapedese (Muller, 2011).

A marginação é o processo de movimento dos leucócitos do centro do fluxo sanguíneo para a periferia do vaso. Esse processo é facilitado pelo extravasamento de fluidos e interações físicas entre os leucócitos e eritrócitos. Depois do processo de marginação ocorre o estabelecimento de interações fracas e transientes entre os leucócitos e as células endoteliais da parede de vênulas pós-capilares que estão em proximidade do tecido inflamado. Essa interação facilita a estimulação dos leucócitos por substâncias quimioatratórias apresentadas pelas células endoteliais, propagando assim o rolamento, a firme adesão e a migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos. Essa série de eventos é mediada principalmente por duas famílias de moléculas de adesão, as selectinas expressas pelas células endoteliais e leucócitos e as integrinas expressas somente pelos leucócitos (Figura 3) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Nourshargh e cols., 2014).

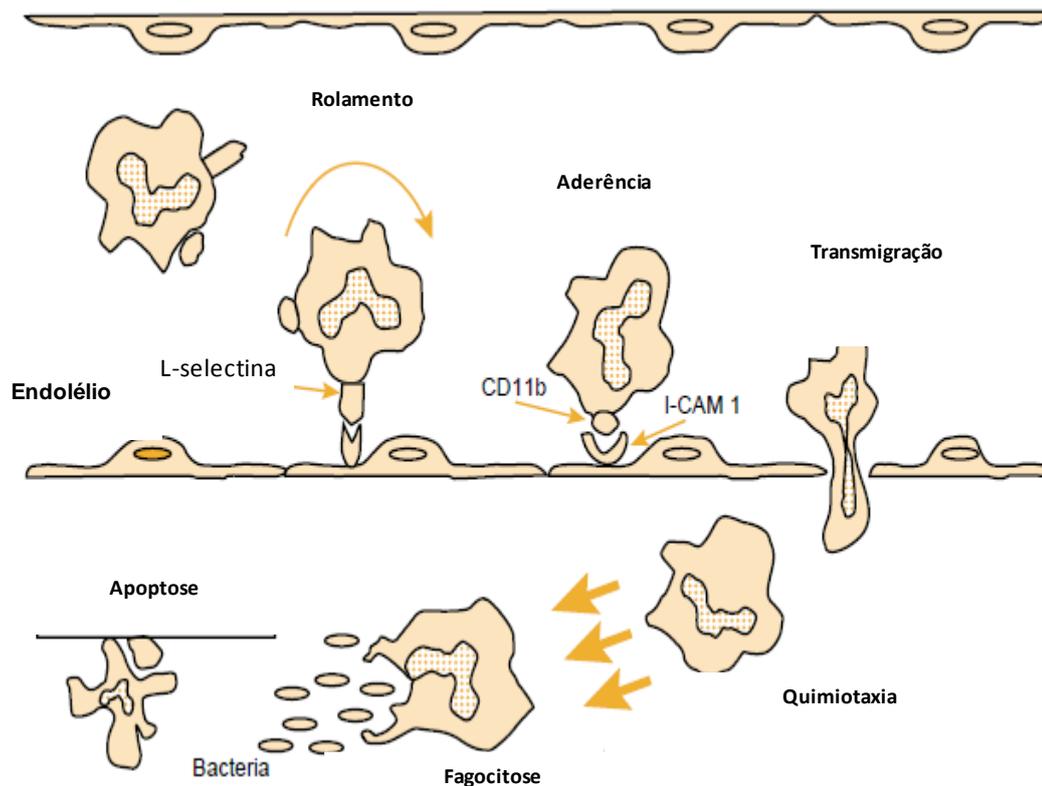


Figura 3: Etapas da migração leucocitária (Adaptado de Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Na resposta inflamatória as reações celulares são vistas dentro de horas, com os neutrófilos sendo as primeiras células a serem atraídas para o local da injúria (Shin e cols., 2009).

Neutrófilos maduros são células polimorfonucleares que contém em seu citoplasma grânulos repletos de substâncias prontas para serem utilizadas. Na presença de um estímulo nocivo, essas células fagocitam o seu alvo, digerem e eliminam através da liberação de enzimas proteolíticas e proteínas antibacterianas presentes nos seus grânulos, junto com a liberação maciça de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gougerot-Pocidaló, 2012).

A primeira onda de migração de neutrófilos é seguida pela migração de células mononucleares, principalmente monócitos, células que chegam algumas horas após o

estímulo inflamatório inicial. No tecido os monócitos podem se diferenciar em macrófagos e/ou migrar para o sítio da inflamação e ainda migrar para os tecidos e se encaminhar para os vasos linfáticos e dali retornar para a circulação sanguínea. Os macrófagos são células fagocíticas que ingerem materiais estranhos e detritos celulares. E também liberam enzimas hidrolíticas, proteolíticas e geram espécies reativas de oxigênio que promovem a eliminação e digestão de organismos invasores (Ginhoux e Jung, 2014).

1.2.3 Dor inflamatória

A dor inflamatória se desenvolve quando há um aumento na sensibilidade do sistema nociceptivo em decorrência de um rompimento da integridade do tecido, seja por um trauma, calor, infecção, toxinas, resposta inadequada do sistema imunológico, tumor ou outras injúrias (Woolf, 2010). Depois que ocorre o dano ao tecido, diversos mediadores são liberados, tanto das células que sofreram o dano quanto de células imunológicas que estão se infiltrando na área lesada, entre eles estão citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), PGs, bradicinina e muitos outros. Os terminais periféricos de nociceptores expressam receptores para a maioria desses mediadores químicos, que atuam diminuindo o seu limiar de ativação. Esse aumento da sensibilidade dos nociceptores em um tecido inflamado é denominado sensibilização periférica e contribui para a hipersensibilidade da dor inflamatória ou hiperalgesia. Essa hipersensibilidade à dor ajuda a proteger o tecido já lesionado de sofrer mais danos. (Figura 4) (Chen e cols., 2013).

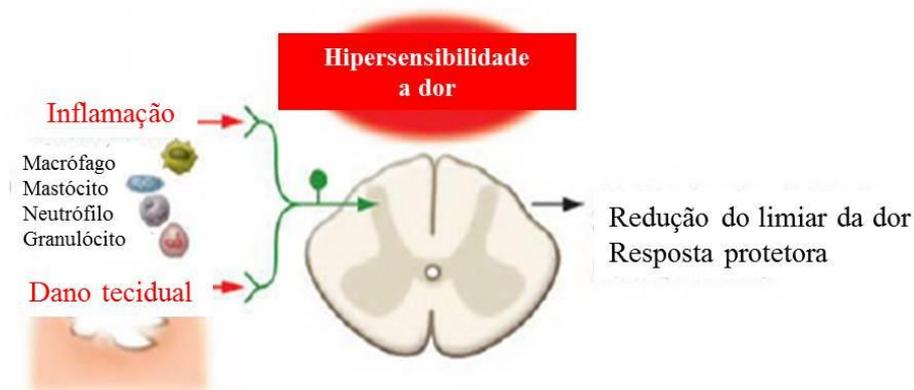


Figura 4: Dor inflamatória (Adaptado de Woolf, 2010).

Um outro mecanismo que também leva a hipersensibilidade à dor é denominado de sensibilização central. Além de ocorrer a liberação de mediadores inflamatórios na área afetada, a injúria tecidual também estimula a liberação de neurotransmissores por nociceptores centrais, ocasionando a produção de citocinas pró-inflamatórias e PGs na medula espinhal. Esse evento causa excitação e desinibição de neurônios no corno dorsal da medula espinhal gerando respostas anormais a um estímulo da periferia (Chen e cols., 2013).

1.2.4 Mediadores inflamatórios

1.2.4.1 Mediadores lipídicos (Eicosanoides e PAF)

Os eicosanoides são produtos oxigenados originados a partir da metabolização do ácido araquidônico (AA), nessa família estão incluídos as prostaglandinas (PGs), o tromboxano (TXA₂), os leucotrienos (LTs), as lipoxinas e os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs). O AA é um ácido graxo insaturado, que está presente na membrana plasmática de todas as células. Durante a síntese dos eicosanoides esse ácido é mobilizado da membrana pela ação de fosfolipases, principalmente a fosfolipase A₂ (PLA₂), e é metabolizado por três

vias principais onde participam as enzimas ciclo-oxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e enzimas do citocromo P450 (Hata e Breyer, 2004; Stables e Gilroy, 2011).

Na via das ciclo-oxigenases, a partir da oxidação do AA serão produzidos o tromboxano A₂ (TXA₂) e as cinco principais prostaglandinas bioativas, PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ e PGI₂ (Figura 5). Existem duas isoformas principais de ciclo-oxigenases as quais diferem na sua distribuição pelos tecidos e na regulação de expressão. Apesar de existirem exceções, a ciclo-oxigenase 1 (COX-1) é considerada uma enzima constitutiva expressa em diversos tecidos, enquanto que a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) é induzida particularmente em resposta a citocinas inflamatórias e estímulos nocivos, como por exemplo uma infecção bacteriana. (Hata e Breyer, 2004).

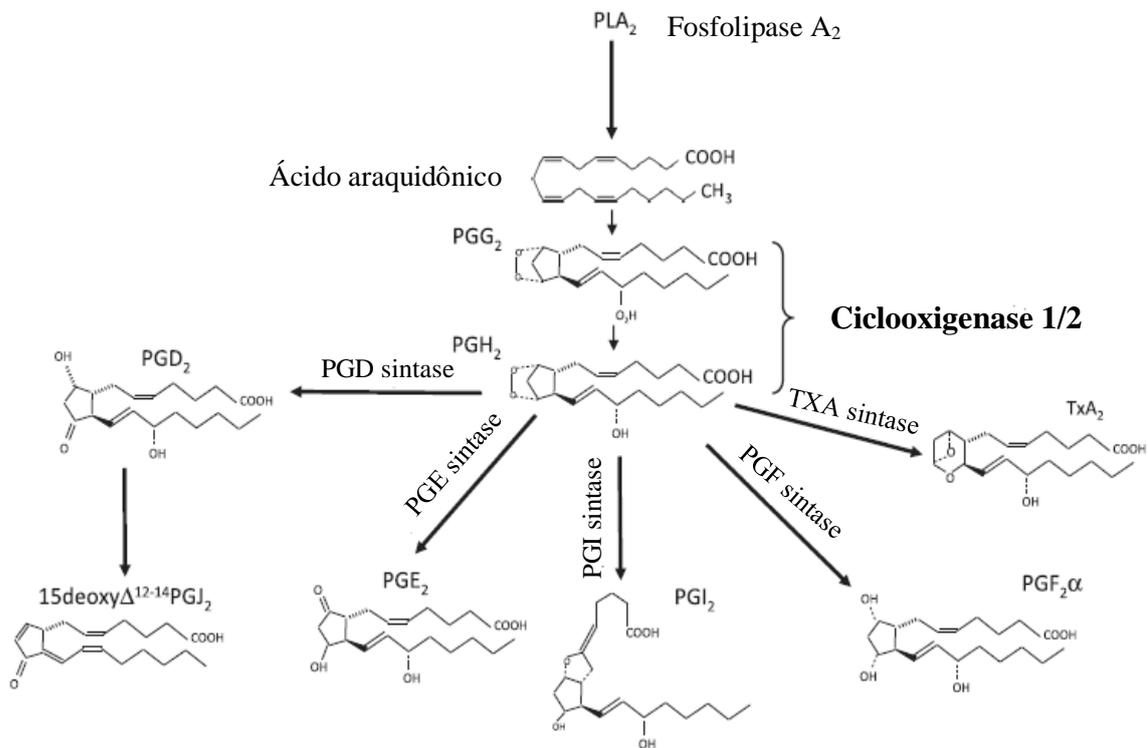


Figura 5: Metabolismo dos prostanoides (Adaptado de Stables e Gilroy, 2011).

A PGE₂ e PGI₂ são as prostaglandinas pró-inflamatórias mais predominantes. Ambas ocasionam vasodilatação, formação de edema, aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia periférica e central. A PGE₂ é ainda o agente pirético mais potente, encontrada em grandes concentrações no fluido cérebro-espinhal de pacientes com infecções virais e bacterianas (Stables e Gilroy, 2011).

O AA é também metabolizado pelas enzimas lipooxigenases (LOXs), encontradas em leucócitos, plaquetas e células endoteliais. A 5-lipoxigenase (5-LOX) é a enzima expressa em leucócitos que exerce um papel de extrema importância na resposta inflamatória, pois a partir da sua ação ocorre a síntese de mediadores lipídicos predominantemente pró-inflamatórios como o LTB₄, que promove ativação e atração de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o local da inflamação e também os leucotrienos LTC₄, LTD₄ e LTE₄, que agem aumentando a permeabilidade vascular, o extravasamento de líquido e a formação do edema, características do processo inflamatório (Figura 6) (Botting, 2006).

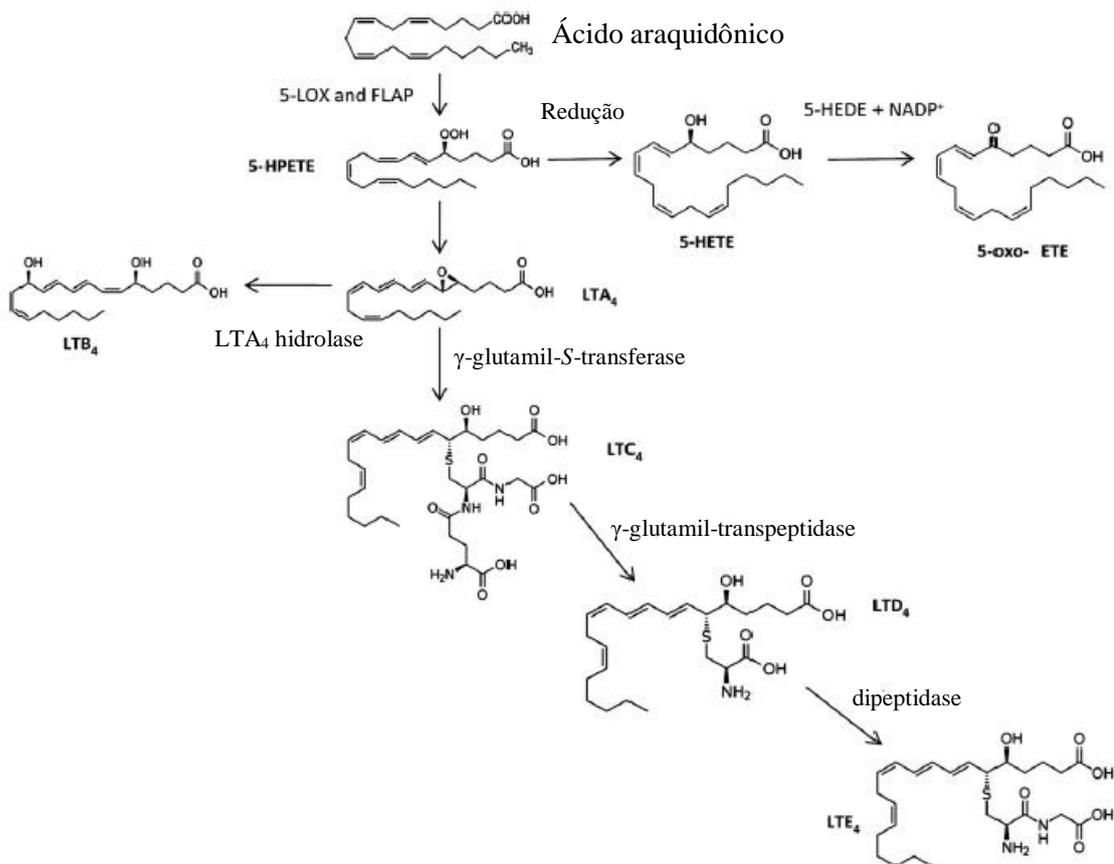


Figura 6: Metabolismo dos leucotrienos (Adaptado de Stables e Gilroy, 2011).

O fator de ativação plaquetária (PAF) é um mediador lipídico produzido por diversos tipos de células que participam da resposta inflamatória, incluindo mastócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Suas atividades biológicas incluem ativação de plaquetas, ativação de neutrófilos, contração da musculatura lisa e recrutamento de eosinófilos (Pettersen e Adler, 2002; Sato e Ebina, 2013).

1.2.4.2 Aminas Vasoativas

A histamina é classificada como um mediador inflamatório cuja liberação medeia diversas reações de hipersensibilidade imediata. Existem quatro fontes de histamina bem reconhecidas, são elas: mastócitos, basófilos, células enterocromafins da mucosa gástrica e nervos histaminérgicos do cérebro. A liberação de histamina e subsequente ligação aos receptores histaminérgicos periféricos e centrais promovem uma imediata e concentração – dependente contração da musculatura lisa do trato respiratório e gastrointestinal, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e estimulação sensorial dos nervos. Ela age também como um sinal estimulatório para a produção de citocinas e expressão de moléculas de adesão (MacGlashan, 2003; Mahdy e Webster, 2014).

A bradicinina (BK) é um peptídeo vasoativo de baixo peso molecular do grupo das cininas, que é formada nos tecidos e fluidos corporais durante a inflamação. Depois da sua produção a BK atua em uma variedade de tecidos, promovendo a estimulação de células endoteliais a produzir óxido nítrico e conseqüente vasodilatação, indução da contração das células endoteliais desencadeando o extravasamento de líquido, atuando como quimioatratador e estimulador de células do sistema imunológico como macrófagos e neutrófilos, promovendo a mobilização do ácido araquidônico e estimulação de nervos sensoriais resultando em condições de dor e hiperalgesia. Além dessas ações, ela também é capaz de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 (Dray e Perkins, 1993; Kaplan e cols., 2002).

1.2.4.3 Citocinas

Citocinas são pequenas proteínas produzidas por uma variedade de células onde se incluem as células do sistema imunológico. Elas agem em baixas concentrações através de ligações de alta afinidade com receptores específicos e, depois de secretadas, se deslocam por pequenas distâncias. Suas atuações envolvem a regulação das reações imunológicas e inflamatórias, e estão presentes tanto na inflamação aguda quanto crônica. A produção das citocinas é geralmente autolimitante, contudo algumas citocinas podem persistir na circulação durante longos períodos de tempo. As principais citocinas pró-inflamatórias incluem a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004, Sommer e Kress, 2004, Turner e cols., 2014).

A família da IL-1 inclui diversos membros como a IL-1 α , IL-1 β , entre outras. A IL-1 β é uma citocina com potente ação pró-inflamatória que é sintetizada por diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos. Sua ação em receptores específicos promove ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, do inglês *Mitogen activated protein kinases*) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), resultando na expressão de mediadores pró-inflamatórios. O NF- κ B é um fator transcrição que uma vez ativado se desloca até o núcleo da célula e se liga em sítios do DNA responsivos para determinados genes, ativando assim a transcrição gênica, já as MAPKs fosforilam e ativam fatores transcricionais presentes no citoplasma ou no núcleo, provocando a expressão de genes a conseqüentemente induzindo respostas biológicas (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Turner e cols., 2014).

Outro mediador que possui um importante papel na resposta inflamatória é o TNF- α . Essa citocina é secretada principalmente por macrófagos ativados, no entanto pode ser secretada por outros tipos celulares, que incluem os monócitos, mastócitos, linfócitos T,

linfócitos NK (do inglês *natural killer*), queratinócitos, fibroblastos e neurônios. O TNF- α possui um papel chave no orquestramento do processo inflamatório, ele induz as células endoteliais a produzirem mediadores lipídicos, que serão responsáveis na formação do edema, além de também induzir a expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos, estimulando a sua infiltração no tecido lesionado. Ele ainda estimula a produção de citocinas e é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares (Turner e cols., 2014).

1.2.4.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso e inorgânico, que atualmente constitui um dos mediadores mais importantes em processos intra e extracelulares. Ele é produzido a partir da oxidação da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e NO. Essa conversão é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Figura 7) (Moncada e cols., 1991)

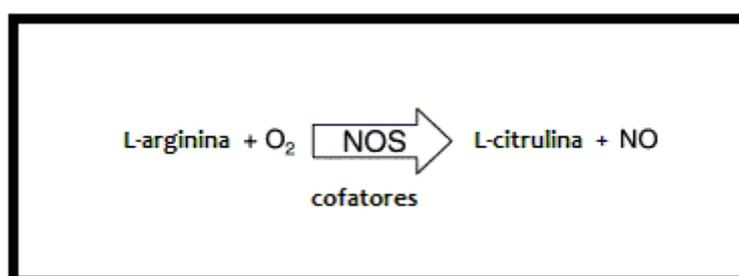


Figura 7: Rota sintética do óxido nítrico (Adaptado de Baylis, 2005).

Existem três isoformas principais da NOS, a NOS neuronal (nNOS), presente normalmente em neurônios, a NOS endotelial (eNOS) presente em células endoteliais e nas plaquetas e a NOS induzível (iNOS), presente em leucócitos ativados. A nNOS e a eNOS são denominadas enzimas constitutivas, que produzem NO em pequenas quantidades. O NO produzido pela nNOS está envolvido na modulação de funções fisiológicas à nível do Sistema

Nervoso Central e o NO produzido pela eNOS participa dos processos de relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, vasoproteção, regulação da pressão sanguínea, dentre outras funções. A iNOS, por sua vez, produz NO em altas concentrações e é considerada a principal fonte da produção de óxido nítrico em processos inflamatórios. A expressão dessa enzima em macrófagos ativados e diversos outros tipos celulares como linfócitos, neutrófilos é induzida por citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos em processos inflamatórios locais e sistêmicos. Citocinas pró-inflamatórias podem induzir a expressão de iNOS, como por exemplo o TNF- α e a IL-1 β (Szabó, 2000; Dusse e cols., 2003; Forstermann e Sessa, 2012).

A produção de grandes quantidades de NO durante o processo inflamatório, contribui para as suas ações pró-inflamatórias e citotóxicas (Mahat e cols., 2010). A base bioquímica para a ação citotóxica direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo. Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos e neutrófilos secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. A ação tóxica cooperativa de NO e O_2^- resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso agente oxidante que pode reagir, via diversos mecanismos, com proteínas, lipídeos e com o DNA (Dusse e cols., 2003; Forstermann e Sessa, 2012).

1.2.4.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio incluem o O_2^- , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-). As ROS podem ser geradas na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou pelo complexo NADPH oxidase (NOX) na membrana plasmática ou no citosol. Elas são normalmente sintetizadas durante a produção de energia em células aeróbicas e removidas por enzimas antioxidantes. Contudo, durante a reação inflamatória ocorre um aumento da sua produção por células fagocíticas ativadas como macrófagos e neutrófilos gerando um processo chamado de “estresse oxidativo”, em que a geração de ROS supera a sua remoção por estruturas especializadas. Essa geração de ROS aumentada faz parte do processo de defesa do organismo. ROS exercem atividades bactericidas através da oxidação de microorganismos invasores, além de promover aumento da expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios e também direcionar o recrutamento de leucócitos através do sítio da inflamação (Katsuyama, 2010; Alessandri e cols., 2013).

1.2.5 Resolução do processo inflamatório

A resolução da inflamação é essencial para a manutenção da saúde do tecido depois de um estímulo que ocasionou uma disfunção ou dano tecidual (Lawrence e cols., 2002). Uma resposta apropriada isola a área afetada e retorna o tecido ao seu estado anterior ao da injúria ou pelo menos a um estado que permita a cura (Medzhitov, 2010). O processo de resolução da inflamação implica na existência de um mecanismo regulatório que embora exista, ainda não é completamente entendido devido à complexidade da resposta inflamatória e os múltiplos componentes envolvidos (Cone, 2001; Medzhitov, 2010). Contudo, é um processo ativo que envolve eventos chaves como a apoptose de leucócitos e o reconhecimento e fagocitose de células que entraram no processo de apoptose, o que resulta na diminuição da expressão de

mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e a IL-1 β e o aumento da produção de fatores anti-inflamatórios, que incluem a IL-10, as lipoxinas, as prostaglandinas ciclopentanonas (cyPGs), dentre outros (Aller e cols., 2006; Alessandri e cols., 2013).

O reconhecimento dos efeitos deletérios da inflamação levou ao desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento desse processo. Atualmente o uso de agentes inibidores da COX não seletivos como a Aspirina e o Ibuprofeno, assim como os inibidores seletivos para COX-2 são bem reconhecidos na prática clínica (Cone, 2001). No entanto, essa classe de medicamentos possui efeitos adversos bem documentados como atividade ulcerogênica, antitrombótica, dentre outras. Com isso, novas moléculas têm sido sintetizadas com o intuito de aprimorar a atividade anti-inflamatória dos compostos e reduzir seus efeitos adversos (Fernandes e cols., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar a atividade anti-inflamatória de dois novos análogos da Convolutamidina A (CM02 e CM03) em modelos *in vivo*, e baseado em ensaios farmacológicos e dosagens bioquímicas sugerir mecanismos de ação que possam estar envolvidos com as suas atuações.

2.2 Específicos

1. Avaliar a atividade anti-inflamatória de CM02 e CM03 em modelos de inflamação aguda provenientes de estímulos químicos como a lambadura de pata induzida pela formalina e a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina.
2. Investigar uma possível ação anti-inflamatória dos dois análogos no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS). Nesse mesmo modelo avaliar o extravasamento de proteínas e a produção de mediadores químicos como o óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-1 β e IL-10 e com isso sugerir possíveis mecanismos envolvidos.
3. Avaliar a atividade de ambos os análogos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo dos análogos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol

Os análogos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo aluno Rômulo Gabriel de Miranda de Paula Pinto, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, orientado pelo professor Angelo da Cunha Pinto e pela professora Bárbara Vasconcellos da Silva.

Foram sintetizadas a 5-cloro-*N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol (CM02) e a 5-bromo-*N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol (CM03) (Figura 8).

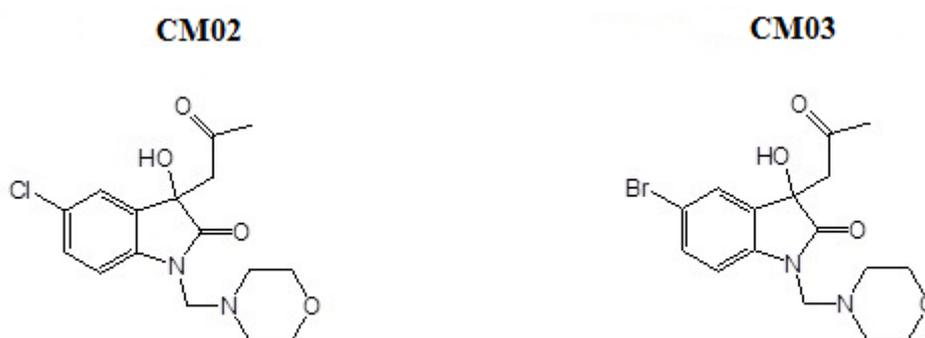


Figura 8: Análogos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol

Para preparação desses compostos foi utilizada como matéria-prima a isatina e a partir dessa molécula foi obtida a *N*-morfolina-isatina. Em seguida, esta foi condensada com a acetona, empregando dietilamina como catalisador, dando origem à *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol conforme ilustrado na figura abaixo.

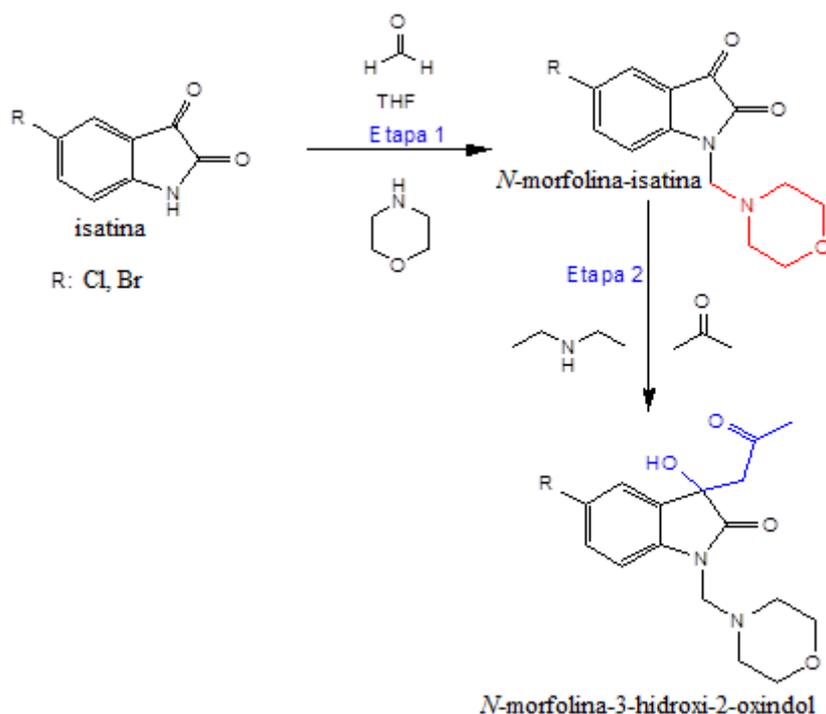


Figura9: Rota sintética dos análogos *N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol.

No final dessa reação foram recuperadas as substâncias CM02 e CM03. Ambas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV).

3.2. Reagentes

Formaldeído foi comprado da Reagen. Ácido acetilsalicílico (AAS), carragenina, Sulfato de zinco, Hidróxido de sódio, Fosfato de sódio, Formato de amônio, Carbonato de sódio, Ácido fosfórico, Fosfato monopotássico, tampão de fosfato-citrato com perborato, pastilhas de tetra-metil-di-hidrocloro de benzidina (TMB), naftiletenodiamina, sulfanilamida, Forbol Miristato Acetato (PMA) e Diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) foram adquiridos da Sigma. Outros reagentes utilizados foram: dimetilsulfóxido P.A (DMSO) (Fisher Biotech); éter etílico e Tween 20 (Isogar, Rio de Janeiro, Brasil); fosfato dissódico de

dexametasona (Aché, Rio de Janeiro, Brasil); soro fetal bovino (LGC Biotecnologia); cloridrato de xilazina 2% (Vetbrands); cloridrato de ketamina 10% (Ceva).

Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o Kit Pierce BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA). Na dosagem de nitrato foi utilizada cepa de *Escherichia coli* (ATCC #25922), colocada para crescimento em meio anaeróbico e utilizada como fonte da enzima nitrato redutase, Trypticase Soy Broth (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, EUA) e os reagentes nitrato de sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio e fosfato monossódico (Reagen), sulfato de zinco (Vetec), formato de amônio, molibdato de amônio, naftiletlenodiamina e sulfanilamida (Sigma).

Para a quantificação de citocinas foram utilizadas imunoplaças F96 Maxisorp (Nunc, Thermo Fisher Scientific, NY, EUA) e os kits ELISA BD OptEIA™ Set Mouse para TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e MCP-1, (BD Biosciences, San Diego, EUA).

3.3. Preparo das soluções utilizadas

- Formalina: solução de formaldeído 2,5% (v/v) diluído em PBS.
- Ácido Acetilsalicílico (AAS): solução à 100 mg/mL em água e NaOH.
- Carragenina: solução à 1% (p/v) em PBS.
- Dexametasona: solução 100 mg/mL em água.

Tampão fosfato salina

KH ₂ PO ₄ (anidro)	1,78 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	7,61 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O ultra pura q.s.p.	1000 ml

Reagente BCA

No momento da dosagem, misturam-se os reagentes A e B, na proporção 50:1, obtidos no kit Pierce BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA).

Reagente de Griess

Reagente A:

Sulfanilamida	1 grama
H ₂ O ultra pura q.s.p.	100 ml

Reagente B:

Dicloreto de naftiletenodiamina	0,1 grama
H ₃ PO ₄ (a 10%) q.s.p.	100 mL

No momento da dosagem, misturam-se partes iguais dos reagentes A e B. Para a quantificação do nitrito, incubam-se volumes iguais da amostra ou da solução para curva padrão e do reagente de Griess pronto.

Tampão de Bloqueio

Soro fetal bovino	10 ml
PBS q.s.p.	100 ml

Tampão Diluente

NaHCO ₃	7,13 g
Na ₂ CO ₃	1,59 g
H ₂ O ultra pura q.s.p.	1000 ml
Acertar o pH para 9,5 (NaOH 10 N)	

Tampão de Lavagem

Tween 20	0,5 ml
PBS q.s.p.	1000 ml

Substrato para dosagem de citocinas: 1,0 ml de solução de TMB em 9,0 mL de solução de tampão fosfato-citrato com perborato, preparado 30 minutos antes da utilização;

Anestésico

Cloridrato de ketamina	112,5 mg/kg
Cloridrato de xilazina	7,5 mg/kg

3.4 Análogos e fármacos controle

Soluções estoque de Convolutamidina A, CM02 ou CM03 foram preparadas em DMSO e água à 10 mg/mL. No dia dos ensaios, soluções intermediárias, em água eram preparadas e doses de 0,1, 1,0, 5,0 ou 10,0 mg/kg eram administradas, por via oral, intraperitoneal ou local, aos animais. Morfina (2,5 mg/kg, v.o.), ácido acetilsalicílico (200 mg/kg, v.o.) e dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) foram utilizados como fármacos controle positivo e o grupo controle negativo foi composto por água destilada e DMSO. Em todos os experimentos, a concentração final de DMSO não excedeu 0,5% de modo a não produzir qualquer efeito.

3.5 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster, fêmeas, pesando entre 25 e 30 gramas doados pelo Instituto Vital Brasil (IVB). Esses animais foram mantidos no Biotério da

Farmacologia (ICB/UFRJ), com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura do ambiente controlada em 22 ± 2 °C e livre acesso à água e comida. Antes de cada experimento os animais eram ambientados durante 12 horas no local de realização dos testes. Os protocolos de experimentação em animais de laboratório obedeceram aos critérios da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e às normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e receberam o protocolo #DFBCICB015-04/16.

3.6 Análise Estatística

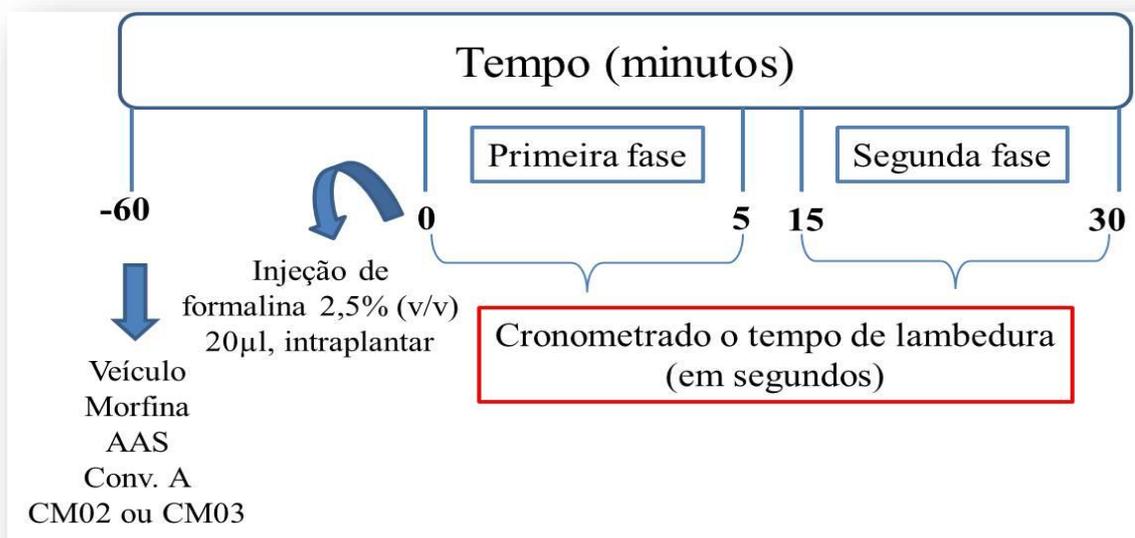
Os grupos experimentais foram compostos por 6 a 8 animais. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prisma*[®] (versão 5.0., GraphPad Software inc., San Diego, CA, USA) usando análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Valores de “p” menores que 0,05 foram considerados significativos.

3.7 Modelo da lambedura de pata induzida por formalina

Neste modelo é injetado, por via subcutânea, na pata traseira direita do camundongo um volume de 20 μ l de uma solução de formalina a 2,5% (v/v) e a resposta do animal a esse estímulo é verificada através da lambedura da pata, a qual é mensurada nos 5 primeiros minutos, e de 15 minutos a 30 minutos, constituindo assim duas fases (Adaptado de Hunskaar e cols., 1987).

Durante a primeira fase ocorre a estimulação de nociceptores, ativação de fibras C e liberação de mediadores inflamatórios. Já a segunda fase é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e mudanças no corno dorsal da medula espinhal.

Veículo, morfina ou os compostos foram administrados 60 minutos antes da injeção de formalina na pata. O protocolo experimental se encontra ilustrado abaixo.



Esquema1: Protocolo do Modelo da lambertura de pata induzida por formalina

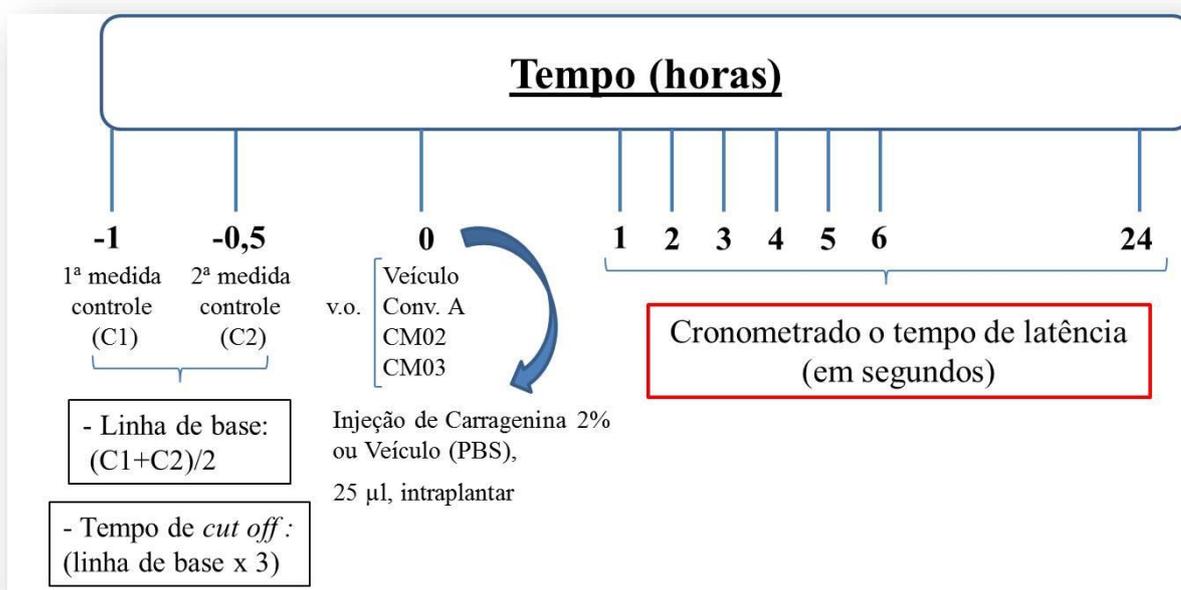
3.8 Modelo da hiperalgesia térmica induzida por carragenina

A hiperalgesia foi induzida com a injeção subcutânea de 25 µl de carragenina a 2% na pata direita traseira dos camundongos. Esses animais foram então colocados sobre uma placa aquecida a $\pm 55^{\circ}\text{C}$ e o tempo para demonstrar alguma reação (lambertura ou levantamento da pata estimulada com carragenina) ao estímulo térmico foi verificado em intervalos de 1 hora até o tempo de 6 horas e até o tempo de 24 horas (Adaptado de Sammons e cols., 2000).

A fim de comparar a reação dos animais frente ao estímulo térmico e comprovar que a administração de carragenina causa uma inflamação local tempo dependente foram denominados dois grupos controle. O primeiro grupo recebeu veículo (água destilada + DMSO) por via oral e PBS na pata (grupo controle negativo) e o segundo grupo recebeu veículo (v.o.) e carragenina 2% na pata (grupo controle positivo). Os animais do grupo

tratado, por sua vez, receberam Convolutamidina A, CM02 ou CM03 (5 mg/kg, v.o.) e carragenina 2% na pata.

Para cada grupo foram realizadas duas medidas controle, antes de qualquer tratamento, e a média dessas medidas foi então calculada e denominada linha de base. O valor da linha de base foi então multiplicado por 3 para denominarmos o tempo de *cut-off* dos animais. O protocolo experimental seguido se encontra ilustrado abaixo.



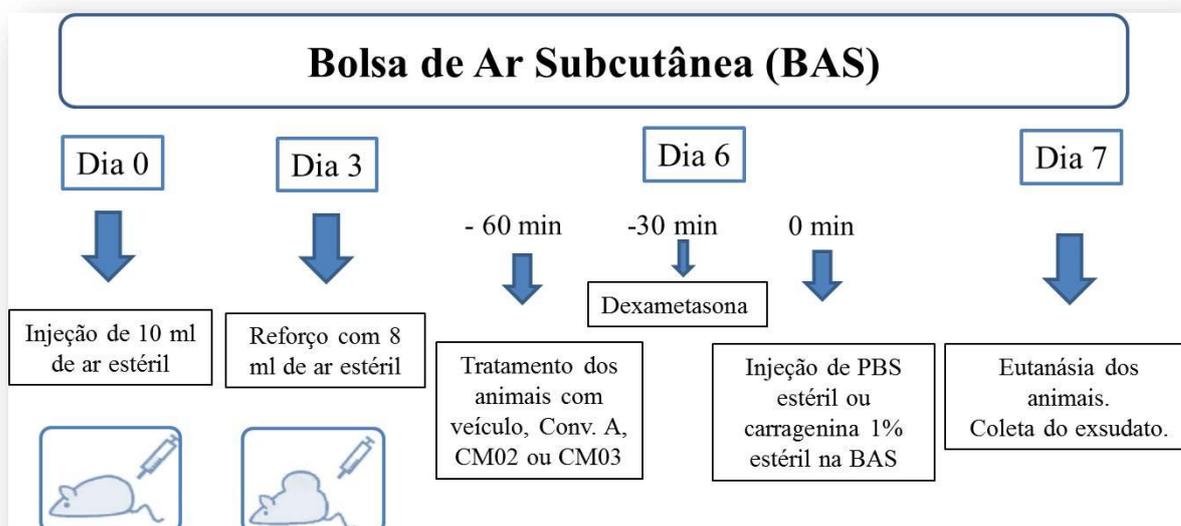
Esquema2: Protocolo do modelo da hiperalgesia térmica

3.9 Modelo da bolsa de ar subcutânea

O primeiro dia desse modelo consistiu na injeção de 10 ml de ar estéril no dorso dos animais, por via subcutânea, para a formação de uma cavidade. Três dias após essa injeção foi feito um reforço com a administração de mais 8 ml de ar estéril para manutenção da BAS. No sexto dia os animais receberam 1 ml de uma solução estéril de carragenina a 1% na cavidade formada (Adaptado de Romano e cols., 1997).

Os animais foram tratados, por via oral, com a Convolutamidina A ou os análogos 60 minutos antes da injeção de carragenina. Foram ainda separados um grupo controle negativo ao qual foi administrado o veículo (água destilada + DMSO, v.o.) 60 minutos antes da injeção da carragenina, um grupo controle positivo que foi tratado com dexametasona (dose 0,5 mg/kg, i.p.) e 30 minutos depois foi feita a injeção de carragenina na BAS e um grupo tratado com veículo (v.o.) e PBS estéril na cavidade. No sétimo dia foi feita a eutanásia dos animais e a administração de 1 ml de PBS para a lavagem da cavidade e recolhimento do exsudato.

Imediatamente após a coleta do exsudato foi feita a contagem de leucócitos totais em um contador de células automático (pocH-100iV Diff, Sysmex). O exsudato foi então centrifugado a 1.200 rpm durante 8 minutos, o sobrenadante coletado, aliquotado e congelado para a realização de dosagens de mediadores inflamatórios e proteínas.



Esquema3: Protocolo do modelo experimental da bolsa de ar subcutânea(BAS).

Ainda nesse modelo, após a formação da cavidade como foi descrito anteriormente, verificamos a ação dos análogos pelas vias intraperitoneal e local, administrando CM02 ou CM03 30

minutos antes da injeção de carragenina na BAS. 24 horas após a injeção de carragenina os animais foram eutanasiados e o exsudato coletado para a quantificação da migração celular.

3.10 Toxicidade

Com o objetivo de verificar uma possível ação tóxica das substâncias testadas os animais foram tratados com a dose de 10,0 mg/kg (v.o.) das substâncias e sangue e lavado medular foram coletados 24 horas após a injeção de carragenina ou PBS.

Para a coleta do sangue, os camundongos foram anestesiados e seu sangue recolhido, por punção orbital, em eppendorfs contendo 15 µL de EDTA. Logo após a coleta foi feita a contagem total de células no contador automático.

O lavado medular foi recolhido a partir da remoção e lavagem do fêmur com 1 mL de PBS. Subsequentemente a contagem total de células foi realizada em um contador automático.

3.11 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas do sobrenadante do exsudato da BAS foi feita seguindo a técnica de BCA utilizando kit BCATM Pierce. Primeiramente 5 µl de cada uma das amostras foi pipetada em uma placa de 96 poços. Em seguida foi adicionado a cada poço com amostra 195 µl do reagente BCA e a placa incubada por 30 minutos a 37° C. Depois desse período de incubação foi feita a leitura a 570 nm em um leitor de microplaca (Flexstation[®]3, Molecular Devices). A curva padrão desse ensaio foi realizada com concentrações crescentes de albumina sérica bovina e a quantidade de proteínas expressa em µg/ml.

3.12 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A quantificação de óxido nítrico foi realizada através da conversão de nitrato em nitrito, seguida da dosagem de nitrito, (Green e cols., 1982).

Inicialmente foi feita a desproteïnização do sobrenadante do exsudato coletado da BAS a partir da incubação de 200 µl de amostra com 20 µl de ZnSO₄. Essa mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 minutos a 4° C. Em seguida, foi feita uma nova agitação e adicionou-se 4 µl de NaOH, novamente a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos a 4° C. Depois desse período, foi feita uma nova agitação e a mistura centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos.

Ao término da desproteïnização das amostras foi iniciada a reação de conversão de nitrato em nitrito. Em um eppendorf foi realizada a mistura de 15 µl de fosfato de sódio, 15 µl de formato de amônio, 150 µl de amostra desproteïnizada ou padrão. Após misturar esses reagentes foi adicionado, em cada eppendorf, 10 µl de bactéria diluída e essa mistura foi então incubada por 2 horas a 37° C. Depois da incubação centrifugou-se os eppendorfs a 10.000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. Foi retirado 100 µl do sobrenadante, o qual foi pipetado em placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 100 µl do reagente de Griess. A leitura das placas foi feita a 540 nm em leitor de microplacas (Flexstation®3). A curva padrão foi constituída de NaNO₃ e os resultados expressos em µM de nitrito formado.

3.13 Dosagem de citocinas inflamatórias

A quantificação de citocinas foi mensurada utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits específicos para cada citocina. O ensaio teve duração de três dias.

No primeiro dia, em imunoplasmas de 96 poços foram diluídos os anticorpos de captura em uma solução diluente na proporção 1:250 (22 µl do anticorpo + 5478 µl de solução diluente). Em seguida essas placas foram cobertas e incubadas durante a noite a 4° C.

No segundo dia, as placas foram submetidas a três lavagens utilizando tampão de lavagem. As lavagens foram feitas em uma lavadora de placas (pocH-100 iv Diff). Após essa etapa foi adicionado o diluente de ensaio (200 µl/poço) e as placas incubadas por 1 hora em

temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas novamente três lavagens utilizando o tampão de lavagem e depois foi realizada a preparação do padrão em diluente de ensaio. Posteriormente, as amostras e a curva padrão foram adicionadas (50 µl/poço), as placas seladas e incubadas durante a noite a 4° C.

No terceiro dia de ensaio, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e foi adicionado 50 µl/poço de anticorpo de detecção conjugado com a enzima. As placas foram então seladas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período foram feitas mais sete lavagens (tampão de lavagem) e adicionado 50 µl/poço de solução de substrato. As placas foram incubadas no escuro por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo foi adicionada a solução de parada (25 µl/poço) e feita à leitura a 450 nm em um leitor de microplacas (Flexstation® 3). A quantidade de citocinas encontradas foi expressa em pg/ml.

3.14 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Leucócitos coletados da BAS foram colocados em eppendorfs em uma quantidade de 10⁶ células com volume final de 1 ml e incubados durante 30 minutos em uma estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período foi feito o tratamento das células com as substâncias Convolutamidina A, CM02 ou CM03 em concentrações de 10, 30 e 100 µM e novamente feita uma incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, adicionaram – se às células 10 nM de forbol miristato acetato (PMA) e essas células permaneceram por mais 45 minutos na estufa. Após esse período foi adicionado 2 µM de 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) ao conteúdo dos eppendorfs, que foram incubados por 30 minutos na estufa (37°C e 5% de CO₂). A fluorescência emitida pela conversão do DCF-DA foi então captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo e os resultados expressos em intensidade da fluorescência (Srivastava e cols., 2009).

4.RESULTADOS

4.1. Efeito dos análogos da Convolutamidina A no modelo da lambedura de pata induzida pela formalina

A injeção intraplantar de formalina (2,5%) desencadeia uma resposta nociceptiva bifásica. Esse comportamento consiste em uma fase inicial, que dura 5 minutos e se inicia logo após a injeção de formalina, e depois uma segunda fase que tem o seu início em 15 minutos e perdura até 30 minutos (Yang e cols., 2012).

O gráfico 1 demonstra a atividade do análogo CM02 (0,1, 1 e 5 mg/kg) no modelo da lambedura de pata induzida pela formalina. Na primeira fase desse modelo, os animais que foram pré-tratados com veículo (água destilada + DMSO) apresentaram um tempo de lambedura de $80,6 \pm 19,9$ segundos. Nos grupos pré-tratados com morfina (2,5 mg/kg) e AAS (ácido acetilsalicílico, 200 mg/kg) (fármacos controle) esse tempo foi reduzido significativamente ($28,8 \pm 1,3$ segundos e $45,7 \pm 2,8$ segundos, respectivamente). Os animais que receberam a Convolutamidina A não apresentaram redução do tempo de lambedura na primeira fase, enquanto que os animais pré-tratados com o seu análogo CM02 apresentaram redução significativa no tempo de lambedura da pata em todas as doses testadas, com inibição de 47,6% na dose de 0,1 mg/kg ($42,3 \pm 20,9$ segundos), 25,7% para a dose de 1 mg/kg ($59,8 \pm 9,3$ segundos) e 46,5% na dose de 5 mg/kg ($43,1 \pm 3,5$ segundos).

Na segunda fase desse modelo, o grupo de animais que recebeu veículo, por via oral, apresentou um tempo de lambedura de $243,5 \pm 8,2$ segundos. Os grupos pré-tratados com morfina e AAS apresentaram redução do tempo de lambedura também na segunda fase ($25,2 \pm 1,2$ segundos e $123,3 \pm 32,2$ segundos, respectivamente). Nos animais pré-tratados com a Convolutamidina A esse tempo também foi reduzido significativamente ($170,3 \pm 6,8$ segundos). E nos grupos pré-tratados com o análogo CM02, o tempo de lambedura foi reduzido em todas as doses de maneira significativa, com uma inibição de 22,1% na dose de

0,1 mg/kg ($189,6 \pm 48,8$ segundos), 31,8% para a dose de 1 mg/kg ($166,0 \pm 18,9$ segundos) e 55,7 % na dose de 5 mg/kg ($107,8 \pm 15,0$ segundos).

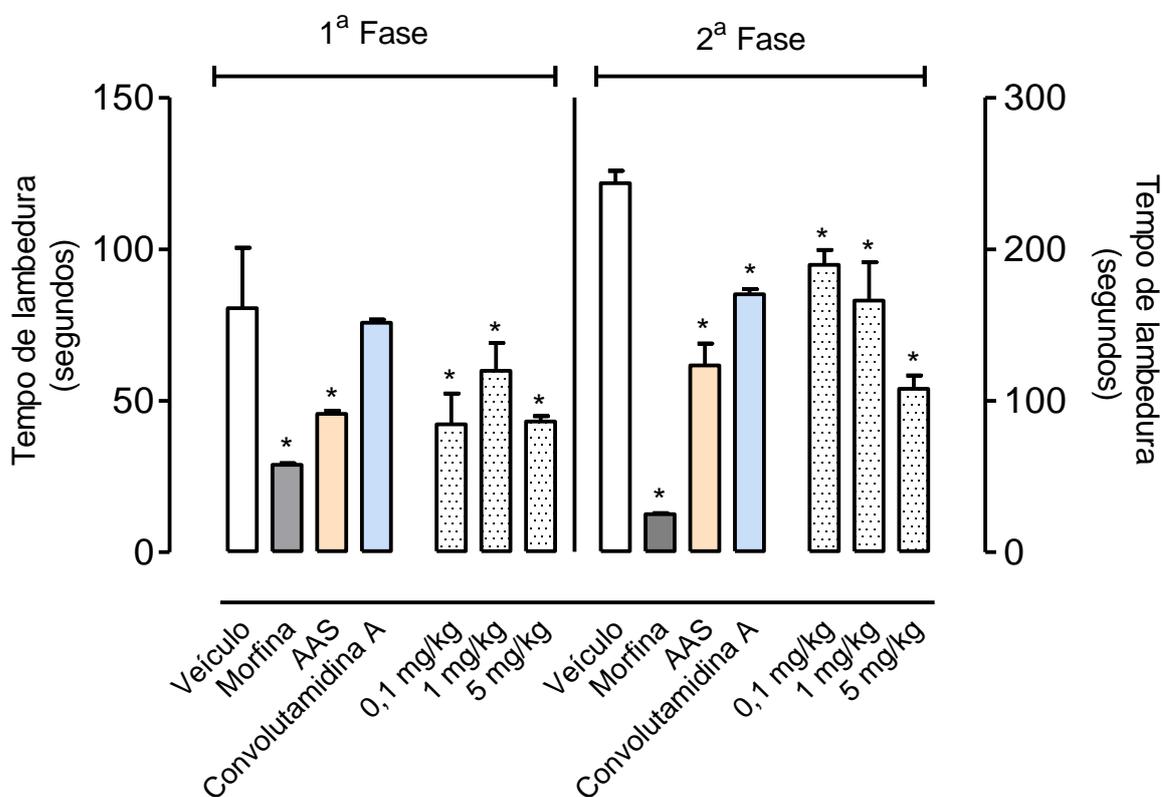


Gráfico 1: Efeito do análogo CM02 no modelo da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), morfina (2,5 mg/kg), Ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou CM02 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como Média \pm D.P. (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM02, Convolutamidina A, morfina ou AAS e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

O gráfico 2 demonstra o perfil do análogo CM03 no modelo da lambedura de pata induzida pela formalina. Na primeira fase desse modelo, o análogo foi capaz de reduzir de forma significativa o tempo de lambedura dos animais em todas as doses analisadas quando comparado ao grupo tratado

com veículo, com inibição de 32,6% para a dose de 0,1 mg/kg ($54,3 \pm 9,7$ segundos), 48,6% na dose de 1 mg/kg ($41,4 \pm 6,2$ segundos) e 45,3% na dose de 5 mg/kg ($44,1 \pm 8,1$ segundos). E durante a segunda fase, o análogo também reduziu o tempo de lambedura significativamente em todas as doses, apresentando redução de 63,4% na dose de 0,1 mg/kg ($89,2 \pm 18,4$ segundos), 48,9% na dose de 1 mg/kg ($124,3 \pm 30,7$ segundos) e 50,3% na dose de 5 mg/kg ($121,0 \pm 20,8$ segundos), enquanto que o AAS apresentou inibição de 49,3% ($123,3 \pm 32,2$ segundos).

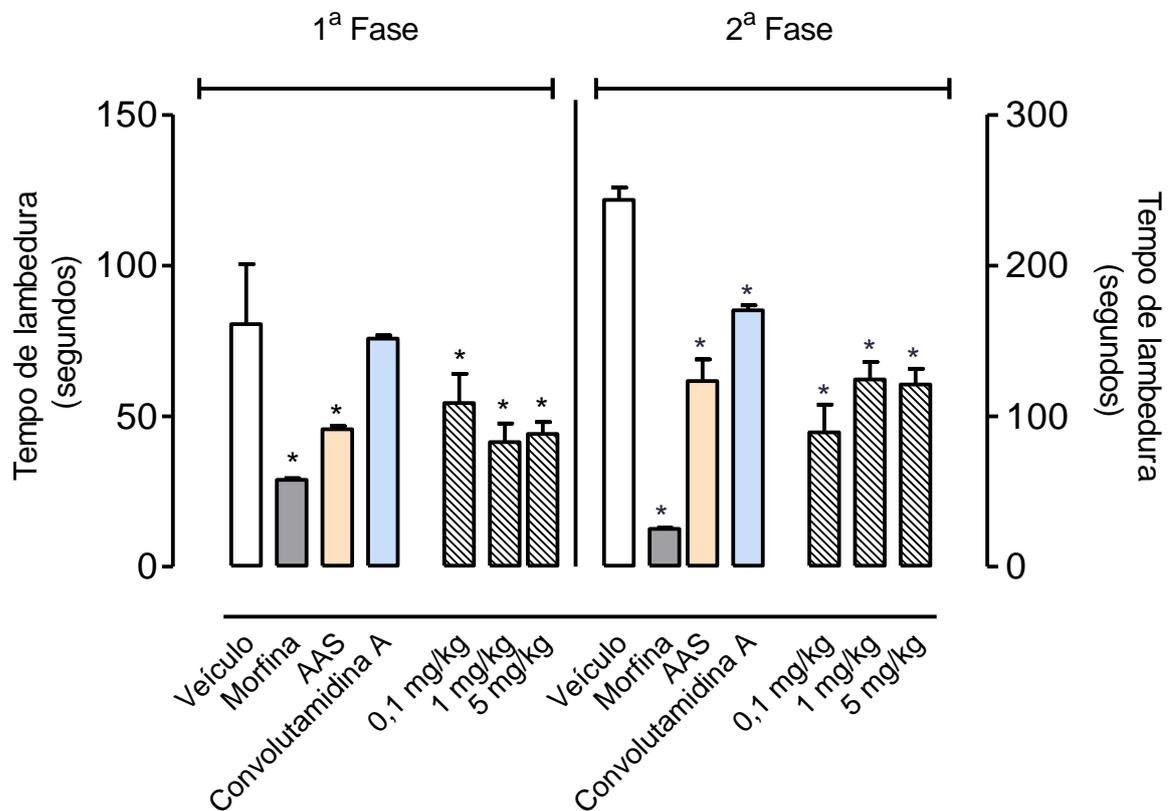


Gráfico 2: Efeito do análogo CM03 no modelo da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), morfina (2,5 mg/kg), Ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou CM03 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como Média \pm D.P. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=6-8). A significância estatística (*p <

0,05) foi calculada entre os grupos tratados com CM03, Convolutamidina A, morfina ou AAS e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.2 Efeito dos análogos da Convolutamidina A no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina

A administração intraplantar de carragenina (25 µL, 2%) induz uma inflamação tempo dependente e uma hiperalgesia ao estímulo térmico, que foi mensurada em intervalos de 1 hora até o tempo de 6 horas, seguida por uma única medida em 24 horas (Sammons e cols., 2000).

Nos gráficos 3 e 4 podemos observar que a partir do tempo de 1 hora, os animais que foram tratados oralmente com veículo e receberam injeção de carragenina na pata, apresentam um tempo de latência menor quando comparados com aqueles que receberam veículo, tanto por via oral como na pata. E esse padrão é observado até o tempo de 24 horas após a injeção de carragenina.

Nos grupos tratados com convolutamidina A (10 mg/kg), CM02 (5 mg/kg) e CM03 (5 mg/kg), podemos observar um aumento do tempo de latência quando esses grupos são comparados com aquele que recebeu somente veículo por via oral e carragenina na pata. Os animais que receberam Convolutamidina A (v.o.) sustentam esse aumento do tempo de latência de 1 hora até 4 horas, enquanto que os animais que receberam CM02 ou CM03 apresentam esse aumento entre 1 hora e 24 horas após a injeção da carragenina. No grupo tratado com CM02 o maior tempo de latência é alcançado nos tempos de 5, 6 e 24 horas ($7,6 \pm 1,2$ segundos; $8,4 \pm 1,2$ segundos; $9,9 \pm 0,7$ segundos, respectivamente) e no grupo tratado com CM03 no período de 24 horas ($7,6 \pm 0,03$ segundos), quando comparados aos animais que receberam veículo por via oral e carragenina na pata que apresentaram $3,6 \pm 0,9$ segundos

no tempo de 5 horas, $3,4 \pm 0,8$ segundos para o tempo de 6 horas e $3,7 \pm 0,9$ segundos em 24 horas.

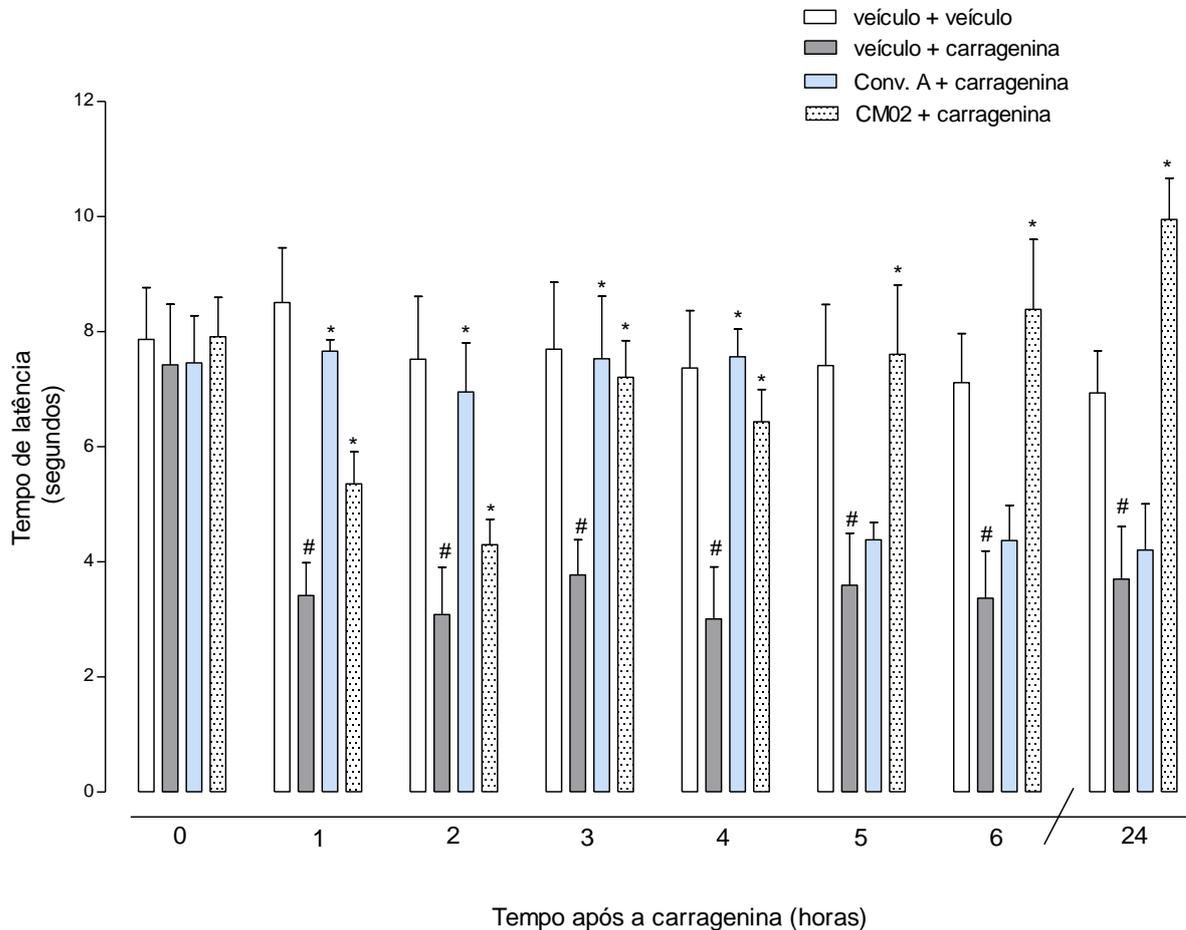


Gráfico 3: Efeito do análogo CM02 no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou CM02 (5 mg/kg) e foi administrado por via intraplantar veículo (PBS) ou carragenina (2%). Os resultados são expressos como Média \pm D.P.do tempo de latência (segundos) (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com as CM02 ou Convolutamidina A e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02 ou Convolutamidina A e o veículo (carragenina na pata) e # quando comparados os grupos veículo.

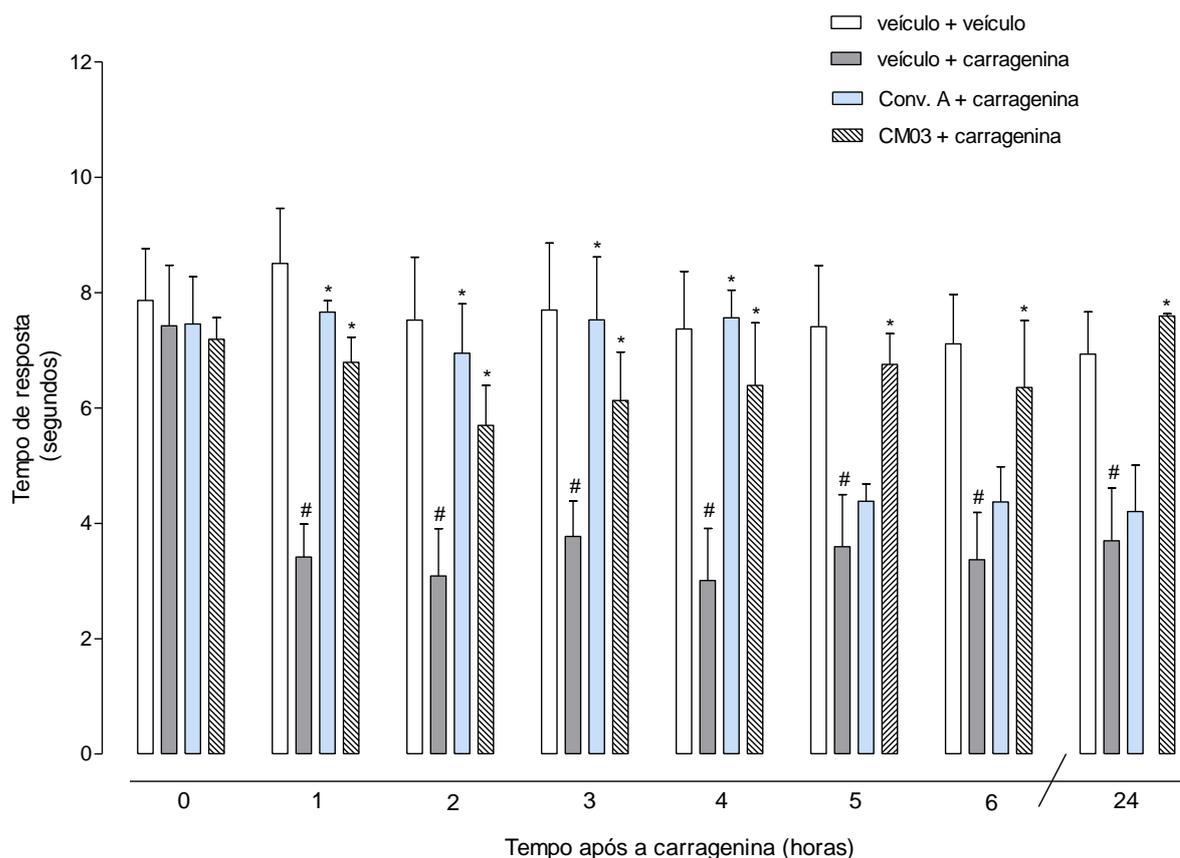


Gráfico 4: Efeito do análogo CM03 no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina. Os animais foram tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10,0 mg/kg) ou CM03 (5,0 mg/kg) e foi administrado por via intraplantar veículo (PBS) ou carragenina (2,0%). Os resultados são expressos como Média \pm D.P. do tempo de latência (segundos) (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM03 ou Convolutamidina A e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM03 ou Convolutamidina A e o veículo (carragenina na pata) e # quando comparados os grupos veículo.

4.3 Atividade dos análogos da Convolutamidina A no modelo da Bolsa de Ar Subcutânea

A bolsa de ar subcutânea (BAS) é formada através da injeção de ar durante alguns dias. A administração de carragenina na cavidade totalmente formada produz uma reação

inflamatória caracterizada pela produção de mediadores químicos no exsudato e um grande influxo de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Tal modelo é conveniente para estudar a inflamação aguda (Morikawa e cols., 2003). Assim, o pré-tratamento dos animais com a Convolutamidina A e seus análogos pode nos indicar se estas substâncias tem algum efeito anti-inflamatório através da redução de parâmetros observados na reação induzida pela carragenina.

4.3.1 Contagem Total de Células

O primeiro parâmetro avaliado nesse modelo foi o da migração celular, através da contagem total de células do exsudato coletado da cavidade 24 horas após a injeção de carragenina (1 ml, 1%). De acordo com os resultados apresentados no gráfico 5, podemos verificar que nos animais pré-tratados oralmente com veículo, a injeção de carragenina na BAS promove um aumento na contagem de células da cavidade ($54,6 \pm 10,6 \times 10^3$ células/ μ l) em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS ($2,3 \pm 1,0 \times 10^3$ células/ μ l). Com relação aos animais que foram pré-tratados com o anti-inflamatório esteroide dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) foi verificada uma redução significativa do número total de células que migrou para a cavidade ($28,2 \pm 4,9 \times 10^3$ células/ μ l). No grupo pré-tratado com a Convolutamidina A essa redução também foi significativa ($28,2 \pm 4,9 \times 10^3$ células/ μ l). E nos animais que receberam o análogo CM02 ocorreu uma redução do número total de células da BAS em todas as doses testadas, com uma inibição de 59,9% na dose de 0,1 mg/kg ($21,9 \pm 6,5 \times 10^3$ células/ μ l), 56,6% ($23,7 \pm 13,2 \times 10^3$ células/ μ L) para a dose de 1 mg/kg e 53,4% ($25,5 \pm 15,6 \times 10^3$ células/ μ L) na dose de 5 mg/kg.

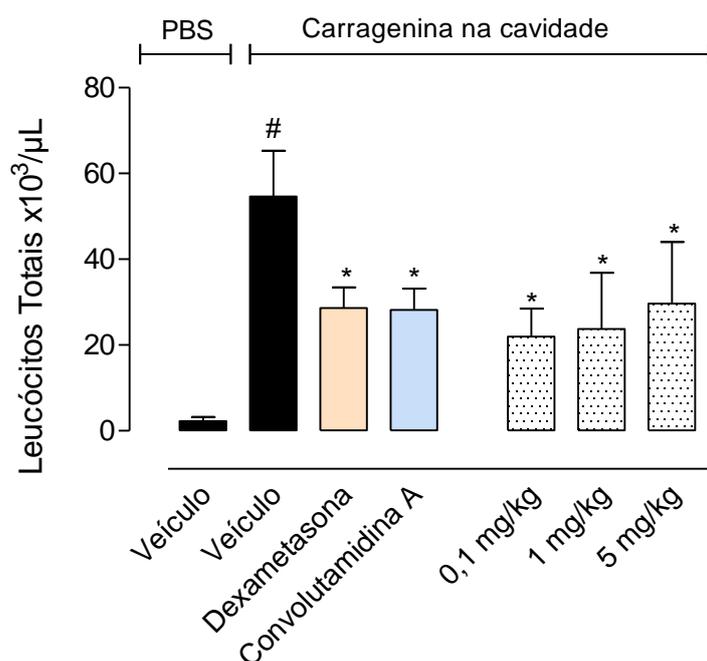


Gráfico 5: Efeito do análogo CM02 na migração de células induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou CM02 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com Dexametasona (0,5 mg/kg), 30 minutos antes a injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média ± D.P. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n=6-8$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com Dexametasona, Convolutamidina A ou CM02 e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com dexametasona, Convolutamidina A ou CM02 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

Já no gráfico 6, que demonstra o perfil do análogo CM03, podemos novamente observar que a injeção de carragenina na BAS resulta em elevado número de células ($56,7 \pm 11,7 \times 10^3$ células/ μl) quando comparado com a injeção de PBS ($1,8 \pm 1,2 \times 10^3$ células/ μl) nos animais que receberam veículo (v.o.). Os grupos pré-tratados com CM03 demonstram uma

diminuição significativa na contagem de células nas doses de 1 e 5 mg/kg ($30,3 \pm 4,5 \times 10^3$ células/ μL e $29 \pm 15,4 \times 10^3$ células/ μL , respectivamente) com inibições de 46,7 % para a dose de 1 mg/kg e 48,9 % para a dose de 5 mg/kg.

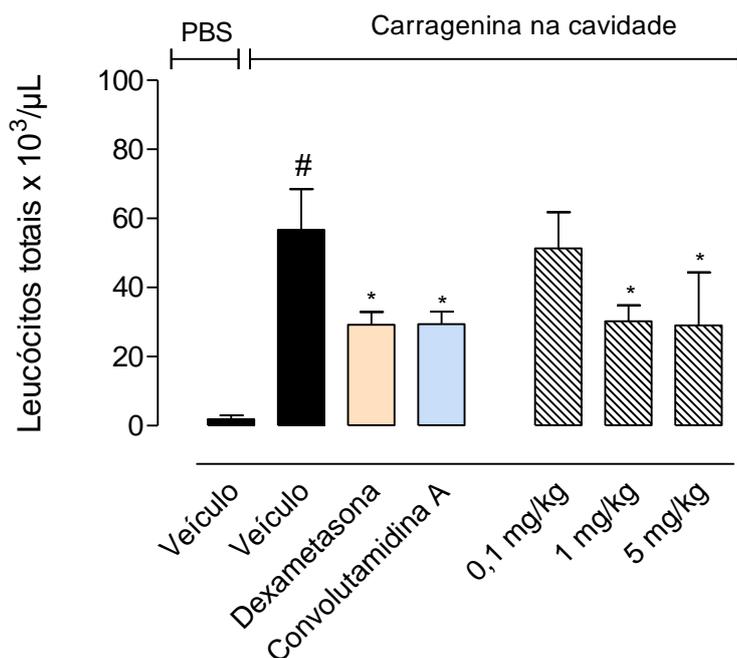


Gráfico 6: Efeito do análogo CM03 na migração de células induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou CM03 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente (i.p) com dexametasona (0,5 mg/kg), 30 minutos antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n=6-8$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com Dexametasona, Convolutamidina A ou CM03 e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com dexametasona, Convolutamidina A ou CM03 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

A fim de verificar se a redução do número total de células da cavidade nos animais pré-tratados com os análogos CM02 e CM03 era devido a uma ação tóxica dessas substâncias a nível da medula óssea ou a uma inibição da transmigração dessas células do sangue para a BAS, realizamos a contagem total de células do sangue e na medula de animais pré-tratados com ambos os análogos na dose de 10 mg/kg, o dobro da dose máxima utilizada nos ensaios.

Nesse ensaio, não foram observadas diferenças na contagem total de células do sangue e medula entre os grupos pré-tratados com os análogos CM02 e CM03 e os respectivos controles (Gráficos 7 e 8).

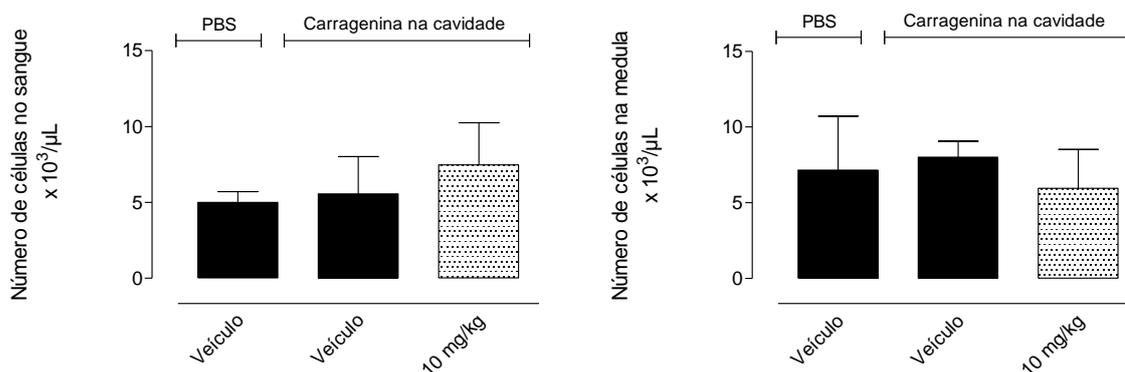


Gráfico 7: Contagem total de leucócitos do sangue e medula no pré-tratamento com CM02. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO) ou CM02 (10 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média ± D.P. do número de leucócitos totais (n=6-8).

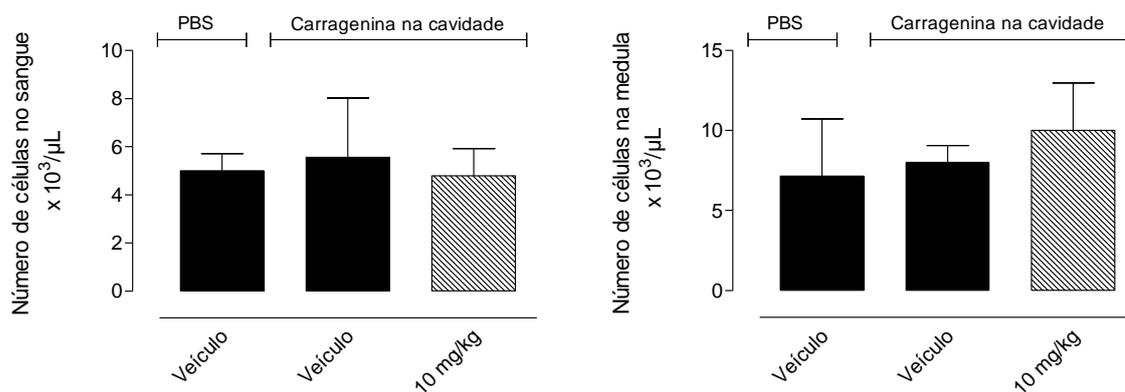


Gráfico 8: Contagem total de leucócitos do sangue e medula no pré-tratamento com CM03. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO) ou CM03 (10 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média ± D.P. do número de leucócitos totais (n=6-8).

Com o intuito de avaliarmos se os análogos CM02 e CM03 ainda apresentariam efeito significativo após administração por outras vias, ambos os análogos foram administrados e também avaliados após injeção pelas vias intraperitoneal e local (na BAS), na dose de 5 mg/kg.

Apesar do CM02 ter mostrado significativo efeito após sua administração oral (gráfico 5), a administração intraperitoneal ou diretamente na BAS (local) não causou qualquer redução significativa no número de células que migraram para a BAS (gráfico 9).

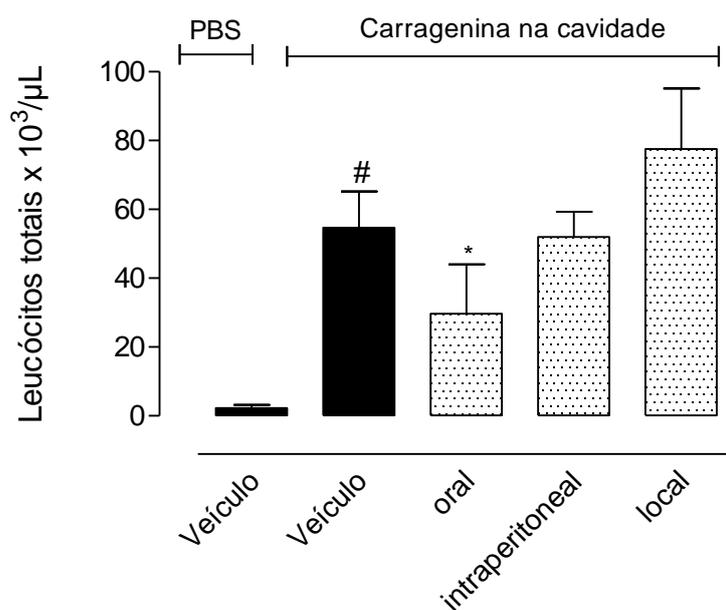


Gráfico 9: Efeito do análogo CM02 na migração de células induzida por carragenina na BAS quando administrado pelas vias oral, intraperitoneal e local. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO) ou CM02 (5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados intraperitonealmente ou localmente (na BAS) com CM02 (5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção da carragenina. Os resultados são expressos como Média ± D.P. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n=6-8$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM02 e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na BAS.

Com o análogo CM03 (gráfico 10) observamos o mesmo perfil. O pré-tratamento dos animais por via intraperitoneal ou local não ocasionou redução do número total de células coletados da BAS.

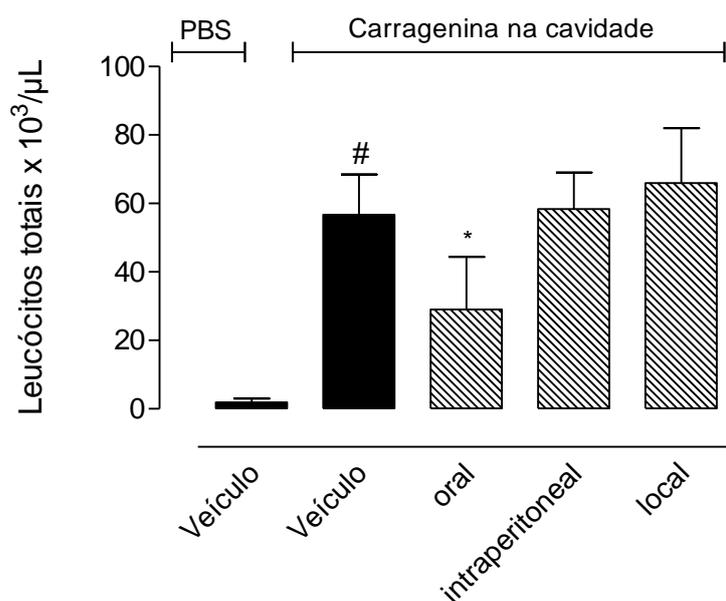


Gráfico 10: Efeito do análogo CM03 na migração de células induzida por carragenina na BAS quando administrado pelas vias oral, intraperitoneal e local. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO) ou CM03 (5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados intraperitonealmente ou localmente (na BAS) com CM03 (5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção da carragenina. Os resultados são expressos como Média ± D.P. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n=6-8$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM03 e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM03 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na BAS.

4.3.2 Quantificação de proteínas Totais

Um dos eventos que ocorre durante o processo inflamatório é o aumento da permeabilidade vascular, resultado da liberação de mediadores inflamatórios no local da injúria. Esse aumento da permeabilidade vascular resulta no extravasamento de proteínas (Alessandri e cols., 2013). Com isso, o segundo parâmetro avaliado no modelo de inflamação

aguda da BAS foi a quantificação de proteínas totais no exsudato coletado da cavidade 24 horas após a injeção de carragenina.

No gráfico 11, o grupo de animais que foi pré-tratado com veículo e recebeu a injeção de PBS na BAS apresentou $18,7 \pm 10,6$ $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totais. No exsudato inflamatório da BAS dos animais que receberam veículo (v.o.) e a injeção de carragenina, foram quantificadas $343,2 \pm 49,3$ $\mu\text{g/ml}$ de proteínas. Os animais pré-tratados com dexametasona apresentaram $157,4 \pm 15,1$ $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totais, uma inibição de 54,1%. E o grupo pré-tratado com a Convolutamidina A (10 mg/kg) apresentou $156,6 \pm 29,7$ $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totais, com inibição de 54,4%. Já os grupos que receberam CM02 nas doses de 0,1, 1 e 5 mg/kg apresentaram uma redução maior que 50% na quantificação de proteínas totais em todas as doses testadas ($131,3 \pm 61,1$ $\mu\text{g/ml}$, $118,4 \pm 66,8$ $\mu\text{g/ml}$ e $172,7 \pm 70,5$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), com inibição de 61,7% na dose de 0,1 mg/kg, 65,5% para a dose de 1 mg/kg e 49,7% na dose de 5 mg/kg. Nos animais que receberam CM03, ocorreu uma diminuição na quantidade de proteínas totais do exsudato no pré-tratamento com as doses de 1 e 5 mg/kg, apresentando uma redução de 60,8% ($116,5 \pm 21,4$ $\mu\text{g/ml}$) e 64,1% ($106,8 \pm 41,3$ $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.

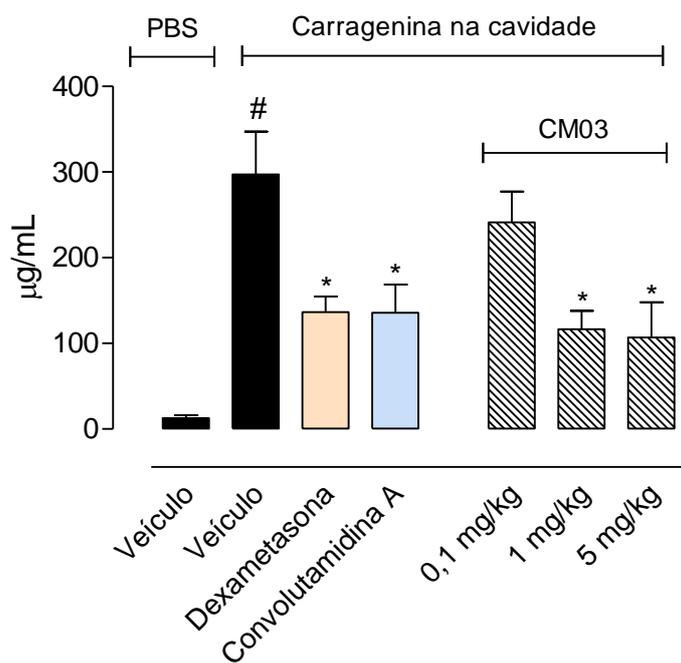
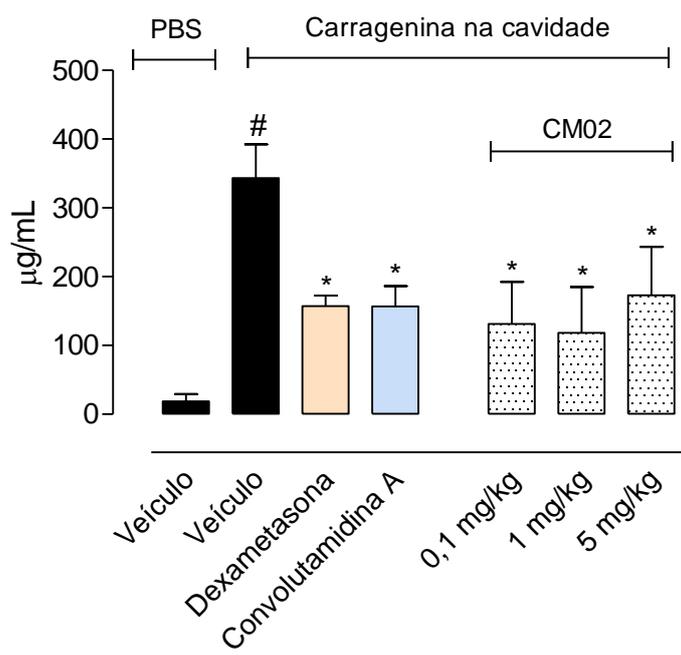


Gráfico 11: Efeito de CM02 e CM03 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10,0 mg/kg) ou com os análogos (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da concentração de proteínas

plasmáticas totais ($\mu\text{g/mL}$) ($n=6-8$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM02, CM03, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02, CM03, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

4.3.3 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um importante mediador produzido em grandes quantidades no processo inflamatório, onde desempenha diversas funções regulatórias (Rossi e cols., 2003). Com isso, buscamos verificar se o tratamento com os análogos da Convolutamidina A poderia influenciar de algum modo a sua produção nesse modelo de inflamação aguda.

No grupo injetado com PBS na cavidade e pré-tratado com veículo, a concentração de NO no exsudato coletado foi de $29,2 \pm 7,2 \mu\text{M}$, enquanto que no grupo injetado com carragenina e pré-tratado com veículo (v.o.) foi de $160,1 \pm 41,2 \mu\text{M}$. Nos animais que receberam Dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$) por via i.p., essa concentração foi de $70,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$, com uma inibição de 55,7% quando comparada aos grupos que receberam veículo (v.o.) e a injeção de carragenina. O pré-tratamento com a Convolutamidina A (10 mg/kg) também demonstrou uma redução de 50,2% na concentração de NO ($79,8 \pm 2,8 \mu\text{M}$). E os animais que foram pré-tratados com CM02, apresentaram uma diminuição de concentração de NO do exsudato somente na maior dose (5 mg/kg), com inibição de 53,4% ($74,6 \pm 11,9 \mu\text{M}$) (Gráfico 12).

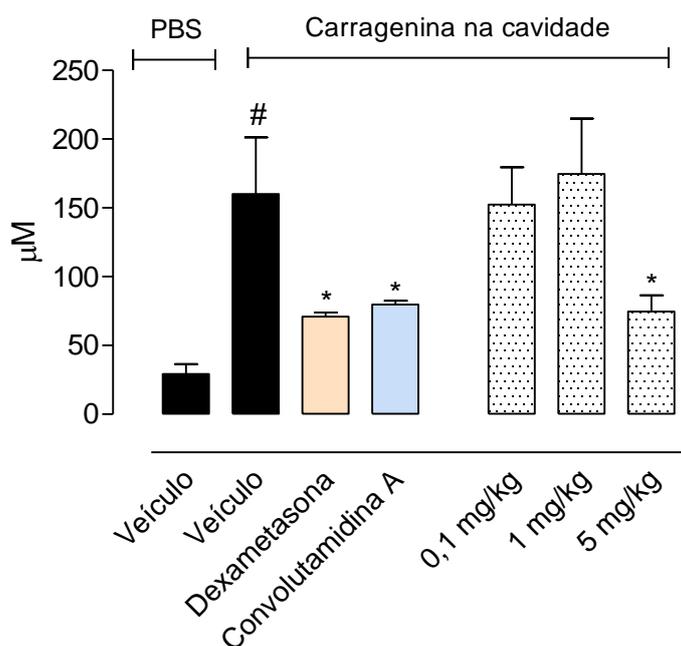


Gráfico 12: Efeito de CM02 na produção de óxido nítrico (NO) induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou com CM02 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona(0,5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da concentração de NO (μ M) (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM02, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

No gráfico 13, os dados mostram que os animais pré-tratados com CM03 demonstraram uma diminuição na concentração de NO no lavado da BAS em todas as 3 doses testadas (0,1, 1 e 5 mg/kg), com uma inibição de 45,6% para a dose de 0,1 mg/kg ($87,2 \pm 39,3$

μM), 61,7 % na dose de 1 mg/kg ($61,4 \pm 12,0 \mu\text{M}$) e 66,8% na dose de 5 mg/kg ($53,1 \pm 16,2 \mu\text{M}$).

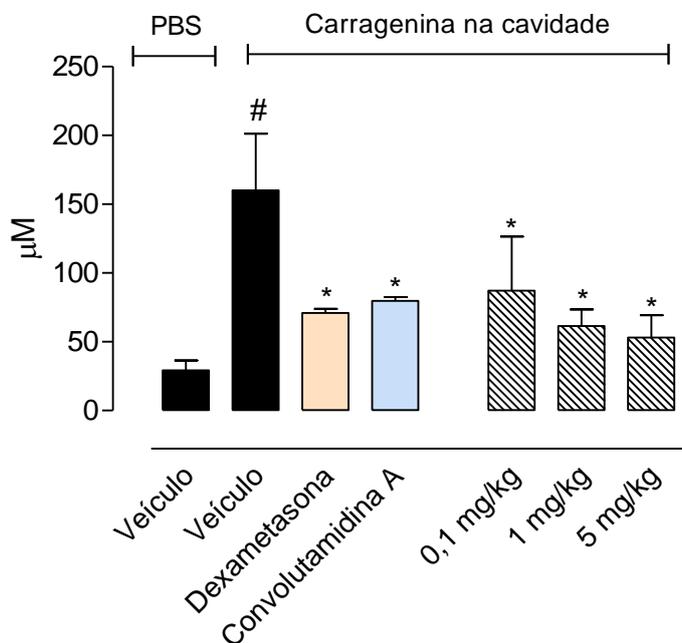


Gráfico 13: Efeito de CM03 na produção de óxido nítrico (NO) induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), Convolutamidina A (10 mg/kg) ou com CM03 (0,1, 1 e 5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da concentração de NO (μM) (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com CM03, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM03, Convolutamidina A ou dexametasona e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

4.3.4 Dosagem de citocinas (TNF- α e IL-1 β)

A evolução do processo inflamatório está relacionada com a produção de diversas citocinas, entre elas, o TNF- α e a IL-1 β (Turner e cols., 2014). Com isso, decidimos avaliar se os análogos CM02 e CM03 eram capazes de reduzir a expressão de algumas citocinas durante o processo inflamatório induzido pela carragenina.

No gráfico 14, podemos observar que nos animais pré-tratados com veículo e que receberam a injeção de carragenina na BAS a concentração de TNF- α no exsudato aumenta ($245,6 \pm 75,4$ pg/ml) quando comparada com a dos animais pré-tratados com veículo e que receberam PBS na cavidade ($2,4 \pm 5,3$ pg/ml). O pré-tratamento com CM02 (0,1, 1 e 5 mg/kg), no grupo injetado com carragenina na BAS, não alterou a concentração de TNF- α no exsudato inflamatório em nenhuma das 3 doses testadas. Com relação aos animais pré-tratados com CM03 e que receberam a injeção de carragenina na BAS, observamos uma redução da concentração de TNF- α no exsudato inflamatório coletado da cavidade nas doses de 1 e 5 mg/kg ($125,8 \pm 34,4$ pg/ml e $25,7 \pm 14,5$, respectivamente), com uma inibição de 48,8 % na dose de 1 mg/kg e 89,53% na dose de 5 mg/kg.

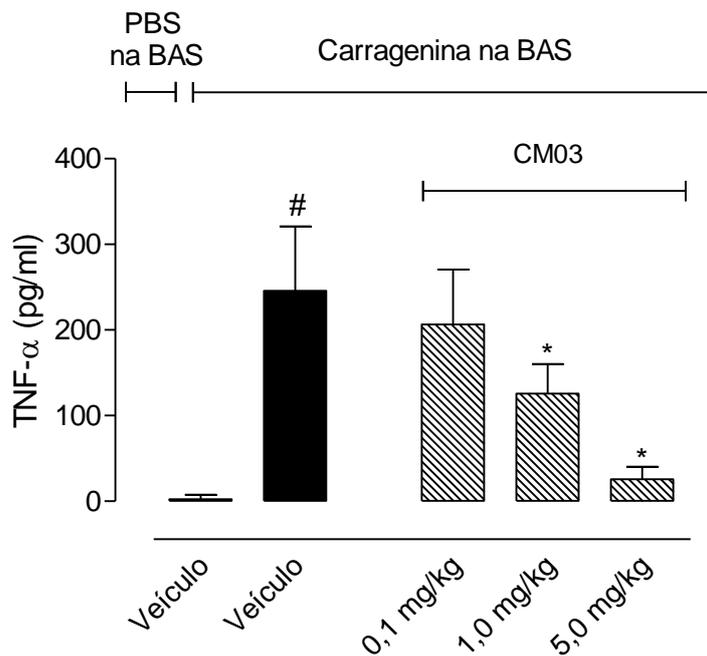
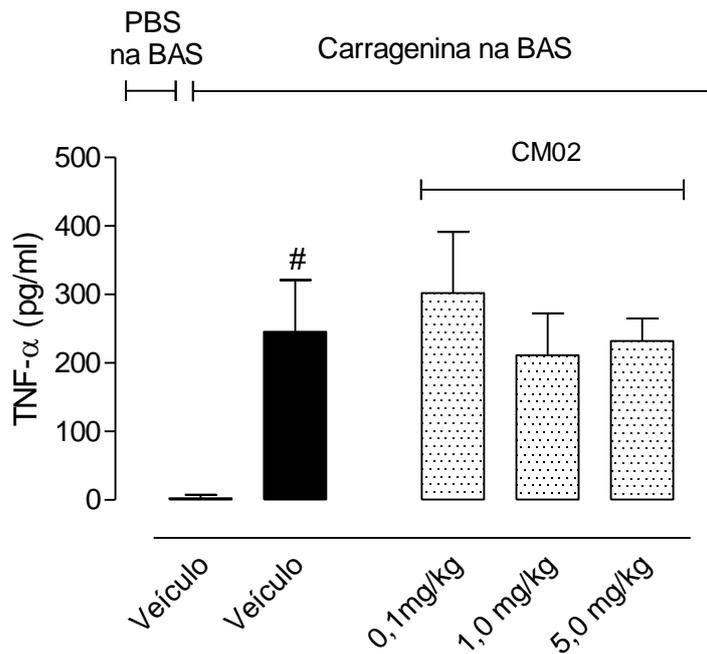


Gráfico 14: Efeito de CM02 e CM03 na produção de TNF- α induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), CM02 ou CM03 (0,1, 1 e 5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na cavidade. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da concentração de TNF- α (pg/mL) (n=6-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi

calculada entre os grupos tratados com osanálogos e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02 ou CM03 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

Com relação à produção de IL-1 β (gráfico 15), no grupo dos animais pré-tratados oralmente com veículo que recebeu a injeção de PBS na cavidade, quantificou-se $201,2 \pm 47,8$ pg/mL, enquanto no exsudato inflamatório da BAS dos animais tratados oralmente com veículo que receberam injeção de carragenina na cavidade, foram quantificadas $864,9 \pm 234,5$ pg/mL de IL-1 β . O pré-tratamento oral com CM02, nas doses de 0,1, 1 e 5 mg/kg, não foi capaz de reduzir significativamente a concentração de IL-1 β . Já o pré-tratamento oral com CM03 foi capaz de reduzir significativamente a concentração de IL-1 β nas doses de 1 e 5 mg/kg ($563,6 \pm 170,1$ pg/ml e $439,4 \pm 71,5$ pg/ml, respectivamente), apresentando uma inibição de 34,8% para a dose de 1 mg/kg e 49,2% para a dose de 5 mg/kg.

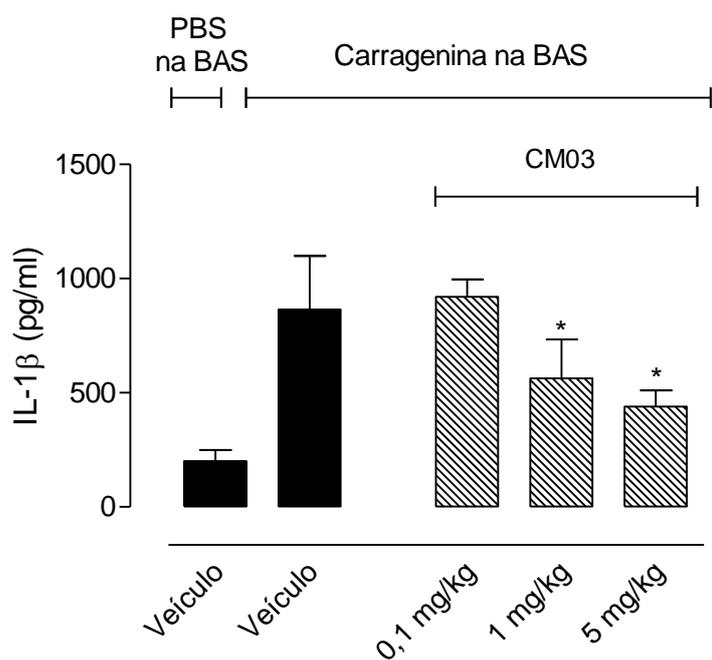
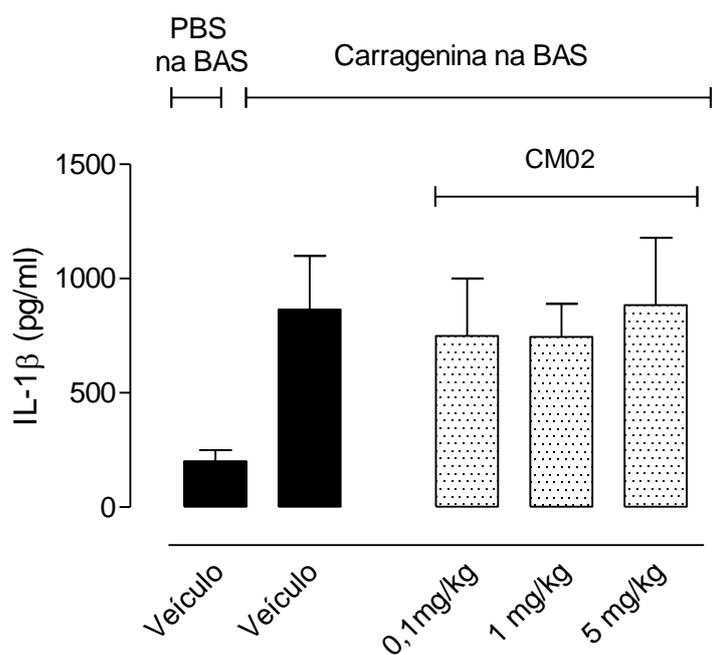


Gráfico 15: Efeito de CM02 e CM03 na produção de IL-1 β induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada + DMSO), CM02 ou CM03 (0,1, 1 e 5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na cavidade. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da concentração de IL-1 β (pg/mL) (n= 6-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os análogos e o veículo, por análise de variância (ANOVA)

seguida do pós-teste de Newman-Keuls. * quando comparados os grupos tratados com CM02 ou CM03 e o veículo (carragenina na BAS) e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

4.3.5 Dosagem de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) possuem um papel essencial na defesa do organismo e são geradas por fagócitos em resposta a um estímulo inflamatório (Noubade e cols., 2014). Devido a esse fato, decidimos avaliar se os análogos influenciavam de algum modo a geração de ROS.

De acordo com o gráfico 16, podemos observar que as células da BAS estimuladas com Forbol miristato acetato (PMA) que foram tratadas com convolutamidina A na concentração de 10 μ M apresentam uma maior produção de ROS quando comparadas com as células estimuladas com PMA que não receberam o tratamento (controle). No tratamento dessas células com o análogo CM02 não observamos diferenças significativas na geração de espécies reativas de oxigênio, ou seja, CM02 não interfere na geração de ROS.

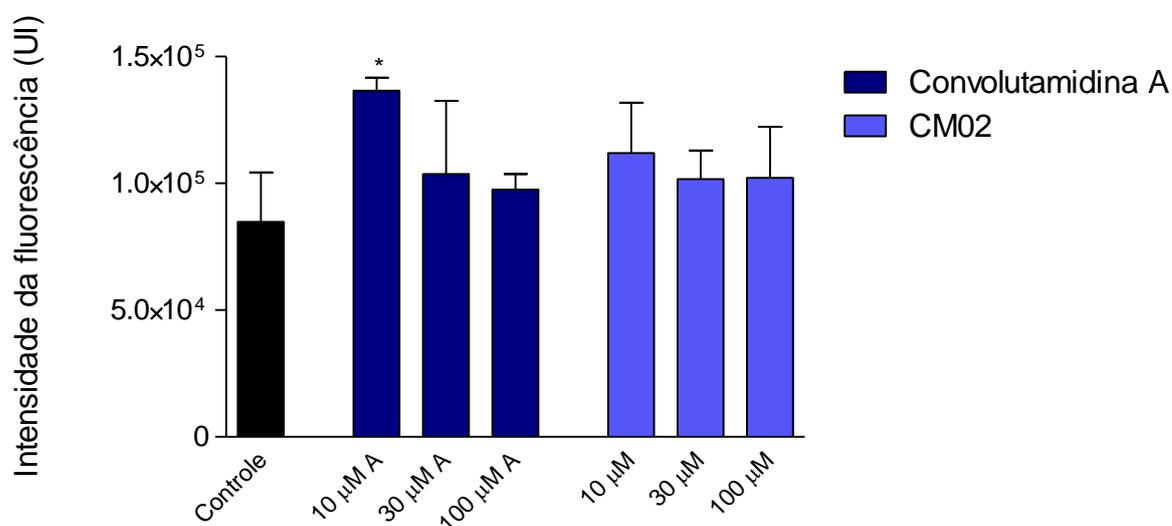


Gráfico16: Efeito de CM02 na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Células coletadas da BAS de animais previamente injetados com carragenina (1%) foram tratadas com CM02 (10, 30 ou 100 μ M) e estimuladas *ex vivo* com PMA. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da intensidade de fluorescência emitida (n=3). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o análogo CM02 ou Convolutamidina A e o controle, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Já no gráfico17, podemos observar que o tratamento das células coletadas da BAS com o análogo CM03 e estimuladas com PMA apresentam um aumento da geração de ROS em todas as concentrações testadas quando comparadas com as células estimuladas com PMA que não receberam tratamento (controle).

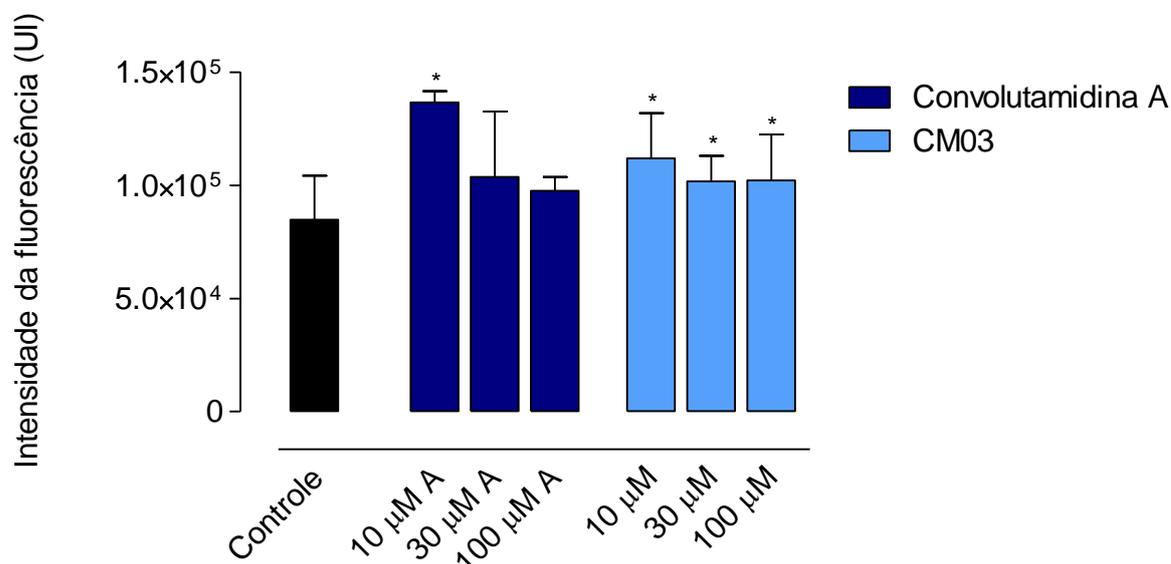


Gráfico17: Efeito de CM03 na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Células coletadas da BAS de animais previamente injetados com carragenina (1%) foram tratadas com CM03 (10, 30 ou

100 μM) e estimuladas *ex vivo* com PMA. Os resultados são expressos como Média \pm D.P. da intensidade de fluorescência emitida (n= 3). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o análogo CM03 ou Convolutamidina A e o controle, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

5. Discussão

A Convolutamidina A é uma substância que tem apresentado diversas atividades farmacológicas (Kamano e cols., 1995; Tokunaga e cols., 2001; Hewawasam e cols., 2002). Recentemente nosso grupo publicou artigos elucidando algumas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da convolutamidina A (Figueiredo e cols., 2013; Fernandes e cols., 2014). Devido a esse fato e também a facilidade de síntese, dois novos análogos foram sintetizados pelo grupo dos professores Bárbara Vasconcellos da Silva e Ângelo da Cunha Pinto, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o CM02 (5-cloro-*N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol) e o CM03 (5-bromo-*N*-morfolina-3-hidroxi-2-oxindol), com o objetivo de avaliar novas substâncias que pudessem ter promissoras atividades farmacológicas.

A partir da síntese dessas substâncias, foi realizada a avaliação de uma possível ação antinociceptiva e/ou anti-inflamatória desses dois novos análogos utilizando o modelo da lambadura de pata induzida pela formalina. A injeção subcutânea de formalina evoca uma resposta dolorosa bifásica. A primeira fase, que dura em torno de 5 minutos e se inicia logo após a injeção de formalina, é atribuída à ativação de neurônios aferentes primários. Essa ativação é decorrente da ação direta da formalina nos nociceptores e também da atuação de mediadores como a bradicinina, histamina e serotonina, liberados de mastócitos a partir da injúria local ocasionada pela aplicação de formalina. A segunda fase, por sua vez, se inicia 15 minutos após a injeção de formalina e dura em torno de 15 minutos. Essa etapa tem sido atribuída aos efeitos combinados da sensibilização de neurônios periféricos e da medula espinhal, através da liberação de mediadores inflamatórios e algésicos, tais como, histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina, dentre outros (Parada e cols., 2001; Fischer e cols., 2014).

No presente trabalho, tanto o análogo CM02 como o CM03 foram capazes de reduzir significativamente o tempo de lambertura na primeira e na segunda fase do modelo. A atividade antinociceptiva de ambos os análogos, verificada através da inibição da primeira fase, pode ser devido a uma ação direta dos análogos nos nociceptores existentes na pata dos animais, impedindo assim a sua ativação pela formalina e/ou pelos mediadores liberados localmente após a injúria tecidual. Já a atividade anti-inflamatória, constatada pela inibição da segunda fase, pode estar sendo ocasionada pela inibição da síntese e/ou liberação de mediadores pró-inflamatórios, ou mesmo bloqueando seus receptores.

A partir dos resultados apresentados no modelo da lambertura de pata induzida pela formalina que sugere uma atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos análogos, decidimos realizar outro modelo, que conta com a participação de um estímulo inflamatório e possui uma maior escala temporal, o que nos permite verificar o perfil de ação das substâncias ao longo do tempo, esse modelo foi o da hiperalgisia térmica induzida pela carragenina.

A injeção intraplantar de carragenina é um procedimento bem estabelecido que induz uma inflamação e hiperalgisia local (Loram e cols., 2007). O dano tecidual causado pela injeção de carragenina é um fenômeno que envolve a ativação diferentes vias e liberação de diversos mediadores que produzirão a hiperalgisia inflamatória. Sabe-se que alguns mediadores estão envolvidos, como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (p. ex., prostaglandinas, leucotrienos), conteúdo de mastócitos (histamina), citocinas (TNF- α , IL-1 β) e o óxido nítrico (NO) (Sammons e cols., 2000).

Na última década, estudos tem demonstrado que a injeção de carragenina causa uma hiperalgisia inflamatória que é iniciada através de uma cascata de citocinas. A administração de carragenina estimula a liberação de TNF- α , que ao interagir com seu receptor promove a liberação de IL-1 β , que por sua vez, desencadeia a liberação de prostanoídes, um dos

principais mediadores envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Esse mediador, ativa vias com segundos mensageiros responsáveis pela redução do limiar de excitabilidade dos nociceptores e aumento da excitabilidade neuronal (Cunha e cols., 2005).

Nossos resultados demonstram que a administração de ambos os análogos é capaz de inibir a hiperalgesia térmica em um período de 6 horas e até 24 horas após as suas administrações, um efeito que se mostra prolongado ao compararmos com o efeito da Convolutamidina A, observado até a 4^a hora. A inibição da hiperalgesia térmica por CM02 e CM03 pode estar ocorrendo através da inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias, ou podemos sugerir uma inibição da liberação de mediadores advindos das ações dessas citocinas, como é o caso dos prostanoídes. Há ainda a possibilidade dos análogos estarem atuando diretamente nos receptores desses mediadores. Borgi e cols. (2013) demonstraram, no modelo da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina, que o tratamento dos camundongos com a Vintexina, um flavonoide com propriedades anti-inflamatórias, reduz a hiperalgesia ao estímulo térmico através da diminuição dos níveis de citocinas como o TNF- α e a IL-1 β na pata dos animais. Nesse contexto, podemos supor que CM02 e CM03 estejam interferindo em um ou mais pontos da cascata de citocinas, e assim, impedindo a liberação de mediadores envolvidos na redução do limiar dos nociceptores e a consequente hiperalgesia ao estímulo térmico.

Como observamos que ambos os análogos indicavam ter um efeito anti-inflamatório, decidimos avaliar o padrão anti-inflamatório dessas substâncias no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS). A BAS é um modelo conveniente para se estudar a inflamação aguda e avaliar o mecanismo de ação através da análise de parâmetros inflamatórios como infiltração celular, extravasamento de proteínas e produção de mediadores inflamatórios. A injeção de ar no dorso dos animais forma uma membrana com características similares à membrana

sinovial, e com a injeção de carragenina ocorrerá a indução de uma inflamação e a bolsa de ar irá servir como um reservatório de células e mediadores que podem ser quantificados no fluido que se acumula localmente (Shin e cols., 2009; Guerra e cols., 2011).

Durante as primeiras horas após a injeção de carragenina os neutrófilos são as principais células a serem recrutadas para o local da inflamação. Após algumas horas, macrófagos e linfócitos também chegam ao local e desempenham um importante papel na evolução da inflamação ao produzirem e liberarem citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β (Di Rosa, 1972).

Ambos os análogos foram capazes de reduzir a migração leucocitária para a cavidade. O análogo CM02, já na menor dose testada (0,1 mg/kg) foi capaz de reduzir, de modo significativo, a quantidade de leucócitos que migraram para a BAS. E para o análogo CM03, essa redução foi significativa a partir da dose de 1 mg/kg.

Depois de descartarmos a hipótese de que os análogos poderiam causar mielotoxicidade ou inibição na transmigração sangue-tecido, decidimos verificar como os análogos poderiam estar atuando na redução da migração dos leucócitos para a BAS. Com isso, o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios considerados quimiotáticos foi estudado. Neste contexto, os primeiros mediadores avaliados foram as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β .

O TNF- α é uma citocina considerada essencial na resposta imune inata, devido ao seu papel em iniciar a cascata de citocinas no processo inflamatório. Além disso, ele é capaz de influenciar na expressão de moléculas de adesão e promover a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos. Enquanto que a interleucina-1 β , promove também a expressão de moléculas de adesão, migração leucocitária e aumento da permeabilidade vascular (Guerra e cols., 2011; Turner e cols., 2014). Nossos resultados demonstraram que a injeção de carragenina na BAS

foi capaz de promover um aumento significativo na concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato quando comparada aos animais que receberam somente a injeção de PBS. O análogo CM02 não demonstrou redução da produção dessas citocinas, enquanto que CM03 inibiu os níveis tanto de TNF- α quanto de IL-1 β nas doses de 1 e 5 mg/kg. Portanto, a inibição da migração leucocitária observada nesse ensaio para o análogo CM03 pode estar relacionada com a redução dos níveis dessas citocinas quimioatraentes. Nossos resultados estão de acordo com os relatados de Fröde e colaboradores (2001) que observaram em ratos, no modelo de pleurite induzida por carragenina, que o pré-tratamento dos animais com anticorpos para TNF- α e IL-1 β reduzem a infiltração de neutrófilos e que essas citocinas tem um papel importante na regulação da migração celular na inflamação induzida pela carragenina. Para CM02 outro mecanismo parece estar envolvido. Apesar dos análogos apresentarem uma semelhança estrutural, podemos perceber que eles possuem perfis de ação distintos.

Durante a inflamação, citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β estimulam a expressão da óxido nítrico sintase induzida (NOSi) em vários tipos celulares. A enzima NOSi ativada irá produzir grandes concentrações de óxido nítrico (NO), que dentre diversas funções, está envolvido com o rolamento de leucócitos, vasodilatação, ações citotóxicas e pró-inflamatórias (Moncada e cols., 1991; Mahat e cols., 2010; Niedbala e cols., 2011). Portanto, a investigação da produção de NO, o bioproduto da atividade da NOSi, foi mais um dos parâmetros avaliados. A concentração de NO no exsudato da BAS dos animais pré-tratados com CM03 apresentou uma diminuição significativa em todas as doses testadas, corroborando com os resultados vistos anteriormente para a produção de citocinas. Para CM02, apesar de não ter ocorrido uma redução na concentração de citocinas no exsudato, houve uma diminuição da concentração de NO na maior dose testada, o que sugere uma ação anti-inflamatória desse análogo, em parte, por meio da inibição da produção de NO.

A injeção de carragenina também desencadeia a liberação de mediadores como histamina, bradicinina e prostaglandinas que, dentre outras funções, estão envolvidos com o aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de líquido rico em proteínas, alterações que são vistas na fase inicial do processo inflamatório (Di Rosa, 1972; Lapa e cols., 2012). Assim, resolvemos quantificar a concentração de proteínas do exsudato da BAS. O análogo CM02 foi capaz de reduzir o extravasamento de proteínas em todas as doses testadas e CM03 nas doses de 1 e 5 mg/kg. Tais resultados refletem mais uma vez a ação moduladora dos análogos na resposta inflamatória ao inibir mais um parâmetro observado na inflamação aguda. Essa inibição do extravasamento de proteínas pode ser devido a uma redução de mediadores envolvidos na inflamação. Outra hipótese é que tanto CM02 como CM03 podem estar interagindo diretamente com receptores para estes mediadores (serotonina, bradicinina, histamina) bloqueando-os e impedindo que os agonistas ativem seus receptores, causando assim, a contração nas células endoteliais, com consequente aumento na permeabilidade vascular.

Nesse modelo, o análogo CM03 demonstrou redução de diversos aspectos da resposta inflamatória induzida pela carragenina, como diminuição da migração leucocitária, que parece estar envolvida com a redução da produção de citocinas como o TNF- α e IL-1 β e também com a redução da produção de NO, já que tais mediadores estão envolvidos com a expressão de moléculas de adesão e quimiotaxia de leucócitos. A redução de IL-1 β e NO corroboram com outro aspecto avaliado que foi o a diminuição do extravasamento de proteínas, uma vez que o NO possui ação vasodilatadora e a citocina IL-1 β é capaz de promover um aumento da permeabilidade vascular (Shin e cols., 2009; Guerra e cols., 2011).

Já o análogo CM02, demonstrou uma redução na migração leucocitária e no extravasamento de proteínas para o exsudato, que parecem estar envolvidos em parte com a

redução da produção de NO. O análogo não atuou na redução de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β , contudo a diminuição de outros mediadores inflamatórios como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, dentre outros, também podem estar envolvidos, o que se faz necessários nossos ensaios para investigação da participação de outros mediadores no mecanismo de ação.

Demonstrada a ação anti-inflamatória dos análogos CM02 e CM03 no modelo da BAS, decidimos investigar a atuação de CM02 e CM03 na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em leucócitos coletados da BAS, já que a geração de ROS está aumentada durante o processo inflamatório (Rosanna e Salvatore, 2012).

As ROS são reconhecidas por desempenharem um papel dual no contexto da inflamação como produtos benéficos e prejudiciais. O controle temporal da produção de ROS que irá determinar se elas atuarão como agentes pró- ou anti-inflamatórios. As espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular normal e participam da manutenção da homeostase celular. Durante o processo inflamatório o recrutamento de leucócitos para o local da injúria leva a um processo chamado de “estresse oxidativo”, ocasionado pelo aumento do consumo de oxigênio, levando a geração e acumulação de ROS. Dentre diversas funções, as ROS constituem um mecanismo de defesa contra organismos invasores devido a sua atividade microbicida, estão envolvidas com o recrutamento de leucócitos, aumento da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios e podem ocasionar danos a proteínas, lipídios e ao DNA levando a morte celular (Rosanna e Salvatore, 2012; Alessandri e cols., 2013).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento *ex vivo* dos leucócitos com o análogo CM02 não causou alteração na produção de ROS pelas células. No entanto, quando as células foram tratadas com o análogo CM03, houve um aumento da produção de ROS. Este

dado pode ser devido à geração de espécies reativas de oxigênio por meio da oxidação da própria estrutura do análogo, já que o CM03 apresentou redução do processo inflamatório em todos os ensaios realizados.

Depois de avaliar o padrão anti-inflamatório dos análogos no modelo da BAS, resolvemos verificar o comportamento de CM02 e CM03 nesse mesmo modelo quando administrados por diferentes vias. Para isso, utilizamos a via oral, intraperitoneal e local. CM02 e CM03 somente foram ativos quando administrados pela via oral. A administração tanto pela via intraperitoneal como a injeção direta na BAS não causaram qualquer efeito. Estes dados são sugestivos de que, provavelmente, algum metabólito deve estar sendo formado após a administração oral. E este metabólito deve ser o responsável pelo efeito biológico observado.

Ambos os análogos da Convolutamidina A, CM02 e CM03, apresentaram efeitos sobre os fenômenos biológicos estudados. Contudo, em alguns ensaios nota-se uma diferença na ação dessas substâncias. Assim, levando em conta a diferença estrutural entre os análogos, podemos observar somente uma modificação no substituinte do carbono da posição 5, como mostra a figura 10.

O CM03, que possui o átomo de Bromo (-Br) ligado ao carbono 5, apresentou uma ação farmacológica maior, já que no modelo da BAS foi capaz de inibir todos os parâmetros inflamatórios avaliados. A ação maior desse análogo pode ser resultado de um melhor perfil farmacocinético. O átomo de bromo apresenta um maior raio atômico e possui uma maior lipossolubilidade. Estes fatores podem favorecer uma maior lipossolubilidade e aumento da biodisponibilidade, o que pode refletir em um melhor perfil farmacológico.

5. Conclusões

Após os ensaios farmacológicos com os análogos da Convolutamidina A CM02 e CM03, podemos concluir que ambos os análogos possuem efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios uma vez que:

- Reduziram o tempo de lambedura no modelo da lambedura de pata induzida pela formalina.
- Reduziram a hiperalgesia ao estímulo térmico induzida pela carragenina.
- Promoveram redução de diversos parâmetros avaliados no modelo da BAS.

O análogo CM02 desencadeou uma redução da quimiotaxia de leucócitos, do extravasamento de proteínas e da produção de NO. Enquanto que CM03 demonstrou redução da quimiotaxia de leucócitos, extravasamento de proteínas, produção de NO e citocinas como o TNF- α e IL-1 β .

Ambos os análogos foram ativos somente pela via oral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and Therapeutics**. 139: 189-212. 2013.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Med. Sci. Monit**. 12: 225-234. 2006.

BAYLIS, C. Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. **Experimental Gerontology**. 40:271-278. 2005.

BORGI, S. M.; CARVALHO, T. T.; STAURENGO-FERRARI, L.; HOHMANN, M. S. N.; PINGE-FILHO, P.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines. **Journal of Natural Products**. 76:1141-1149. 2013.

BOTTING, R. M.; Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane. **Journal of Thermal Biology**. 31: 208-219. 2006.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**. 104:58-66. 2013.

CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery**. 182: 558-562. 2001.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**. 102:1755-1760. 2005.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmac**. 24:89-102. 1972.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **TINS**. 16: 99-104. 1993.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 39:343:350. 2003.

FERNANDES, P.D.; ZARDO, R.S.; FIGUEIREDO, G.S.M., SILVA, B.V.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory properties of convolutamydine A and two structural analogues. **Life Sciences**. 116: 16-24 2014.

FIGUEIREDO, G.S.M.; ZARDO, R.S.; SILVA, B.V.; VIOLANTE, F.A.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Convolutamydine A and synthetic analogues have antinociceptive properties in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**. 103: 431-439. 2013.

FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain**. 155:511-521. 2014.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. 33: 829-837. 2012.

- FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF- α and IL-1 β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**. 13:162-168. 2001.
- GARDEN, S. J.; TORRES, J. C.; FERREIRA, A. A.; SILVA, R. B.; PINTO, A. C. A modified Sandmeyer methodology and the synthesis of (\pm) convolutamydine A. **Tetrahedron Lett**. 38: 1501-1504. 1997.
- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**. 14: 392-404. 2014.
- GOUGEROT-POCIDALO, M. A. The neutrophil and systemic inflammation. **Joint Bone Spine**. 79:2 09-211. 2012.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**. 126: 131-138. 1982.
- GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J. N.; LARANJEIRA, L. P. M.; MAIA, M. B. S.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. 11:1816-1822. 2011.
- HATA, A. N., BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology and Therapeutics**. 103: 147-166. 2004.
- HEWAWASAM, P.; ERWAY, M.; MOON, S.L.; KNIPPE, J.; WEINER, H.; BLOSSARD, C.G.; POST-MUNSON, D. J.; GAO, Q.; HUANG, S.; GRIBKOFF, V. K.; MEANWELL, N.A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3-Aryloxindoles: A New Class of Calcium-Dependent, Large Conductance Potassium (Maxi-K) Channel Openers with Neuroprotective Properties **J. Med. Chem**. 45: 487-1499. 2002.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. 30: 103-114. 1987.
- KAMANO, Y.; ZHANG, H-P.; ICHIHARA, Y.; KIZU, H.; KOMIYAMA, K.; PETTIT, G.R. Convolutamydine A, a novel bioactive hydroxyindole alkaloid from marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Tetrahedron Lett**. 36: 2783-2787. 1995.
- KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol**. 109:195-209. 2002.
- KATSUYAMA, M. NOX/NADPH Oxidase, the Superoxide-Generating Enzyme: Its Transcriptional Regulation and Physiological Roles. **Journal of Pharmacological Sciences**. 114:134-146. 2010.
- LAPA, F. R.; SILVA, M. D.; CABRINI, D. A.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A₂ receptors. **Purinergic Signalling**. 8:693-704. 2012.

- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 2: 787-795. 2002.
- LORAM, L. C.; FULLER, A. FICK, L. G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **The Journal of Pain**. 8:127-136. 2007.
- MACGLASHAN, D. Histamine: A mediator of inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** 112: 53-59. 2003.
- MAHAT, M.Y.A.; KULKARNI, N.M.; VISHWAKARMA, S.L.; KHAN, F. R.; THIPPESWAMY, B.S.; HEBBALLI, V.; ADHYAPAK, A. A.; BENADE, V.S.; ASHFAQUE, S. M.; TUBACHI, S.; PATIL, B. M. Modulation of cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. **European Journal of Pharmacology**. 642: 169-176. 2010.
- MAHDY, A.M.; WEBSTER, N.R. Histamine and antihistamines. **Pharmacology**. 15: 250-255. 2014.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. 140: 771-776. 2010.
- MONACO, J. L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing. An overview. **Clin. Plastic Surg.** 30: 1-12. 2003.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142. 1991.
- MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**. 74:709-721. 2003.
- MULLER, W. A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 6: 323-44. 2011.
- NIEDEBALA, W.; ALVES-FILHO, J. C.; FUKADA, S. Y.; VIEIRA, S. M.; MITANI, A.; SONEGO, F.; MIRCHANDANI, A.; NASCIMENTO, D. C.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. **PNAS**. 108:9220-9225. 2011.
- NOUBADE, R.; WONG, K.; OTA, N.; RUTZ, S.; EIDENSCHENK, C.; VALDEZ, P.A.; DING, J.; PENG, I.; SEBRELL, A.; CAPLAZI, P.; DEVOSS, J.; SORIANO, R.H.; SAI, T.; LU, R.; MODRUSAN, Z.; HACKNEY, J.; OUYANG, W. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. **Nature**. 509: 235-239. 2014.
- NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **CellPress**. 41: 694-707. 2014.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. 102:937-944. 2001.

PETTERSEN, C. A.; ADLER, K. B. Airways inflammation and COPD. Epithelial-Neutrophil Interactions. **Chest**. 121: 142S-150S. 2002.

POPP, F.D.; PARSON, R.; DONIGAN, B.E. Synthesis of potential anticonvulsants, condensations of isatins with acetone and related ketones. **J Pharmacol Sci**. 69:1235-1239. 1980.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; Di SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor. **Mediators Inflamm**. 6: 32-38. 1997.

ROSANNA, D.; SALVATORE, C. Reactive Oxygen Species, Inflammation, and Lung Diseases. **Current Pharmaceutical Design**. 18:3889-3900. 2012.

ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; DE LOO, F.A.J.V.; DI ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. **Life Sci**. 72: 1199-1208. 2003.

SAMMONS, M.J., RAVAL, P., DAVEY, P. T., ROGERS, D., PARSONS, A. A; BINGHAM, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Research**. 876: 48-54. 2000.

SATO, A.; EBINA, K. Common mechanism in endothelin-3 and PAF receptor function for anti-inflammatory responses. **European Journal of Pharmacology**. 718:30-33. 2013.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**. 18: 385-405. 2004.

SHIN, S.; JEON, J. H.; PARK, D.; JANG, J. Y.; JOO, S. S.; HWANG, B.Y.; CHOE, S.Y.; KIM, Y. Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Angelica gigas* in a carrageenan air pouch inflammation model. **Exp. Anim**. 58: 431-436. 2009.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**. 361:184-187. 2004.

SRIVASTAVA, N., GONUGUNTA, V.K., PULI, M.R., RAGHAVENDRA, A.S. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**. 229: 757-765. 2009.

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**. 50:3 5-51. 2011.

SZABÓ, C. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide in Inflammation. In: IGNARRO, L. J. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Massachusetts: Academic Press, 2000. p. 841-872.

TOKUNAGA, T.; HUME, W.E.; UMEZOME, T.; OKAZAKI, K.; UEKI, Y.; KUMAGAI, K.; HOURAI, S.; NAGAMINE, J.; SEIKI, H.; TAJI, M.; NOGUCHI, H.; NAGATA, R. Oxindole Derivatives as Orally Active Potent Growth Hormone Secretagogues. **J. Med. Chem.** 44: 4641-4649. 2001.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1843: 2563-2582. 2014.

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

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Exp. Ther. Pharm.** 80: 523-527. 2002.

YANG, S.; YANG, A.; SU, S.; WANG, H.; WANG, N.; CHEN, Q. Neuronostatin induces hiperalgesia in formalin test in mice. **Neuroscience Letters**. 506: 126-130. 2012.