



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

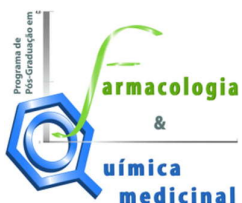
QUÍMICA MEDICINAL

**PERFIL FARMACOLÓGICO DE TRÊS
NOVOS ANÁLOGOS DA
CONVOLUTAMIDINA A**

YÁSKARA LESSA LISBÔA BALLARD

RIO DE JANEIRO

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

**PERFIL FARMACOLÓGICO DE TRÊS
NOVOS ANÁLOGOS DA
CONVOLUTAMIDINA A**

YÁSKARA LESSA LISBÔA BALLARD

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

Janeiro de 2013

PERFIL FARMACOLÓGICO DE TRÊS NOVOS ANÁLOGOS DA CONVOLUTAMIDINA A

Yáskara Lessa Lisbôa Ballard

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. Ana Luisa Palhares de Miranda

Prof. Dra. Celuta Sales Alviano

Profa. Dra. Lígia Maria Torres Peçanha

Profa. Dra. Cláudia Lúcia Martins Silva (Revisora)

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

**RIO DE JANEIRO
Janeiro de 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ballard, Yáskara Lessa Lisbôa.

Perfil Farmacológico de três novos análogos da Convolutamidina A/Yáskara Lessa Lisbôa Ballard. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2013.

xvii, 112f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 97-111.

1. Convolutamidina A. 2. Dor 3. Atividade antinociceptiva. 4. Inflamação. 5. Atividade anti-inflamatória. 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.

*“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.
Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida”*

S. Carey

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado a me ajudar.

À razão da minha vida, minha linda filha Sofia, por ser o meu maior incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao meu eterno amor Leonardo, por todo carinho e compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

À minha mãe Ivone e irmãs Aurimara e Waneska pelo companheirismo e orações constantes pela minha vida e ao meu saudoso pai Ademir. Amo vocês!

A toda minha família que de alguma forma torceu por mim e sempre esteve ao meu lado. Valeu cunhadinha Daiane!!!

Ao meu querido professor de inglês Thomas!!!

À minha secretária Gisele que muito me ajudou no decorrer desse trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes, meu especial agradecimento pela orientação que possibilitou meu crescimento como profissional e como pessoa. Você é para mim um exemplo de pessoa dedicada e determinada. Obrigada pela rigidez e incentivo constantes para busca de novos ensinamentos e principalmente, muito obrigada pela paciência com as minhas dúvidas e inseguranças.

Aos Profs. Dr. Ângelo da Cunha Pinto e Dra. Bárbara Vasconcellos Silva por terem me cedido as substâncias utilizadas neste trabalho.

Às Profas. Dra. Ana Luisa Palhares, Dra. Ligia Peçanha e Dra. Celuta Alviano e Daniela Alviano (suplente) pela participação na Banca Examinadora.

À Profa. Dra. Claudia Lúcia Martins Silva, pelas contribuições e zelo durante a revisão desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal que contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos de laboratório, Carol, Gabi, Fabiana, Flávia, Sthephane, Thays, Jorge e Alan, muito obrigada por tudo. Natália, Milena e Thaís, valeu meninas pelo companheirismo e amizade verdadeira que construímos no lab. À ex-aluna Renata Zardo por me ensinar e ajudar no desenvolvimento de vários experimentos, obrigada pela sua amizade. Profa. Dra. Mariana Martins Gomes Pinheiro, meu muito obrigada por várias orientações e disponibilidade nos momentos de dúvida. Obrigada a todos!!

A todos os funcionários do bloco J (Farmacologia).

Ao Instituto Vital Brazil pelos camundongos doados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelos auxílios financeiros concedidos ao laboratório.

RESUMO

Perfil farmacológico de três novos análogos da convolutamidina A

Yáskara Lessa Lisbôa Ballard.

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 atividade farmacológica de três derivados da convolutamidina A (ISA 160, ISA 161, ISA 162) foi avaliada em modelos algésimétricos (formalina, retirada de cauda e placa quente) e modelo inflamatório (bolsa de ar subcutânea [BAS]). Para investigar o(s) mecanismo(s) de ação antinociceptivo foram administrados naloxona, atropina (antagonistas opioide e muscarínico, respectivamente) ou L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) no modelo da formalina, bem como a administração intraplantar de glutamato e capsaicina.

No modelo da formalina, todas as ISAs inibiram significativamente o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada com formalina na 1ª (fase neurogênica) e 2ª fase (fase inflamatória), nas três doses testadas (0,1, 1 e 10 mg/kg). Os três derivados apresentaram efeito antinociceptivo central espinhal (teste da retirada de cauda), entretanto não demonstraram efeito antinociceptivo supra-espinhal (modelo da placa quente). No modelo da formalina, o pré-tratamento com atropina preveniu o efeito da ISA 161 na primeira fase e das ISAs 160 e 162 na segunda fase. O antagonista opioide, naloxona, preveniu o efeito antinociceptivo dos três derivados na primeira fase e das ISAs 160 e 162 na segunda fase. O L-NAME, preveniu o efeitos da ISA 161 em ambas as fases e da ISA 160 e 162 na segunda fase. Através do modelo da BAS, pode-se observar que apenas as ISAs 160 e 162 na dose de 1 mg/kg reduziram significativamente o extravasamento de proteínas totais. Além disso, a produção de TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico no exsudato da BAS foram reduzidas pelos três derivados.

Nossos dados sugerem que: 1) os três derivados possuem ação antinociceptiva periférica e espinhal, e atividade anti-inflamatória; 2) o mecanismo de ação parece envolver sistemas opioide, colinérgico, nitrérgico, glutamatérgico bem como uma possível ativação de receptores TRPV1; 3) o efeito anti-inflamatório apresentado pelos derivados pode estar relacionado à inibição da migração de leucócitos, extravasamento de proteínas plasmáticas, bem como redução na produção de citocinas e NO.

Palavras-chave: Convolutamidina A; dor; atividade antinociceptiva; inflamação; atividade anti-inflamatória.

Rio de Janeiro
Janeiro de 2013

ABSTRACT

Pharmacological profile of three new analogs of Convolutamydine A

Yáskara Lessa Lisboa Ballard.

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Abstract 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.

The pharmacological activity of three derivatives of the convolutamydine A (ISA 160, ISA 161 and ISA 162) was evaluated in analgesic models (formalin, tail flick and hot plate) and inflammatory model (subcutaneous air pouch - SAP). To investigate the antinociceptive mechanism(s) of action the pre-treatment with the naloxone, atropine (opioid and muscarinic antagonists, respectively) or L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) was performed as well as the administration of intraplantar glutamate and capsaicin.

In formalin model all ISAs, in doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg, significantly inhibited the time the animal spent licking the formalin injected paw, in 1st (neurogenic) and 2nd (inflammatory) phases. The three derivatives have a central-spinal antinociceptive effect (tail flick test), however they did not have a supraspinal central activity in hot plate model. In the formalin model, the pre-treatment with atropine inhibited the effect of ISA 161 in the 1st phase and the effects of 160 and 162 in the 2nd phase. The opioid antagonist naloxone, significantly prevented the antinociceptive effect of all three derivatives in the 1st phase and the effects of ISA 160 and 162 in the 2nd phase. L-NAME, prevented the effects of ISA 161 in both phases and the effects of ISA 160 and 162 in 2nd phase. In SAP model it could be observed that only ISA 160 e 162, in dose of 1 mg/kg, reduced protein extravasation. Furthermore, TNF- α , IL-1 β and NO production, in the SAP exudate was also reduced by the three derivatives.

Our results suggest that: 1) the three derivatives have peripheric and spinal antinociceptive and anti-inflammatory action; 2) the mechanism of action appears to involve opioid, cholinergic, nitrergic and glutamatergic systems, as well as a possible activation of the TRPV1 receptors; 3) the anti-inflammatory effect presented by the derivatives may be related to inhibition of leukocyte migration, extravasation of plasma proteins, as well as reduction of cytokines and NO production.

Key words: Convolutamydine A; pain, antinociceptive activity; anti-inflammatory activity.

**Rio de Janeiro
Janeiro de 2013**

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Esquemas.....	XII
Lista de Gráficos.....	XII
Abreviaturas.....	XIV
1- Introdução.....	1
1.1. Convolutamidina A	2
1.2. Dor.....	3
1.2.1 Mecanismo de transmissão da dor	5
1.2.2 Mecanismo de controle endógeno da dor	8
1.2.3 Sistema opioide e analgesia	9
1.2.4 Sistema colinérgico e analgesia	10
1.2.5 Glutamato	11
1.3. Processo Inflamatório.....	13
1.3.1. Eventos vasculares.....	15
1.3.2. Células do processo inflamatório.....	16
1.3.3. Mediadores químicos inflamatórios.....	17
1.3.3.4 Mediadores lipídicos	19
1.3.3.5 Óxido nítrico	22
1.3.3.6 Citocinas	23
1.3.4 Resolução do processo inflamatório	25
1.4 Considerações sobre fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.....	25
2- Objetivos.....	29
3- Material e Métodos.....	31
3.1. Derivados da Convolutamidina A.....	32
3.2. Reagentes.....	34
3.3. Preparo dos reagentes e soluções.....	34
3.4. Administração das ISAs 160, 161 e 162.....	37
3.5. Animais.....	37
3.6. Modelo da formalina.....	38
3.7. Modelo da retirada de cauda.....	39
3.8. Modelo da placa quente.....	41
3.9 Modelo da capsaicina	42
3.10 Modelo do glutamato	43
3.11 Avaliação do mecanismo de ação antinociceptivo	44
3.12. Modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS).....	44

3.13. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO).....	46
3.14. Quantificação de proteínas	46
3.15. Dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β	47
3.16. Análise estatística.....	47
4- Resultados	48
4.1. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos análogos da convolutamidina A no modelo da formalina.....	49
4.2 Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de retirada de cauda.....	52
4.3.Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo da placa quente.....	59
4.4 Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	61
4.5 Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de nocicepção induzida pela injeção de glutamato.....	63
4.6 Investigação do mecanismo de ação antinociceptivo	65
4.6.1 Investigação do sistema opioide	65
4.6.2 Investigação do sistema colinérgico	66
4.6.3 Investigação do sistema nitrérgico	68
4.7. Efeito anti-inflamatório no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS).....	69
4.7.1 Contagem total de células.....	69
4.7.2 Quantificação de proteínas totais.....	72
4.7.3 Quantificação do óxido nítrico (NO).....	74
4.7.4 Dosagem de citocinas TNF- α , e IL-1 β	76
5- Discussão	79
6- Conclusões	94
7- Referências Bibliográficas	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula molecular da convolutamidina A; briozoário marinho <i>Amathia Convoluta</i>	2
Figura 2- Organização laminar do corno dorsal da medula espinhal.....	7
Figura 3- Via nociceptiva.....	7
Figura 4- Mecanismo de rolamento, aderência e diapedese dos neutrófilos.....	15
Figura 5- Metabolismo do ácido araquidônico.....	20
Figura 6- Estrutura da convolutamidina A.....	32
Figura 7- Representação do cálculo da ASC	40
Figura 8- Estrutura dos derivados da convolutamidina A	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Posições dos substituintes dos derivados da convolutamidina A	33
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Rota sintética utilizada para preparação da convolutamidina A.....	33
Esquema 2- Protocolo modelo da formalina	38
Esquema 3- Protocolo do modelo de retirada de cauda.....	40
Esquema 4- Protocolo do modelo da placa quente.....	41
Esquema 5- Protocolo nocicepção induzida por capsaicina.....	42
Esquema 6- Protocolo nocicepção induzida por glutamato.....	43
Esquema 7- Protocolo do modelo da bolsa de ar subcutânea.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito das ISAs no modelo da formalina – fase I	50
Gráfico 2 - Efeito das ISAs no modelo da formalina – fase II	51
Gráfico 3 – Efeito da ISA 160 no modelo de retirada de cauda.....	53
Gráfico 4 - Efeito da ISA 160 no modelo de retirada de cauda - ASC.....	54
Gráfico 5 - Efeito da ISA 161 no modelo de retirada de cauda.....	55
Gráfico 6 - Efeito da ISA 161 no modelo de retirada de cauda – ASC.....	56
Gráfico 7 - Efeito da ISA 162 no modelo de retirada de cauda	57
Gráfico 8 - Efeito da ISA 162 no modelo de retirada de cauda – ASC.....	58
Gráfico 9 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da placa quente.....	60
Gráfico 10 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo de nocicepção induzida por capsaicina.....	62
Gráfico 11 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da nocicepção induzida por glutamato.....	64
Gráfico 12 - Investigação da participação do sistema opioide	66
Gráfico 13 - Investigação da participação do sistema colinérgico	67
Gráfico 14 - Investigação da participação do sistema nitrérgico	68
Gráfico 15 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na migração de células induzida por carragenina	70
Gráfico 16 - Contagem total de células do sangue e medula.....	71
Gráfico 17 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por carragenina	73
Gráfico 18 - Efeito das ISAs 160,161 e 162 na produção de óxido nítrico (NO) induzido por carragenina.....	75
Gráfico 19 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na produção de TNF- α	77
Gráfico 20 - Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na produção de IL-1 β	78

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPA	α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazoil ácido propiônico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
B1	Receptor de bradicinina tipo 1
B2	Receptor de bradicinina tipo 2
BAS	Bolsa de ar subcutânea
BK	Bradicinina
BSA	Albumina bovina sérica
C3a	Componente C3a do sistema complemento
C4a	Componente C4a do sistema complemento
C5a	Componente C5a do sistema complemento
CAUAP	Comissão de avaliação de uso de animais em pesquisa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação animal
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
COX-3	Ciclo-oxigenase-3
CC	Quimiocinas do subgrupo CC
CXC	Quimiocinas do subgrupo CXC
cyPGS	Ciclopentanonas prostaglandinas
Cys	Cisteína
d.p.	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FLA2	Fosfolipase A2
Glut	Glutamato
GMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
HETE_s	Ácidos hidroxiieicosatetraenóicos
HIS	Histamina
HPETE_s	Ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para estudo da dor
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1

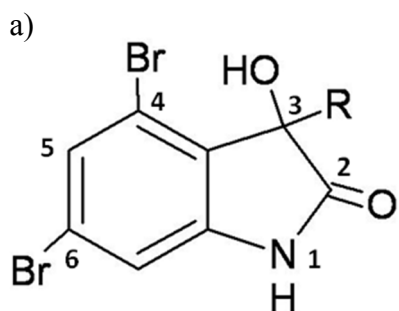
IFNs	Interferons
IFN-α	Interferon alfa
Ig	Imunoglobulinas
IκB	Inibidor de NF κ B
Ikk	I κ B cinase
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IP3	Inositol trifosfato
ISA 160	5-fluoro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
ISA 161	5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
ISA 162	5-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
Kg	Quilograma
L-NMMA	NG-monometil L-arginina
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina-metil-éster
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LX	Lipoxina
LXA₄	Lipoxina A4
LXB₄	Lipoxina B4
mg	miligrama
ml	Mililitro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MAO	Monoamino oxidase
MAO-A	Monoamino oxidase A
MAO-B	Monoamino oxidase B
MCP-1	Proteína quimiotática monocítica 1
MN	Células mononucleares
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NFκB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NK	Células <i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
PBS	Tampão fosfato salina
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaciclina
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PMN	Células polimorfonucleares
PSGL	Glicoproteína ligante de P-selectina
q.s.p	Quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotações por minuto
SG	Substância gelatinosa
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
THF	Tetrahydrofurano
TMB	Tetra metil di-hidrocloro de benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral alfa tipo 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral alfa tipo 2
TRPV1	Receptor vanilóide 1
TXs	Tromboxanos
TXA2	Tromboxano A2
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1. Convolutamidina A

As convolutamidinas A até E (Figura 1a e 1b) são membros da família de alcaloides oxindólicos que têm em comum o esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxióxindol. Estas substâncias foram isoladas do briozoário *Amathia convoluta* (Figura 1c). As convolutamidinas A e B apresentaram significativo efeito inibindo a diferenciação de células de leucemia pró-mielocítica humanas HL-60 (Kamano e cols., 1995). Entretanto, as demais convolutamidinas (C, D e E) não foram avaliadas por ensaios farmacológicos devido a pouca quantidade isolada (Zhang e cols., 1995)



b)

Convolutamidina	Substituinte (R)
A	CH ₂ COCH ₃
B	CH ₂ CH ₂ Cl
C	CH ₃
D	CH=CH ₂
E	CH ₂ CH ₂ OH

c)



Figura 1: Estrutura química das convolutamidinas (a); fórmula molecular das convolutamidinas (b); fotografia do briozoário marinho *Amathia convoluta* (Adaptado de Kamano e cols., 1995) (c).

As promissoras atividades farmacológicas estimularam a síntese da convolutamidina A pelo grupo do professor Angelo da Cunha Pinto e Profª. Dra. Bárbara Vasconcellos da Silva, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da UFRJ. Eles foram os primeiros a propor uma rota sintética para a obtenção da convolutamidina A na forma racêmica (Garden e cols., 1997; Cravotto e cols., 2006).

A literatura tem mostrado que derivados da convolutamidina A apresentam efeitos farmacológicos tais como secreção do hormônio de crescimento (Tokunaga e cols., 2001), neuroproteção por ativação dos canais de potássio ativados por cálcio (Hewawasam e cols., 2002) e anticonvulsivante (Popp e cols., 1985), entre outros. Recentemente foi publicado um trabalho do nosso grupo mostrando a ação antinociceptiva da convolutamidina A e dois derivados, em modelos *in vivo* (Figueiredo e cols., 2012).

Devido a grande variedade de análogos sintetizados pela profª. Bárbara Silva e seus colaboradores, bem como o potencial farmacológico desta série química, vários outros estudos são necessários. Portanto nesse sentido, nosso grupo tem buscado avaliar os potenciais efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos, bem como elucidar o (s) mecanismo(s) de ação dos derivados da Convolutamidina A.

1.2. Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tissular real ou potencial ou descritas em termos de tais lesões” (IASP, 1986).

A dor constitui uma experiência subjetiva uma vez que inclui um componente emocional e por isso sua ocorrência só pode ser determinada quando relatada. Desordens como hiperalgesia (extrema sensibilidade ao estímulo doloroso), alodinia (resposta dolorosa a estímulos mecânicos não nocivos) e hiperestesia (sensibilidade anormal a estímulos

sensoriais) podem ocorrer (Besson, 1999), e estão relacionadas à experiência nociceptiva. Indivíduos podem apresentar sensações dolorosas diferentes a partir de um mesmo estímulo (Loeser e Melzck, 1999). Apesar dos animais não apresentarem a capacidade de relatar a ocorrência da dor, eles exibem respostas comportamentais, através das quais podemos constatar a sua percepção. Por isso, nocicepção, refere-se à percepção de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo, substitui a denominação dor em experimentos animais, por se tratar exclusivamente do componente fisiológico da condução do impulso nervoso até o cérebro, sendo desvinculado o componente emocional não mensurado com fidelidade em animais (Besson e Chaouch, 1987).

De acordo com Woof (2010), a dor é classificada quanto a sua origem como nociceptiva, inflamatória ou patológica (neuropática ou disfuncional). A dor nociceptiva é decorrente da ativação direta do nociceptor por um estímulo mecânico, térmico ou químico. A dor inflamatória, por sua vez, ocorre em situações de lesão tecidual ou processo inflamatório em que ocorre ativação celular e liberação de mediadores que ativam ou sensibilizam (diminuem o limiar de ativação) os neurônios nociceptivos periféricos. As dores nociceptiva e inflamatória têm um caráter protetor. Finalmente, a dor patológica, que não tem um caráter protetor e que é decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, é subdividida em dor neuropática e disfuncional.

A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico e a dor disfuncional não tem uma causa evidente, não há estímulo doloroso, processo inflamatório, nem lesão do sistema nervoso, e a possível causa seria uma disfunção bioquímica e liberação de neurotransmissores levando a uma amplificação da sinalização sensorial nociceptiva no sistema nervoso central (Woof, 2010).

Existe ainda a classificação relacionada à duração da sensação dolorosa, que pode ser: transitória, aguda ou crônica. A dor transitória ocorre na ausência de qualquer dano tecidual e se dissipa em poucos segundos ou minutos. Já a dor aguda decorre de uma lesão tecidual eminente com ativação direta dos nociceptores locais. Por fim a dor crônica é a dor que persiste mesmo após a cura da lesão ou se prolonga por semanas, meses ou até anos após a recuperação tecidual e o organismo se torna incapaz de restaurar as funções fisiológicas para os níveis homeostáticos, o que a torna de difícil tratamento (Loeser e Melzack, 1999; Basbaum e cols., 2009).

1.2.1. Mecanismo de transmissão da dor

Os nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários, cujos corpos celulares encontram-se localizados nos gânglios da raiz dorsal dos nervos espinhais ou no gânglio trigeminal. Essas terminações podem responder a estímulos dolorosos de natureza térmica, mecânica ou química. O nociceptores se diferenciam dos demais receptores sensoriais pelo seu limiar mais alto, sendo ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva suficiente para causar algum grau de lesão tecidual (Cesare e McNaughton, 1996, Julius e Basbaum, 2001).

Os nociceptores estão associados principalmente a fibras do tipo A δ e tipo C. Fibras A δ , são mielinizadas, com velocidade de condução de aproximadamente de 5-30 m/s, gerando uma sensação dolorosa aguda e bem localizada. Esse tipo de fibra está relacionado a nociceptores térmicos e mecânicos ou seja, aqueles ativados por temperaturas extremas e por pressão intensa aplicada na pele. As fibras do tipo C são amielínicas e apresentam velocidade de condução menor que 1 m/s gerando uma sensação dolorosa mais lenta e menos discriminativa. Essas estão associadas a nociceptores polimodais que são ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Julius e Basbaum, 2001; Brooks e Tracey, 2005).

O início do processo da dor se dá com a transdução do sinal mecânico, térmico ou químico em um sinal elétrico de magnitude suficiente para poder ser conduzido através das fibras nervosas. Uma vez ultrapassado o limiar de disparo, o potencial de ação é transmitido através das fibras nervosas até chegar ao corno dorsal da medula espinhal, onde faz sinapse com neurônios de segunda ordem, em sua maioria na lâmina II (Figura 2). Essa sinapse sensorial é mediada por neurotransmissores como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), dentre outros (Davis, 2012). Os neurônios secundários ascendem contralateralmente através do trato espinotalâmico conduzindo o impulso doloroso do corno dorsal da medula até o tálamo, onde fazem sinapse com neurônios terciários, que por sua vez conduzem a informação nociceptiva até o córtex somatossensorial e/ou para o giro cingulado anterior. No córtex somatossensorial a informação dolorosa é processada e interpretada no nível da consciência, enquanto o giro cingulado corresponde ao componente emocional da dor (Figura 3) (Millan, 1999; Basbaum e cols., 2009).

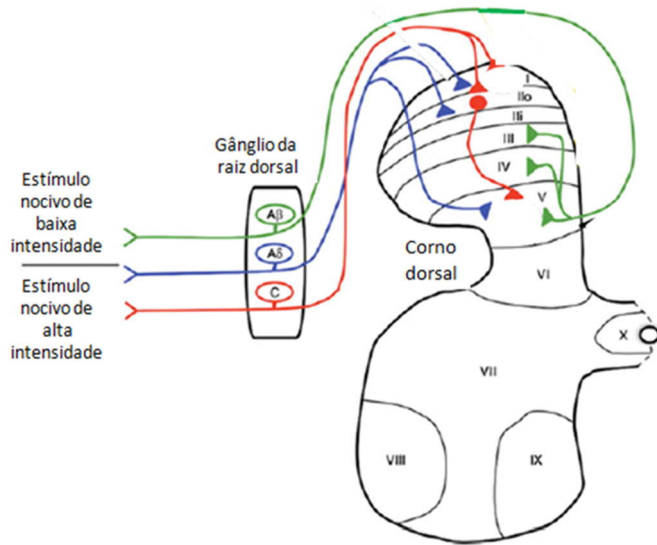


Figura 2: Organização laminar no corno dorsal da medula espinal (Adaptado de Davis, 2012)

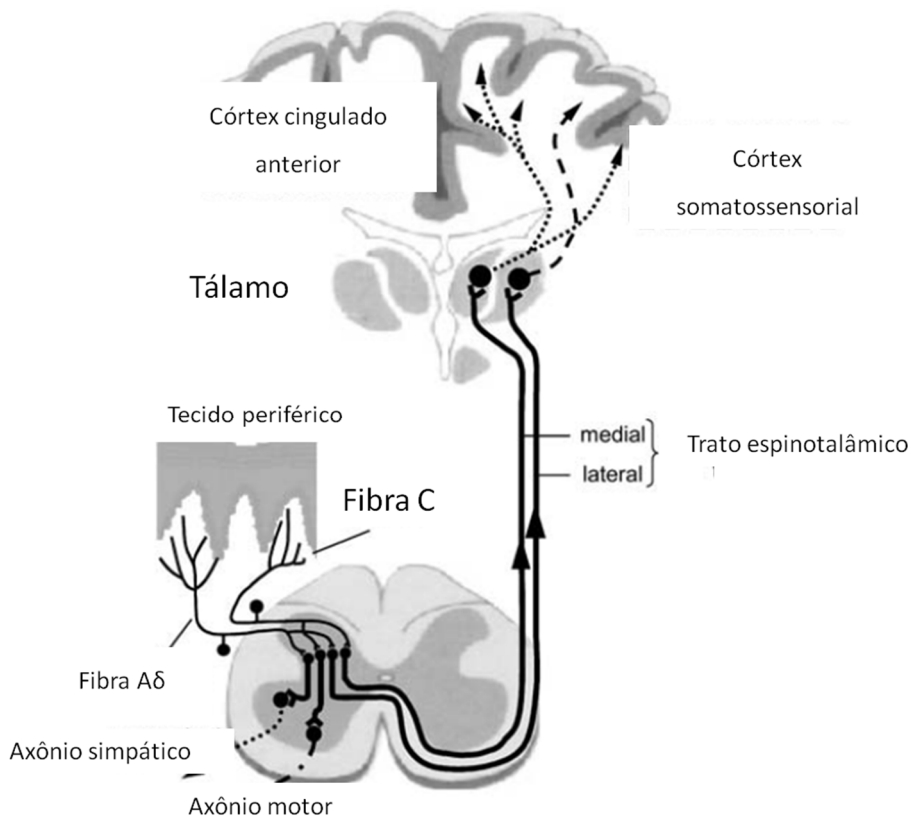


Figura 3: Representação esquemática do sistema nociceptivo com terminações nervosas livres no tecido, fibras aferentes e suas sinapses no corno dorsal da medula espinal. A partir da medula espinal as fibras aferentes ascendem pelo trato espinotalâmico até o tálamo e córtex somatossensorial (Adaptado de Schaible e Richter, 2004).

1.2.2. Mecanismo de controle endógeno da dor

Em 1965, Melzack e Wall verificaram que o mecanismo de transmissão da dor, descrito anteriormente, era modulado por um sistema endógeno surgindo assim a “teoria do controle do portão”. De acordo com essa teoria, a lâmina II do corno dorsal da medula, chamada de substância gelatinosa, é constituída principalmente por fibras de grande diâmetro A β e neurônios inibitórios, sendo ambos capazes de inibir a transmissão da informação nociceptiva. As fibras nociceptivas A δ e C inibem o interneurônio da substância gelatinosa e assim facilitam a transmissão da informação nociceptiva. Portanto, aferências não nociceptivas “fecham” o portão para a transmissão da informação nociceptiva e as aferências nociceptivas “abrem” o portão para a transmissão central (Audette e Ryan, 2004; Basbaum e cols., 2009).

Posteriormente, influências supra-espinhais sobre o “portão da dor” foram sugeridas. Wall (1967) relatou que células na lâmina V do corno dorsal, de gatos descerebrados, eram mais responsivas a estímulos nocivos quando a medula espinhal era seccionada sugerindo que estruturas supra-espinhais inibiam, tonicamente, os neurônios na medula. A existência de um sistema descendente contribuindo para a inibição da via nociceptiva foi sustentada pelo trabalho de Reynolds (1969), o qual observou que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal induzia marcante antinociceção em ratos, capaz de inibir respostas reflexas a estímulos nocivos sem alterar respostas reflexas a estímulos ambientais, por deprimir a atividade dos neurônios das lâminas I e IV do corno dorsal (Millan, 2002; Fields et al., 2004;).

O sistema descendente de modulação da dor envolve as seguintes estruturas do sistema nervoso central: sistema diencefálico e cortical, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular, núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular paragigantocelular (NRP), *locus ceruleus* e o corno posterior bulbar e medular. (Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

A contribuição dos peptídeos opioides endógenos nesse sistema descendente de controle da dor foi confirmado pelas observações de que a analgesia induzida por estimulação elétrica de áreas do sistema nervoso central foi reduzida pela administração do antagonista não seletivo dos receptores opioides naloxona (Watkins e Mayer, 1982), bem como, de que a substância cinzenta periaquedutal e a substância gelatinosa são regiões ricas em neurônios contendo opioides (Millan, 2002).

Além dos opióides, vários outros neurotransmissores estão envolvidos no controle endógeno da dor como a noradrenalina e acetilcolina, o ácido γ -aminobutírico (GABA), a serotonina (Watkins e Mayer, 1982; Sandküler, 1996; Fürst, 1999; Millan, 2002).

1.2.3. Sistema Opioide e analgesia

Existem evidências da ação de opioides em locais do sistema nervoso periférico e central. Receptores opioides foram identificados em terminais de pequeno diâmetro na coluna espinhal e sobre corpos de neurônios no gânglio da raiz dorsal do nervo espinhal (Stein e cols., 1990). Cerca de um terço das fibras do tipo C apresentam receptores opioides dos tipos μ e δ que podem contribuir para o efeito antinociceptivo periférico dos opioides (Countax e cols., 2004).

Os peptídeos opioides são codificados por três genes distintos e seus produtos constituem na pré-pró-opiomelanocortina (POMC), a pré-pró-encefalina e a pré-pró-dinorfina. Os mediadores mais conhecidos são a β -endorfina, a met-encefalina, a leu-encefalina e a dinorfina (Simon e cols., 1973; Pert e Snyder, 1973; Kieffer e Gaveriaux-Ruff, 2002; Terskiy e cols., 2007).

Os receptores através dos quais os peptídeos opioides exercem seus efeitos podem ser divididos em três classes principais: μ , κ e δ . Todos os receptores são acoplados a proteína G_i e inibem a enzima adenilato ciclase reduzindo assim, o conteúdo intracelular de AMPc. A

ativação desses receptores promove abertura de canal de K^+ e inibem a abertura de canal de Ca^{2+} dependentes de voltagem, produzindo efeitos na membrana, tais como, a redução tanto da excitabilidade neuronal (pois a condutância aumentada ao K^+ causa hiperpolarização) como da liberação de neurotransmissores como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (pela inibição da entrada de Ca^{2+}) o que resulta no efeito analgésico dos opioides (Ingram e Williams, 1994; Stein e cols 2003; Stein e Lang, 2009).

Outra influência importante e consequência da ativação de receptores opioides do tipo μ , é que esses podem inibir a atividade do receptor de potencial transitório do tipo vaniloide (TRPV1) pela via $G_{i/o}$ e AMPc, uma vez que ambos receptores são expressos em fibras nociceptivas, quando um agonista opioide se liga ao receptor do tipo μ ocorre a dissociação do complexo da proteína G levando a inibição da adenilato cilase e da formação de AMPc e como consequência a proteína quinase A (PKA) não é ativada. No processo de dor inflamatória, TRPV1 pode ser fosforilado, e regulado por várias proteínas quinases, incluindo PKA. Dessa forma a inibição desses receptores via $G_{i/o}$ e AMPc contribui para o efeito antinociceptivo dos agonistas dos receptores opioides (Endres-Becker et al., 2007).

1.2.4. Sistema colinérgico e analgesia

Alguns estudos tem mostrado que a estimulação colinérgica e subsequente ativação de receptores muscarínicos espinais (Eisenach 2009) pode levar a analgesia em humanos através da administração de inibidores de colinesterase para o tratamento de dor pós-operatória (Habib e Gan 2006), e dor do câncer (Lauretti et al. 1999).

A acetilcolina (ACh) exerce muitos dos seus efeitos fisiológicos através da ativação de cinco subtipos de receptores muscarínicos (mAChR) M1, M2, M3, M4, M5 e (Caulfield e Birdsall, 1998). Os receptores M1, M3 e M5, estão ligados a subunidades da família Gq/11 e atuam através da fosfolipase C, via fosfato de inositol, enquanto os receptores muscarínicos

M2 e M4 estão ligados a proteína Gi e agem através da inibição da adenilato ciclase reduzindo o AMPc intracelular. (Caulfield e Birdsall, 1998). Há uma grande expressão de receptores muscarínicos em tecidos periféricos e do sistema nervoso (Levey 1993).

Agonistas muscarínicos que possuem alguma seletividade para mAChR tem ajudado a mostrar qual subtipo de receptor atua na antinocicepção. Os agonistas preferenciais para M4 CMI-936 e CMI-1145, ambos análogos da epibatidina, um agonista colinérgico não seletivo, desempenharam potente atividade antinociceptiva no modelo de retirada de cauda em camundongos. Estes dados sugerem que os efeitos antinociceptivos podem ser mediados principalmente através de M4, provavelmente ao nível da medula espinhal (Ellis et al. 1999).

Além dos receptores muscarínicos, a ativação de receptores ionotrópicos nicotínicos no corno dorsal da medula espinhal, também podem contribuir para analgesia espinhal e supra-espinhal, bem como para a ativação do sistema serotoninérgico descendente do núcleo magno da rafe (Millan, 2002).

1.2.5. Glutamato

O glutamato é um aminoácido excitatório que pode ser encontrado em concentrações significativas na medula espinhal. Ele é sintetizado e liberado pelas fibras nociceptivas aferentes primárias mielinizadas e não mielinizadas sendo um importante neurotransmissor na primeira sinapse sensorial. Sua liberação está associada também com a liberação da substância P (SP) (Millan, 1999; Afraha e cols., 2001)

Através do uso de ferramentas farmacológicas foram identificados três tipos de receptores ionotrópicos para o glutamato: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido cáinico (KA) e ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA). A maioria dos receptores AMPA e cainato são permeáveis ao Na^+ e K^+ , mas não ao Ca^{2+} . Diferentemente todos os receptores de NMDA são altamente permeáveis ao Ca^{2+} , assim como ao Na^+ e K^+ . Além

disso, a ativação dos receptores de cainato e de AMPA resulta em abertura do canal no potencial de membrana de repouso, enquanto a ativação do receptor do NMDA isso não ocorre. Isso deve-se ao bloqueio dependente da voltagem do poro de NMDA pelo Mg^{2+} extracelular, esse íon é expelido durante a despolarização do neurônio permitindo a abertura do canal. Assim, para que o canal do receptor de NMDA se abra, o glutamato deve se ligar ao receptor e a membrana deve ser despolarizada (Roger e Nicoll, 2010).

Em relação aos receptores de glutamato metabotrópicos, esses são ativados apenas quando a concentração de glutamato fica muito elevada durante a estimulação repetitiva da sinapse (Roger e Nicoll, 2010).

A liberação sustentada de glutamato e neuropeptídeos como a SP através da estimulação das fibras C provoca uma ativação persistente de receptores AMPA com despolarização progressiva dos receptores NMDA e conseqüente amplificação do sinal, levando a hiperalgesia (Sorkin e Wallace, 1999; Khasabov e cols, 2002; D'Mello e Dickenson, 2008). Portanto, substâncias que atuam diminuindo a nocicepção induzida pelo glutamato podem contribuir com o efeito analgésico.

1.3. Processo inflamatório

O processo inflamatório pode ser definido como uma sequência de eventos que ocorrem em resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual. É um processo complexo, que envolve a participação de inúmeros mediadores de origem celular ou plasmática, com efeitos biológicos elaborados e inter-relacionados, que se iniciam para potencializar o reparo tecidual (Vane e cols., 1994; Calixto e cols., 2004).

As primeiras informações relacionadas à inflamação foram descritas por Celsius, no século I, quando ele enumerou os quatro sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, tumor e dor. O quinto sinal, perda da função, foi acrescentado no século XIX por Virchow. Ainda no século XIX, Cohnhein demonstrou as primeiras alterações vasculares, com consequente extravasamento plasmático e migração celular, para o foco inflamatório. No final do século XIX, Metchnikoff atribuiu a importância das células fagocitárias na resposta inflamatória (revisto em Majno e Joris, 2004). Finalmente, no século XX, Tomas Lewis, somando aos estudos já estabelecidos, mostrou que substâncias químicas eram responsáveis pela mediação de alterações vasculares que ocorrem durante o processo inflamatório, como por exemplo, a histamina (revisto em Majno e Joris, 2004)

Didaticamente, o processo inflamatório é dividido em três fases. A fase aguda, que apresenta duração variável e caracteriza-se pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Posteriormente a essa etapa ocorre a fase sub-aguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas. Por fim, a fase de resolução da inflamação, ou proliferativa crônica, quando acontece a regeneração tecidual e fibrose (Suzuki e cols., 2003; Schmid-Schonbein, 2006).

A vasodilatação que ocorre na fase aguda é consequência da liberação, no local da lesão, de mediadores químicos como óxido nítrico (NO), cininas, histamina, serotonina,

leucotrienos(LT), prostaglandinas (PG) e substâncias liberadas das terminações nervosas como as taucinininas e CGRP, entre outros (Schmid-Schonbein, 2006).

A migração de leucócitos e células fagocíticas para o sítio inflamatório é denominada como quimiotaxia. Nesse processo ocorre o direcionamento do fluxo de células e recrutamento de leucócitos específicos como, por exemplo, polimorfonucleares (PMN) ou neutrófilos em resposta a uma inflamação bacteriana (Kelly e cols., 2007).

Na etapa seguinte há rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para o sítio inflamatório (Figura 4). Esse processo de recrutamento leucocitário é mediado por moléculas de adesão como selectinas (P-selectinas, L-selectinas e E-selectinas), importantes no rolamento, integrinas (expressas pelos leucócitos e compostas pelas subunidade α e β com um domínio extracelular que se liga na matriz extracelular) importantes na adesão e a superfamília das moléculas das imunoglobulinas (Ig), imprescindível na transmigração (Meager, 1999; Nourshargh e Marelli-Berg, 2005).

A indução, por mediadores inflamatórios, do ligante da L-selectina no endotélio dá início à captura e rolamento dos PMN, processo também auxiliado pelo aumento na expressão endotelial de P- e E-selectinas, as quais servem de receptores para seus ligantes *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) e *E-selectin-ESL-1* (ESL-1), respectivamente (Meager, 1999).

A expressão ou liberação das moléculas de adesão são fortemente influenciadas por mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, interferon- γ , fator de crescimento tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1 β) e quimiocinas (Meager, 1999).

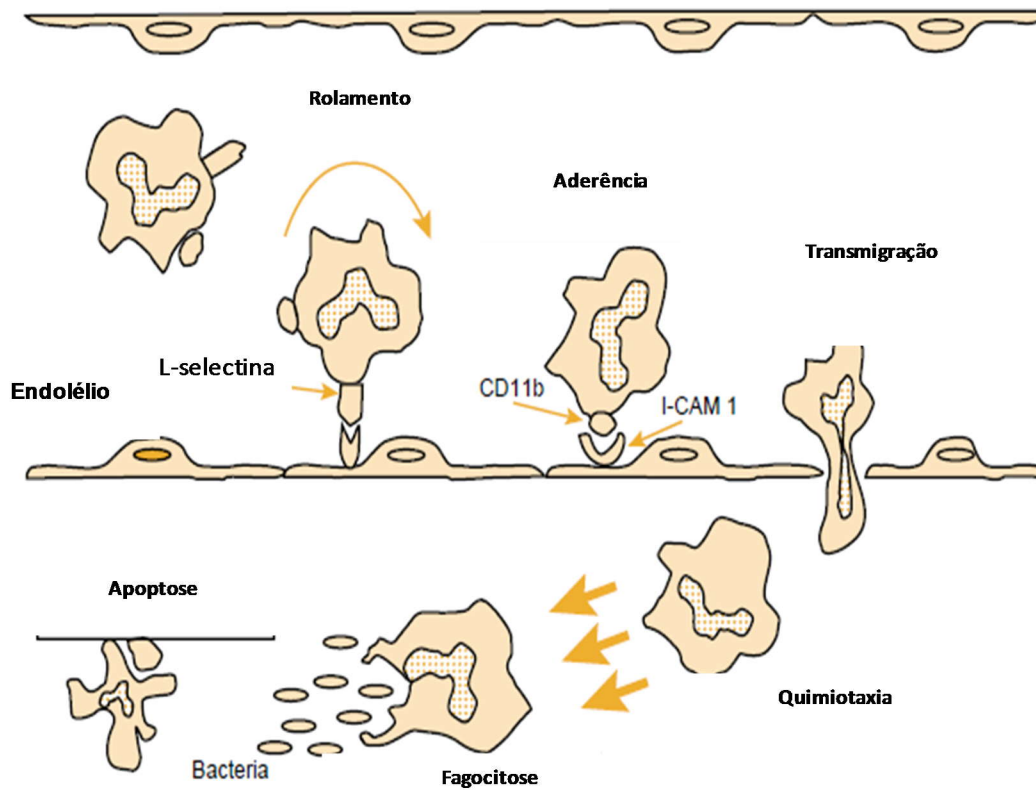


Figura 4: Representação do mecanismo de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia dos neutrófilos (Adaptado de Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Finalmente, uma série de eventos ocorre na tentativa de regenerar o tecido danificado, entretanto, se ocorrer a manutenção do quadro inflamatório haverá a deposição de tecido fibroso no local (Suzuki e cols., 2003).

1.3.1. Eventos vasculares

Durante o processo inflamatório, eventos vasculares como, por exemplo, mudanças no calibre vascular e aumento da permeabilidade vascular, culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente há uma vasoconstrição transitória, mediada por fibras autonômicas aferentes, seguida de uma vasodilatação mediada por substâncias como histamina, LT e PG favorecendo o aumento do fluxo sanguíneo que está relacionado ao calor e vermelhidão no local da lesão (Aller e cols., 2006).

Com o extravasamento de proteínas para o interstício ocorre ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam a alteração da orientação das células sanguíneas que antes localizadas na região mais central do vaso, passam agora para sua periferia. Esta alteração propicia a marginação leucocitária permitindo assim o contato dos leucócitos com as células endoteliais (Schmid-Schonbein, 2006).

O aumento da permeabilidade vascular também é importante para a contenção da agressão, pois permite o influxo de proteínas, moléculas do sistema complemento e células inflamatórias do compartimento intravascular para o interstício (Schmid-Schonbein, 2006).

1.3.2. Células do processo inflamatório

Os leucócitos são células essenciais para a defesa do organismo e são divididos em subtipos celulares: PMN e mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos). Os PMN, também chamados de neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutadas para o local da inflamação. Juntamente com os macrófagos, são responsáveis pela fagocitose e destruição do agente lesivo (Pettersen e Adler, 2002). O aumento de PMN ativados em tecidos promove uma lesão decorrente da liberação de suas substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio, resultando na progressão da doença (Faurischou e Borregaard, 2003).

O sistema fagocítico mononuclear pode ser representado por monócitos e macrófagos. Em humanos, os monócitos circulantes no sangue representam cerca de 5 a 10% dos leucócitos totais. É uma população heterogênea devido a grande variação de marcadores de superfície, capacidade fagocítica e potencial de diferenciação. Eles podem se diferenciar em macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, microglia no sistema nervoso central e células de Kupffer no fígado (Seta e Kuwana, 2007).

1.3.3. Mediadores químicos inflamatórios

Após estímulo lesivo a resposta inflamatória também desenvolve um quadro decorrente da liberação de substâncias endógenas, denominadas como mediadores químicos inflamatórios e que podem se originar do plasma, das células ou de tecidos (Majno e Joris, 2004). De acordo com suas propriedades bioquímicas, os mediadores podem ser divididos em aminas vasoativas (p. ex., substância P, trombina, bradicinina, serotonina), fragmentos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a), mediadores lipídicos (eicosanoides e PAF), citocinas (TNF- α , IL-1 β , entre outras), quimiocinas (IL-8 e MCP-1) e enzimas proteolíticas como elastina, catepsina e metaloproteases (Majno e Joris, 2004; Walzog e Gaetgens, 2000; White e cols., 2005).

A histamina encontra-se distribuída nos tecidos e está pré-formada e armazenada nos grânulos de mastócitos, presentes normalmente no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. Ela é liberada por degranulação dos mastócitos em resposta a uma série de estímulos, como por exemplo substância P, bradicinina (BK), lesão física, reações imunes, proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos e citocinas, entre outros. É considerado o principal mediador da fase inicial de aumento da permeabilidade vascular, atuando sobre a microcirculação através dos receptores H₁, causando dilatação das arteríolas e aumentando a permeabilidade vascular das vênulas (Jutel e cols., 2009).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) também é um mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. Está presente em plaquetas, células enterocromafins (humanos e roedores) e mastócitos (roedores). A liberação da serotonina das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina ou complexo antígeno-anticorpo (Aller e cols., 2006).

BK é um cininogênio vasoativo que provoca a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora resulta em parte, da produção endotelial de

PGI₂ e da liberação de óxido nítrico (Marceau e Regoli, 2004). Agindo em receptores do tipo B2 presentes principalmente em células endoteliais, célula muscular lisa e fibroblastos (Couture e cols., 2001). Além disso, a bradicinina exerce diversos efeitos, como por exemplo, a liberação de mediadores inflamatórios tais como prostanoídes, citocinas (IL-1 β e TNF- α) e ainda é um potente agente algésico (Eliis e Fozard, 2002).

As taquicinininas são uma família de peptídeos liberados tanto no SNC como no sistema nervoso periférico que interagem com os sistemas cardiovascular e imunológico. O gene pré-pró-taquicininina A (PPT-A) dá origem a substância P e a neurocinina A; e o gene da pré-pró-neurocinina B (PPT-B) origina a neurocinina B (Pennefather e cols., 2004).

Os receptores taquicinérgicos são acoplados a proteína G e podem ser do tipo NK1, NK2 e NK3, sendo ativados pela substância P, neuroquinina A e neuroquinina B, respectivamente (Liu e Bucher, 2005).

Quando há uma lesão tecidual, é desencadeada a síntese e liberação de SP, que no tecido periférico provoca ações vasculares pró-inflamatórias como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, degranulação dos mastócitos, além de prolongar as ações do glutamato na primeira sinapse sensorial (Santos e Calixto, 1997; Szllasi e Blumberg, 1999).

1.3.3.4. Mediadores lipídicos

Outra classe de mediadores envolvidos no processo inflamatório inclui a família dos mediadores lipídicos conhecidos como eicosanoides e que compreendem os prostanoídes, leucotrienos e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA).

O AA é um ácido graxo liberado dos fosfolípidos da membrana celular por ação principalmente da enzima fosfolipase A₂ (FLA₂) ativada por injúria tecidual ou produtos microbianos. Uma vez liberado, o AA é metabolizado pela via das ciclo-oxigenases (COX-1, COX-2 e COX-3) e a via das lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX). Os produtos gerados pela via das COXs são os prostanoídes (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂) enquanto os produtos da via das LOXs são os leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄ e LTD₄) e lipoxinas (figura 5) (Vanegas e Schaible, 2001; Nieves e Moreno, 2006; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010).

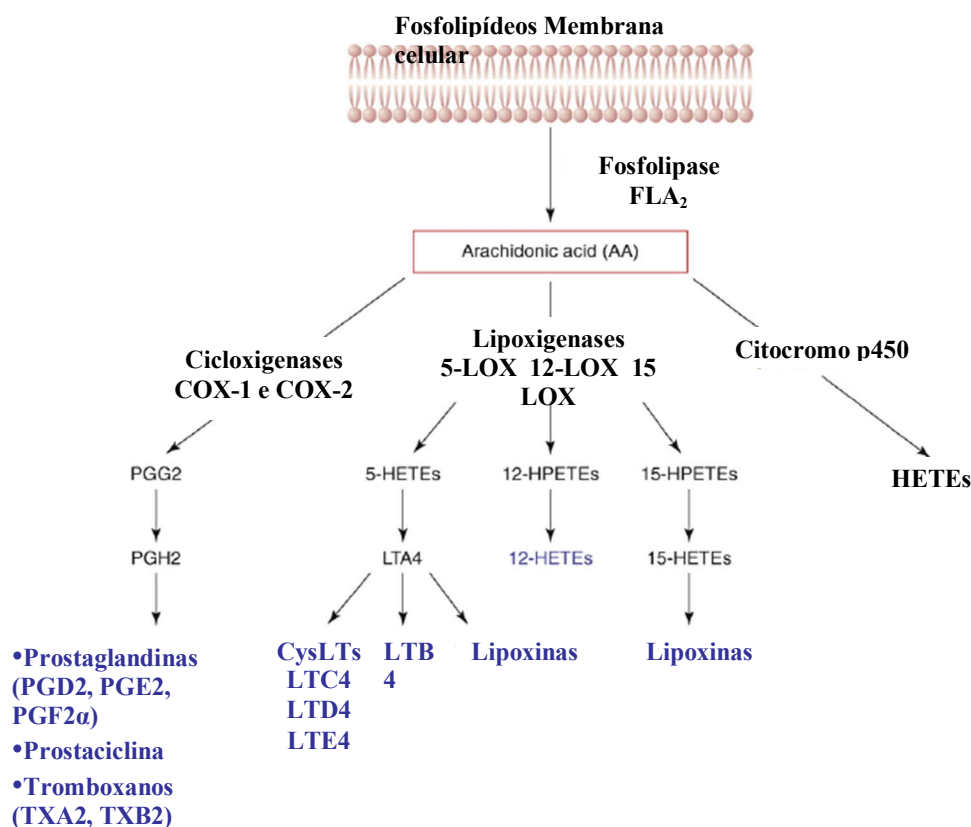


Figura 5: Metabolismo do ácido araquidônico. AA (ácido araquidônico); FLA₂ (fosfolipase A₂); 5,12,15-LOX, (5,12,15-lipoxigenase); HEPTE (ácido epoxieicosatrienoico); HETE (ácido hidroieicosatetraenoico); LTA₄, LTB₄ e LTC₄ (leucotrienos A₄, B₄ e C₄); COX 1, 2 (cicloxiogenase 1, cicloxiogenase 2); PGG₂, PGH₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} (Prostaglandinas); TXA₂, TXB₂ (Tromboxano A₂ e B₂) (Adaptado de Harizi e cols., 2008).

A isoforma COX-1 é expressa constitutivamente em vários tecidos originando prostaglandinas (PGs) que irão contribuir para a manutenção das funções fisiológicas, como a citoproteção do trato gastrointestinal, na função plaquetária e na perfusão renal (Botting, 2006). Já a isoforma COX-2 é conhecida como induzível uma vez que sua expressão ocorre principalmente em resposta a estímulos pró-inflamatórios, sendo ela um importante contribuinte para a síntese de prostanoídes com o progresso da inflamação. Além disso, citocinas inflamatórias podem induzir um aumento de 10 a 80 vezes no nível de expressão de

COX-2 em monócitos, macrófagos, condrócitos, fibroblastos, e células endoteliais (Khan e cols., 2007). Entretanto, a COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em regiões cerebrais, no aparato justa glomerular renal e no endotélio vascular (Needleman e Iasakson, 1997; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010). Existe uma terceira enzima, a COX-3, a qual é oriunda de uma variante do gene da COX-1, sendo expressa no cérebro e coração de cães (Chandrasekharan e cols., 2002; Qin e cols., 2005).

As prostaglandinas são importantes agentes sensibilizadores e a PGE₂ é um dos principais mediadores hiperalgésicos. Seus efeitos diretos são mediados por sua ação nos seus receptores (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) e modulação de canais iônicos nos aferentes primários (Burian e Geisslinger, 2005). O envolvimento de proteínas quinase A (PKA) e C (PKC) tem sido descrito na hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ (Kawabata, 2011). Em relação aos efeitos indiretos esses decorrem do aumento da sensibilidade a outros agentes, como BK (atuando em receptor B₂) e capsaicina (atuando em receptor vaniloide tipo 1, TRPV1) (Burian e Geisslinger, 2005).

A 5-lipoxigenase é a principal enzima do grupo das lipoxigenases, atuando sobre o AA e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou em leucotrienos cisteínicos tais como, os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (figura 5). Os leucotrienos cisteínicos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB₄ é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (Haeggstrom e Funk, 2011). O LTB₄ contribui para o aumento da permeabilidade vascular, aderência e quimiotaxia. LTC₄, LTD₄ e LTE₄ estão envolvidos na vasodilatação do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo por isso

muito importante na asma (Ishii e cols., 1994; Bertolini e cols., 2002; Haeggstrom e Funk, 2011)

1.3.3.5 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um mediador com múltiplas funções participando na sinalização de sistemas cardiovasculares, gastrintestinais, geniturinário, respiratório e nervoso (Hanafy e cols., 2001; Ignaro e cols., 2002).

A síntese do NO ocorre a partir da oxidação do nitrogênio guanidina terminal do aminoácido L-arginina, que é então convertido em L-citrulina, reação essa catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) no interior das células. (Moncada e cols., 1991).

Existem três NOS já bem identificadas: NOS endotelial (eNOS ou NOS III), é encontrada em células endoteliais, o NO gerado a partir dessa enzima tem um papel significativo no controle da pressão arterial por diminuir a resistência vascular periférica; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em neurônios centrais e periféricos onde o NO participa da neurotransmissão e neuromodulação e a NOS induzida (iNOS ou NOS II) expressa em diversas células em resposta a estímulos patológicos, como micro-organismos invasores ou citocinas. A ativação das enzimas constitutivas (endotelial e neuronal) é regulada por Ca^{2+} -calmodulina e a produção de NO ocorre em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo. Já iNOS é ativada independentemente de cálcio intracelular, sintetiza NO em maiores quantidades e por longo período de tempo (Reutov e Sorokina, 1998).

Vários análogos da L-arginina como o Ng-monometil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina e seu metil ester (L-NAME), entre outros, atuam como competidores e em alguns casos como inibidores reversíveis da NO sintase constitutiva e induzível. Além disso a dimetilarginina assimétrica ADMA e o LNMMA estão presentes no plasma e na urina humana, quando acumulados no plasma de pacientes com insuficiência renal crônica, podem

contribuir para hipertensão (Vallance e cols., 1992). O NO tem várias funções na inflamação e pode ser entendido quando inibidores seletivos da NOS induzível são produzidos e testados em modelos de inflamação (Moncada e Higgs, 1995)

Após sua geração, o NO difunde-se pelas células-alvos e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, a qual promove a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A medida que aumenta a concentração de GMPc ocorrem efeitos tais como relaxamento do músculo liso vascular e não-vascular, inibição da agregação plaquetária, e da adesão de leucócitos (Moncada e Higgs, 1995; Vallance e Leiper, 2002).

1.3.3.6 Citocinas

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos produzidos por vários tipos celulares principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos ativados. Elas são capazes de modular a função de vários tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo e crônico. A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas e processos inflamatórios. Uma vez liberados, exercem efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos se ligando a receptores específicos nas células-alvo (Wong e Fish, 2003, Schmid-Schobein, 2006; Sims e Smith, 2010). A superfamília das citocinas pode ser dividida em: interleucinas (IL), quimiocinas (MCP-1), interferons (IFN) e fatores de necrose tumoral (TNF), TGF- β (fator de transformação do crescimento), CSF (fator estimulador de colônia) (Sommer e Kress, 2004; Alwani e cols., 2006; Wahl, 1992; Hamilton, 2002)).

Citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α e IL-1, participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como dos processos de reparo. O TNF- α é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos, é uma das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório (Alwani e cols., 2006). Mesmo em concentrações

baixas, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas. Ele ainda pode regular a produção e liberação de IL-1 β (Sommer e Kress, 2004; Sasakawa e cols., 2005).

IL-1 β desempenha ações nociceptivas que podem ser mediadas por uma complexa cascata de sinalização e produção secundária de NO, bradicinina e prostaglandinas. A ligação ao seu receptor IL1-RI inicia uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais, induzindo a expressão de COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Sommer e Kress, 2004; Hori e cols., 1998; Ren e Torres, 2009).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que regulam a migração de leucócitos através da interação com receptores acoplados a proteína G. Elas podem ser classificadas em CXC, CC, C e CX₃C, sendo as subfamílias CXC e CC as principais envolvidas no processo inflamatório. As CXC, representadas por IL-8, estão envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos T e B e células *natural killer*. Já as CC, representadas por *monocyte chemoattractand protein 1* (MCP-1), regulam migração de monócitos, macrófagos, basófilos, linfócitos T e eosinófilos. A ativação dessas quimiocinas pode levar ao aumento na concentração intracelular de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de proteases presentes nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e monócitos, bem como de histamina liberada de basófilos (Bagiollini, 1998).

1.3.4 Resolução do processo inflamatório

Para que ocorra a resolução completa da resposta inflamatória é necessária a neutralização de mediadores químicos e interrupção do extravasamento plasmático bem como da infiltração leucocitária. Essa interrupção é seguida pela remoção do edema, leucócitos e fagócitos (Rankin, 2004). Portanto, os processos de apoptose e fagocitose são importantes durante a fase resolutive do processo inflamatório. Entretanto, caso não ocorra a resolução do processo inflamatório o tecido conectivo pode ser substituído por fibrose ou progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente (Lawrence e cols., 2002; Stables e Gilroy, 2011).

1.4. Considerações sobre fármacos analgésicos e anti-inflamatórios

Os fármacos analgésicos podem ser divididos em analgésicos anti-inflamatórios (anti-inflamatórios não esteroidais, AINEs e esteroidais, AIEs) e os opioides ou hipnoanalgésicos.

Os AINEs como ibuprofeno, diclofenaco, indometacina e aspirina atuam de maneira não seletiva sobre as isoformas COX-1 e COX-2. Seus efeitos antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios decorrentes da inibição de COX-1 e COX-2 impedem a produção de PG tais como PGE₂, PGD₂, PGI₂, bem como dos tromboxanos (Marnett, 2009).

Os inibidores seletivos da COX-2, chamados de coxibes, tem seus efeitos através da inibição da ação da enzima COX-2 e, portanto impedem a formação de PG nos locais de inflamação. Foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2 como o celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe e o lumiracoxibe (Mitchell e Warner, 2006). Entretanto, um estudo demonstrou que o rofecoxibe causava sérios eventos cardiovasculares como infarto e foi retirado do mercado em 2004 (Fitzgerald, 2003; Mitchell e Warner, 2006).

Os AIEs ou glicocorticoides como a dexametasona atuam através de regulação da expressão gênica e da via do NF- κ B via receptores intracelulares. Há a inibição da migração celular para área afetada por meio da supressão da expressão de moléculas de adesão ou da indução da síntese da proteína inibidora da fosfolipase A₂ (FLA₂), a anexina-1 (Rhen e Cidlowski, 2005). Assim, inibição da fosfolipase A₂ impede a liberação de AA e conseqüentemente a ativação da produção de PGs, tromboxano e LTs. O complexo esteroide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Barnes e Adcok, 1993; Flower e Rothwell, 1994; Vane e Botting, 1998; Millan, 1999).

Os opioides são potentes analgésicos usados na dor aguda de grande intensidade e refratária aos anti-inflamatórios, e no controle da dor crônica de natureza neoplásica. Os principais peptídeos opioides são resumidamente a β -endorfina, as encefalinas, as dinorfinas e as endomorfina. As duas encefalinas, leucina-encefalina (leu-encefalina) e metionina-encefalina (met-encefalina), são derivadas do precursor pró-encefalina. A β -endorfina é gerada a partir do precursor pró-opiomelanocortina (POMC); as dinorfinas A e B e a neuroendorfina são formadas a partir do precursor pró-dinorfina (Millan, 2002; Gaveriaux-Ruff e Kieffer, 2002). O quarto tipo de peptídeo opioide endógeno, as endomorfina, foi proposta por Zadina e colaboradores (1997), mas o seu precursor ainda não é conhecido (Terskiy e cols., 2007).

Os receptores opioides são acoplados à proteína G_{i/o} e sua ativação está associada à inibição da adenilato ciclase, que leva a diminuição do nível intracelular de 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), com conseqüente redução da atividade da proteína quinase A (PKA) e dos efeitos mediados por ela. Através da interação direta com canais iônicos, esses receptores podem ainda promover a abertura de canais para potássio e o fechamento de canais

para cálcio dependentes de voltagem e canais para sódio resistente à tetrodotoxina (Ingram e Williams, 1994). Esses eventos moleculares levam à redução da excitabilidade neuronal e inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios e neuropeptídeos pró-inflamatórios dos nociceptores como, por exemplo, a substância P e o CGRP, o que culmina no efeito analgésico dos opioides (Stein e cols., 2003; Stein e Lang, 2009)

Há três classes principais de receptores opioides: μ , δ e κ . Eles localizam-se em várias regiões das vias de transmissão da dor, como no corno dorsal da medula espinhal, no mesencéfalo, tálamo e fibras nervosas periféricas e por isso, a ativação desses receptores tem sido associada a analgesia supra-espinhal, espinhal e periférica (Quirion, 1984; Fields, 2004). Na substância cinzenta gelatinosa há predominância de receptores opíodes μ (Fields, 2004). Fármacos semelhantes à morfina tem alta afinidade por receptores μ , e são tradicionalmente usados no controle da dor (Herz, 1997; MacPherson, 2000). A analgesia provocada pela morfina pode ser antagonizada pelo uso de naloxona, um antagonista opioide não seletivo (Beneditti, 1996; Fields 2007).

Diversos fármacos com propriedades semelhantes às da morfina foram sintetizados, como a petidina ou meperidina e a fentanila com ação mais curta e mais potente, que são usados por via intravenosa para tratar dor severa. A metadona com ação mais longa que a morfina, entretanto com efeitos analgésico e indesejáveis menores do que os da morfina. Pentazocina e ciclazocina que atuam em receptores δ e κ conseqüentemente tendem a causar certa disforia. Buprenorfina embora muito potente, seu efeito máximo é menor que o da morfina.

Apesar de seu potente efeito analgésico, os opioides apresentam uma variedade de efeitos adversos como depressão respiratória, constipação intestinal, náuseas, vômitos, sedação, confusão mental, além de dependência física e psíquica, o que limita drasticamente o seu uso (Benyamin e cols., 2008)).

Há uma crescente busca de novas abordagens terapêuticas para controle do processo inflamatório e da dor. Nesse contexto, este trabalho busca investigar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de análogos da convolutamidina A.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos analgésico e anti-inflamatório dos derivados da Convolutamidina A, as ISAs 160, 161 e 162, em diferentes modelos *in vivo*, bem como o possível mecanismo de ação.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva periférica, espinhal e supra-espinhal em modelos de nocicepção induzida pela formalina, teste de retirada de cauda e placa quente, respectivamente, das ISAs 160, 161 e 162.
- Avaliar a participação das vias vaniloides, glutamatérgicas, opiácea, muscarínica ou nitrérgica na ação antinociceptiva das ISAs 160, 161 e 162
- Avaliar o efeito anti-inflamatório dos derivados da Convolutamidina A no modelo da bolsa de ar subcutânea analisando seus efeitos sobre o extravasamento plasmático, migração leucocitária, dosagem da concentração de citocina (TNF- α , IL-1 β) e óxido nítrico após estímulo inflamatório com carragenina (Cg).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Derivados da Convolutamidina A

A Convolutamidina A (Conv.A) é membro da família de alcaloides oxindólicos e apresenta o esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxiindol (Figura 6). Tal molécula e seus derivados (Tabela 1) foram sintetizados pela Profa. Dra. Bárbara Vasconcelos da Silva e pelo Prof. Dr. Angelo da Cunha Pinto, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da UFRJ.

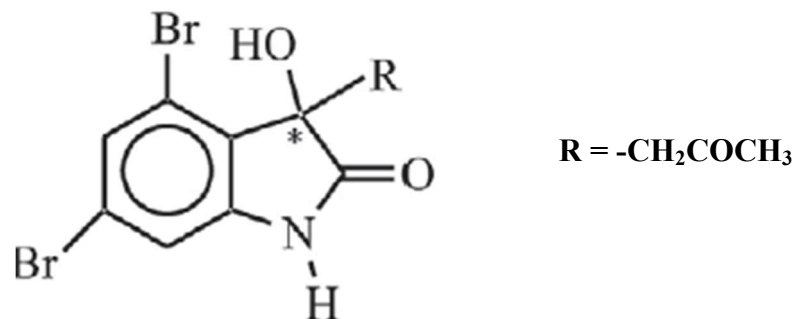
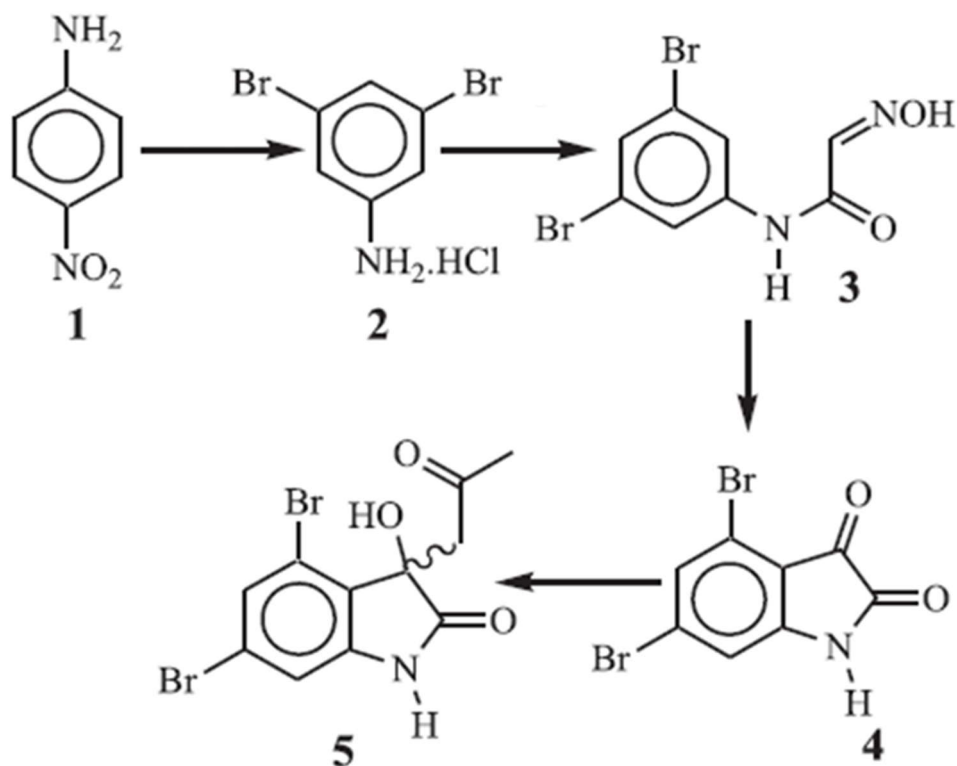


Figura 6: Estrutura da convolutamidina A.

A estratégia sintética para preparação da convolutamidina A (esquema 1) em sua forma racêmica envolveu etapas de bromação da p-nitro-anilina, formação do sal de arenodiazônio (diazotação) com substituição do nitrogênio por hidrogênio e, em seguida, a redução catalítica e hidrólise que resultaram na molécula 3,5-dibromonitrobenzeno (2, esquema 1). Em seguida utilizando a reação de Sandemeyer modificada por Marvel e Hiers (1941) foi preparada a α -isonitroacetanilamida 3,5-dibromada (3, esquema 1). Essa foi ciclizada com H_2SO_4 concentrado resultando na formação de 4,6-dibromo-isatina (4, esquema 1) que após ser solubilizada em acetona e em seguida em gotas de dietilamina, resultou na síntese da convolutamidina A (5, esquema 1) (Sandmeyer, 1919; Marvel e Hiers, 1941; Silva e cols., 2008).



Esquema 1- Rota sintética utilizada para a preparação da convolutamidina A.

Tabela 1- Posições dos substituintes dos derivados da Convolutamidina A

Substituinte (C-4)	Substituinte (C-5)	Substituinte (C-6)	Código
H	F	H	ISA160
H	Cl	H	ISA161
H	CH_3	H	ISA162
Br	H	Br	Convolutamidina A (Conv.A)

3.2. Reagentes

Foram utilizados formaldeído (Reagen), etanol P.A (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), dimetilsulfóxido P.A (DMSO) (Fisher Biotech), éter etílico, nitrito de sódio tween 20 (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de morfina e cloridrato de naloxona (Cristália, São Paulo, Brasil), fosfato dissódico de dexametasona (Aché, Rio de Janeiro, Brasil), ácido acetilsalicílico (AAS), sulfato de atropina monohidratado, cloridrato de N ω -Nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), ácido L-glutâmico (glutamato), capsaicina, capsazepina e carragenina, formato de amônio, molibdato de amônio, naftietilenodiamina e sulfanilamida, tampão fosfato-citrato com perborato e pastilhas de tetra-metil-di-hidrocloreto de benzidina (TMB) (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, EUA), soro albumina bovino (BSA) (LGC Biotecnologia), Kit Pierce BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA), Cepa de *Escherichia coli* (ATCC #25922) , nitrito de sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio e fosfato monossódico (Reagen), sulfato de zinco (Vetec), imunoplasas F96 Maxisorp (Nunc, Thermo Fisher Scientific, NY, EUA), kits ELISA BD OptEIA™ Set Mouse para TNF- α , IL-1 β , contendo as respectivas citocinas recombinantes de camundongo, anticorpo de captura (anti-camundongo TNF- α , IL-1 β) e anticorpo de detecção anti-camundongo conjugado com peroxidase (BD Biosciences, San Diego, EUA).

3.3. Preparo dos Reagentes e soluções

Formalina: preparada na concentração de 2,5% (v/v) em PBS,

AAS: preparado na concentração de 10 mg/mL em Tris-HCl 1M, pH 8,0.

Morfina: preparada na concentração de 10 mg/mL em água destilada.

Carragenina: preparada na concentração de 10 mg/mL (1% p/v), em PBS estéril.

Dexametasona: preparada na concentração de 2 mg/mL em PBS.

Capsaicina: preparada na concentração 1,6 mg/mL em PBS.

Atropina, Naloxona e L-NAME: preparados na concentração de 10 mg/mL em PBS.

Tampão fosfato salina (PBS)

KH ₂ PO ₄ (anidro)	1,78 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	7,61 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O ultrapura 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 BCATMProtein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA). Para a quantificação de proteínas, incuba-se 5 µL da amostra ou da proteína da curva padrão com 195 µL da mistura dos reagentes A e B a 37⁰C, por 30 minutos.

Reagente de Griess

Reagente A:

Sulfanilamida	1 grama
H ₂ O ultrapura q.s.p.	100 mL

Reagente B:

Dicloreto de naftiletileno diamina	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 ultrapura q.s.p.	1000 mL
Acertar o pH para 9,5 com 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 9,0mL de solução de tampão fosfato-citrato com perborato, preparado 30 minutos antes da utilização;

Anestésico

Cloridrato de ketamina	4,5 mL
Cloridrato de xilasina	1,5 mL
Salina q.s.p	40 mL

3.4. Administração das ISAs 160, 161 e 162 e fármacos controles

Foram feitas soluções estoques à 100 mg/mL das ISAs 160, 161 e 162. Todas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas à -20°C. Em todos os experimentos a concentração final de DMSO não excedeu a 0,5% de modo a não produzir qualquer efeito nos animais. As ISAs foram administradas por via oral, em doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg, em volume final de 0,1 mL de veículo (água destilada). Dexametasona (0,5 mg/kg, intraperitoneal), ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg, via oral) ou morfina (2,5 mg/kg, intraperitoneal) foram usados como controle positivo.

3.5. Animais

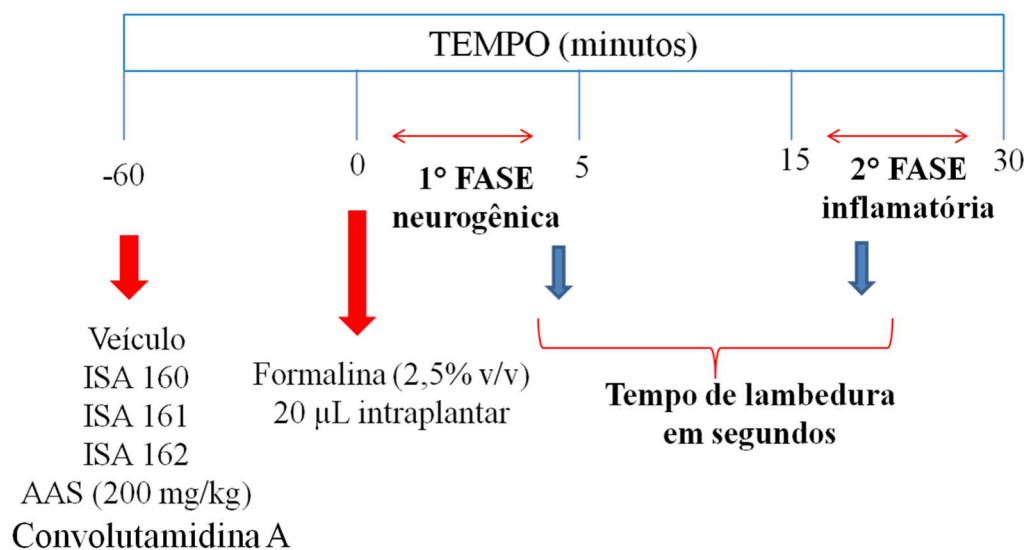
Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss 44 (20-25g), de ambos os sexos, doados pelo Centro de Produção de Animais de Laboratório, do Instituto Vital Brazil. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e comida.

Os protocolos experimentais de uso de animais de laboratório obedeceram aos princípios da Comissão de Avaliação de Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP), do Centro de Ciências da Saúde, da UFRJ e às normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e receberam o protocolo ICBDFBC-015.

3.6. Modelo da formalina

Nesse modelo uma injeção de 2,5% de formalina foi administrada por via intraplantar na pata direita do camundongo e a resposta comportamental dolorosa foi mensurada através do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. A injeção intraplantar produz uma resposta bifásica que consiste de uma fase inicial que ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (1ª fase ou fase neurogênica) e uma segunda fase que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção intraplantar (2ª fase ou fase inflamatória) (Hunskar e cols., 1987; Gomes e cols., 2007).

Os animais foram tratados com o veículo (água destilada), AAS, convolutamida A (10 mg/kg) ou ISAs 160, 161 e 162, 60 min antes da injeção intraplantar de 20 µL da formalina. O protocolo experimental está resumido no esquema 2.



Esquema 2: - Protocolo modelo da formalina.

3.7. Modelo da retirada de cauda

Para realização do teste, o animal foi imobilizado em um tubo cilíndrico de acrílico de maneira que sua cauda ficasse exposta. A cauda foi imersa em um banho-maria com a água aquecida de $50^0 \pm 1^0\text{C}$. O tempo, em segundos, que o animal levou para apresentar o reflexo de retirada de cauda foi registrado e denominado “tempo de latência” (Ben-Bassat e cols., 1959; Janssen e cols., 1963).

Quarenta minutos e vinte minutos antes dos tratamentos foram realizadas duas medidas controles. A média dessas medidas foi denominada de linha de base. Vinte minutos após a administração das ISAs, morfina ou veículo, foram feitas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas. Para evitar danos à cauda dos animais, foi estabelecido um tempo máximo de exposição da cauda do animal à água aquecida de três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”). Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação à linha de base = (tempo de latência x 100/linha de base - 100) ou como área sob a curva (ASC). O protocolo está representado no esquema 3.

De acordo com o tutorial do GraphPad Prism 5, a ASC é uma medida integrada de um efeito mensurável ou de desenvolvimento temporal de um fenômeno. Para cada ponto, o programa mostra a área em unidades do eixo X (seg) x eixo Y (%). Para o programa, a curva é uma série de pontos XY conectados. Para o cálculo da ASC o programa utiliza a regra trapezoidal (figura 7). Logo a área é calculada pela fórmula $\Delta X \cdot (Y_1 + Y_2) / 2$.

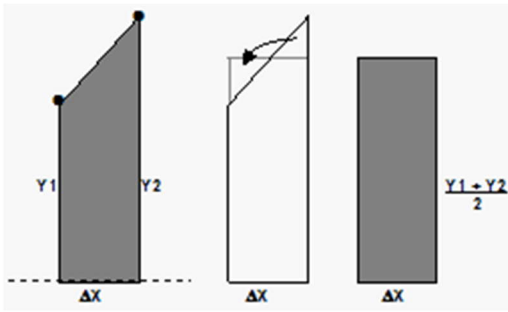
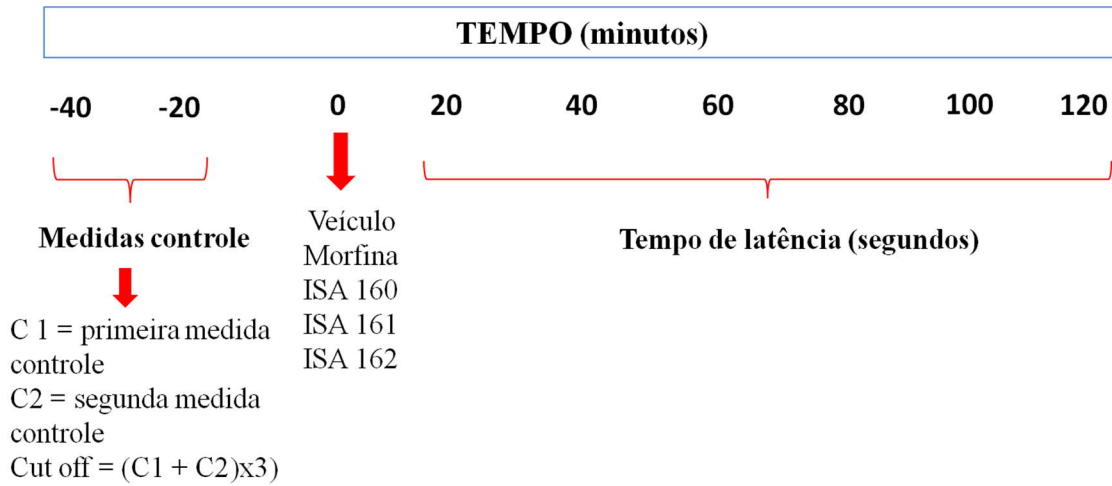


Figura 7: Representação do cálculo da ASC (regra trapezoidal).



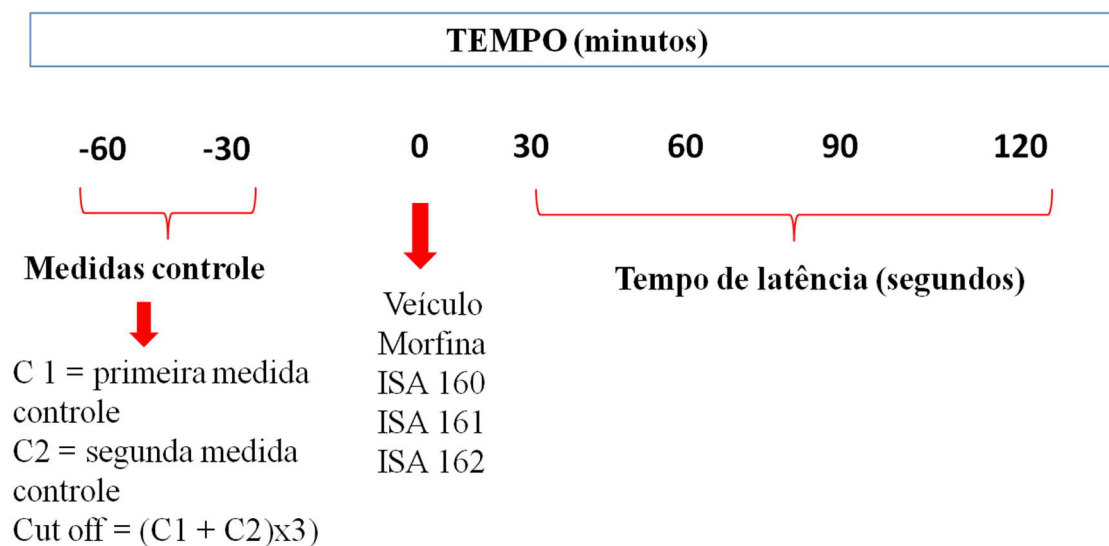
Esquema 3: Protocolo modelo retirada de cauda.

3.8. Modelo da placa quente

Esse modelo consiste em colocar o animal em uma placa aquecida à $55^0 \pm 1^0\text{C}$, o ato de retirar as patas ou saltar foram registrados e denominados tempo de latência (Jóhannesson e Woods, 1964).

Sessenta minutos e trinta minutos antes do tratamento com as substâncias, foram realizadas duas medidas controles. A média dessas medidas foi denominada como linha de base. Trinta minutos após a administração das ISAs, morfina ou veículo, foram feitas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 30 minutos entre cada uma delas. Para evitar danos teciduais às patas, foi estabelecido um tempo máximo de exposição das patas do animal à placa aquecida de três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”).

Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação à linha de base (= tempo de latência x 100/linha de base - 100) ou área sob a curva (ASC). O protocolo está resumido no esquema 4.

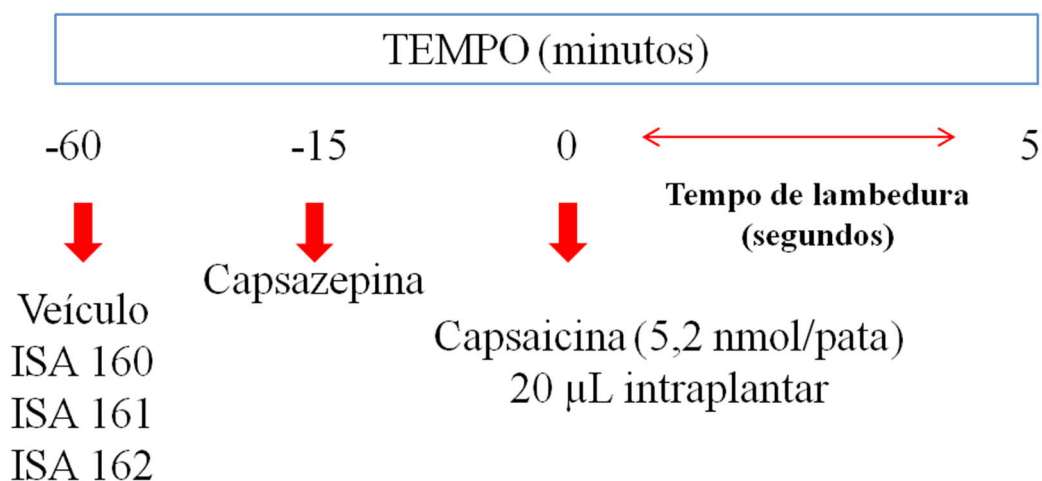


Esquema 4: Protocolo do modelo da placa quente.

3.9. Modelo da capsaicina

Esse modelo permite avaliar o envolvimento de receptores vaniloides na nocicepção (Jancso, 1978; Sakurada e cols., 1992; Marcon e cols., 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com as ISAs 160, 161 ou 162 nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg ou veículo. Após a injeção na pata posterior direita de 20 μ L de capsaicina (5,2 nmol/pata), foi registrado durante 5 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. Outro grupo de animais recebeu injeção intraplantar do antagonista de receptor TRPV1, a capsazepina (10 nmol/pata) 15 minutos antes da injeção da capsaicina. O protocolo experimental está resumido no esquema 5.

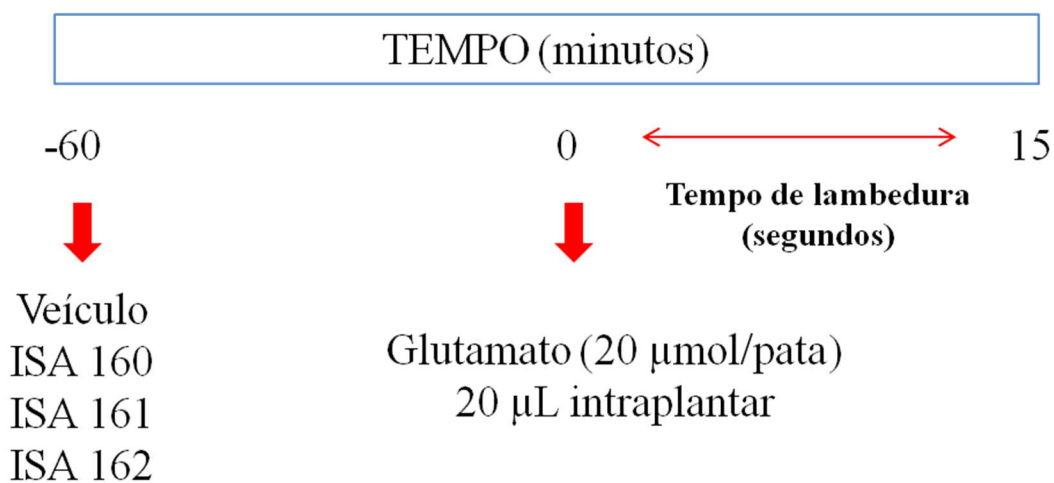


Esquema 5: Protocolo da nocicepção induzida por capsaicina.

3.10. Modelo do glutamato

Para avaliar se o glutamato, um neurotransmissor excitatório está envolvido no efeito antinociceptivo dos análogos da convolutamidina, foi realizada a administração intraplantar do aminoácido excitatório e o tempo de lambadura da pata foi indicativo de dor (Beirith e cols., 2002; Marcon e cols., 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com as ISAs 160, 161 e 162 nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg ou veículo, 60 min antes da injeção na pata posterior direita de 20 µL glutamato (20 µmol/pata). Após a injeção foi registrado durante 15 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. O protocolo experimental está resumido no esquema 6.



Esquema 6: Protocolo da nociceção induzida por glutamato.

3.11. Avaliação do mecanismo de ação antinociceptivo

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de três sistemas endógenos no efeito analgésico dos análogos da convolutamidina utilizamos dois antagonistas, naloxona (1 mg/kg, i.p.) e atropina (1 mg/kg, i.p.), e o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (3 mg/kg, i.p.). As doses escolhidas para os antagonistas e para o L-NAME foram baseadas na literatura (Marcon e cols., 2009) e em dados do nosso próprio laboratório (Pinheiro e cols., 2010).

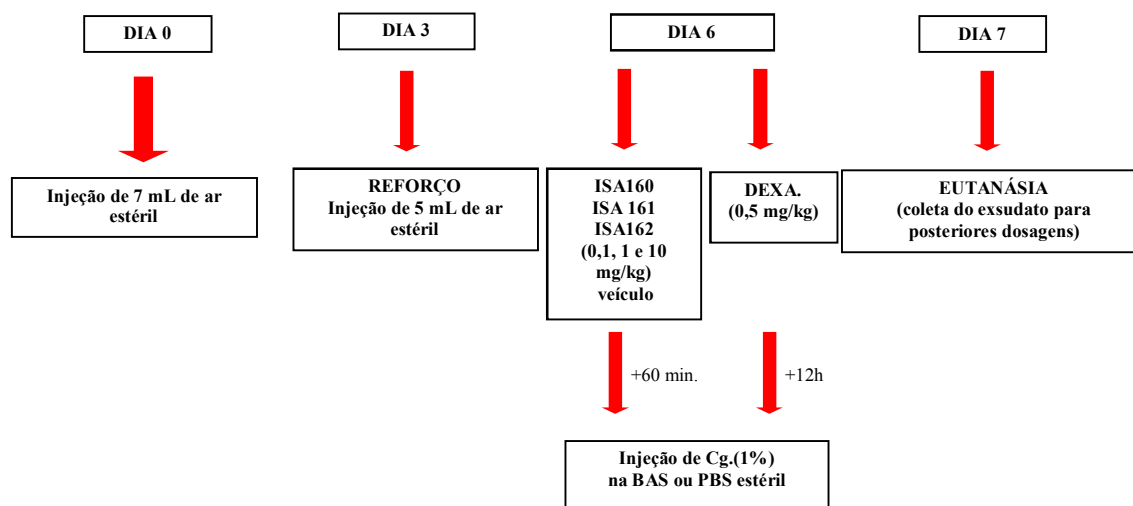
Quinze minutos antes da administração do veículo ou das ISAs 160, 161 e 162, na dose de 10 mg/kg, foram administrados por via intraperitoneal a naloxona, a atropina ou o L-NAME. Após 60 minutos do tratamento com as ISAs ou o veículo, os animais foram submetidos ao teste da formalina conforme protocolo descrito anteriormente.

3.12. Modelo da bolsa de ar subcutânea

O modelo da bolsa de ar subcutânea foi usado para avaliar o efeito das ISAs 160, 161 e 162 no processo de inflamação aguda (Romano e cols., 1997; Raymundo e cols., 2011).

De acordo com o protocolo uma bolsa de ar subcutânea (BAS) foi formada no dorso dos camundongos após a injeção de 7 mL de ar estéril. Após 3 dias, uma nova injeção de 5 mL de ar estéril foi feita para a manutenção da cavidade. No 6º dia, os animais receberam, injeção de 1 mL de carragenina (Cg) (1%) 60 minutos após serem pré-tratados com as ISAs 160, 161 ou 162. Foram separados três grupos controles, o controle negativo composto por animais tratados com o veículo 60 minutos antes da injeção de carragenina, o controle positivo composto por animais tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg), 12 horas após a injeção de carragenina e um grupo composto apenas por animais tratados com o veículo e que receberam injeção de 1 mL de PBS estéril na BAS. No 7º dia os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a cavidade foi lavada com 1 mL de PBS para a coleta do exsudato inflamatório.

Imediatamente após a coleta, a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no exsudato foi determinada em contador automático de células (pocH-100iV Diff, Sysmex). O exsudato foi centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos, a 4⁰C. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -20⁰C para posteriores dosagens de óxido nítrico (NO), proteína, citocinas e migração leucocitária. Para contagem diferencial do sangue os camundongos foram anestesiados com 10mg/g de animal de quetamina e xilasina, 100µL de sangue do olho de cada animal foram coletados e colocados em um endorfe contendo 15µL de EDTA e imediatamente foi feita a contagem no contador automático de células. Para contagem diferencial da medula, o fêmur do camundongo foi retirado e lavado com 1 mL de PBS estéril e imediatamente foi realizada a contagem no contador automático de célula. O protocolo está representado no esquema 7.



Esquema 7: Protocolo bolsa de ar subcutânea.

3.13. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi quantificada através da conversão do metabólito estável nitrato em nitrito (Bartholomew, 1984) seguida pela dosagem de nitrito (Green e cols., 1982). Brevemente, o sobrenadante do exsudato foi desproteínizado. Em seguida, misturou-se amostra, fosfato de sódio (0,5M; pH 7,2), formato de amônio (2,4 M; pH 7,2) e *E.coli*. Após incubação por 2 horas a 37⁰C, foi realizada centrifugação a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. Ao final, 100 µL do sobrenadante foram misturados com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida em água e 0,1% naftiletlenodiamina em 10% H₃PO₄), por 10 minutos (Green e cols., 1982). A absorvância foi medida no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito foi expressa em micromolar (µM) e calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio, previamente feita.

3.14. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através de kit para dosagem de proteína BCA™ (Pierce). Para a dosagem, foram misturados os reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinrônico e tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio) e B (sulfato de cobre 4%), na proporção 50:1. Em seguida, foram incubados 5 µL da amostra e 195 µL da mistura dos reagentes A e B à 37°C, por 30 minutos. A absorvância foi medida em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) a 562 nm. A concentração de proteínas foi expressa em µg/mL calculada usando uma curva padrão de albumina sérica bovina.

3.15. Dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β

Para avaliarmos a concentração de citocinas no exsudato da BAS foi utilizado o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) através de Kits específicos (B&D) para cada citocina.

Imunoplaquetas de 96 poços foram recobertas e incubadas por 18h a 4°C com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-1 β e diluídos no tampão diluente. Após o período de incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com tampão de bloqueio. Em seguida, foram novamente lavadas com tampão de lavagem e adicionados 50 μ L das amostras ou o padrão específico de citocina recombinante (preparado no tampão de bloqueio). As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e posteriormente foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo de detecção conjugado com a enzima. Após a lavagem das placas, a adição da solução de substrato e a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, foi adicionado H₃PO₄ 1N (25 μ L/poço) como solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando-se um leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) e as concentrações das citocinas foram calculadas através da curva padrão de citocinas e expressas em pg/mL.

3.16. Análise Estatística

Os grupos experimentais foram compostos por 5 a 7 animais, selecionados aleatoriamente. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão (D.P.). A significância estatística entre os grupos foi calculada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Valores de p menores de 0,05 foram usados como indicador de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos análogos da convolutamidina A no modelo da formalina

A injeção intra-plantar de formalina (2,5%) desencadeia uma resposta algésica dividida em duas fases distintas. A 1ª fase (fase neurogênica) ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina e a 2ª fase (fase inflamatória) ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina.

Os resultados apresentados no gráfico 1 mostram o efeito das ISAs 160, 161 e 162 (0,1, 1 e 10 mg/kg) na resposta de lambedura da pata na primeira fase da formalina. No grupo de animais tratados oralmente com o veículo, o tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata foi de $45,8 \pm 2,3$ segundos. No grupo pré-tratado com ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg, controle positivo), o tempo obtido foi de $41,7 \pm 1,4$ segundos, não havendo diferença com o grupo controle (veículo). O grupo de animais pré-tratado com a Convolutamidina A (10 mg/kg) para comparação com os demais derivados, também não apresentou redução no tempo de resposta de lambedura. Em relação ao pré-tratamento por via oral dos animais com os 3 derivados, todos demonstraram redução no tempo que os animais permaneceram lambendo a pata. Com as ISAs 162 e 161 a redução mais importante ocorreu na menor dose, 0,1 mg/kg, enquanto que o melhor resultado obtido com a ISA 160 foi com a dose de 1 mg/kg.

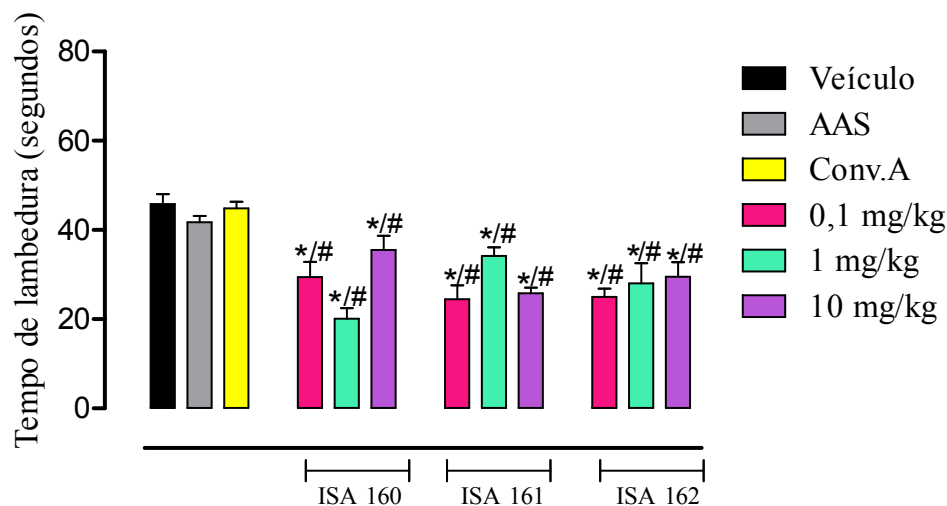


Gráfico 1: Efeito dos análogos da convolutamidina A (ISAs 160,161 e 162) na 1ª fase da resposta da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), convolutamidina A (10 mg/kg) ou as ISAs (0,1, 1 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção 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=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ foi calculada comparando os grupos pré-tratados com as ISAs ou AAS com o grupo pré-tratado com veículo (*), ou comparando os grupos pré-tratados com as ISAs com o grupo pré-tratado com AAS (#), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

Durante a fase inflamatória (2ª fase), os animais pré-tratados oralmente com o veículo apresentaram um tempo de resposta de $145,4 \pm 14,6$ segundos. Já nos animais pré-tratados com AAS, o tempo obtido foi de $64,2 \pm 1,5$ segundos, correspondendo a uma inibição de 55,8% na resposta. O pré-tratamento com a convolutamidina A (10 mg/kg) causou uma redução no tempo de resposta de, aproximadamente 30% ($101,7 \pm 8,2$ segundos). O grupo pré-tratado com a ISA 160 apresentou uma redução no tempo de resposta dose-dependente. Na dose de 10 mg/kg o tempo de redução da resposta foi de aproximadamente 88%, enquanto o AAS inibiu o tempo de lambedura em 55,8% comparados ao grupo que recebeu

apenas veículo. Já o grupo pré-tratado com a ISA 161 e a ISA 162 a redução no tempo de resposta ocorreu nas três doses testadas sendo a dose de 10 mg/kg mais ativa em ambos, com uma redução de 34,5% e 60,6% respectivamente.

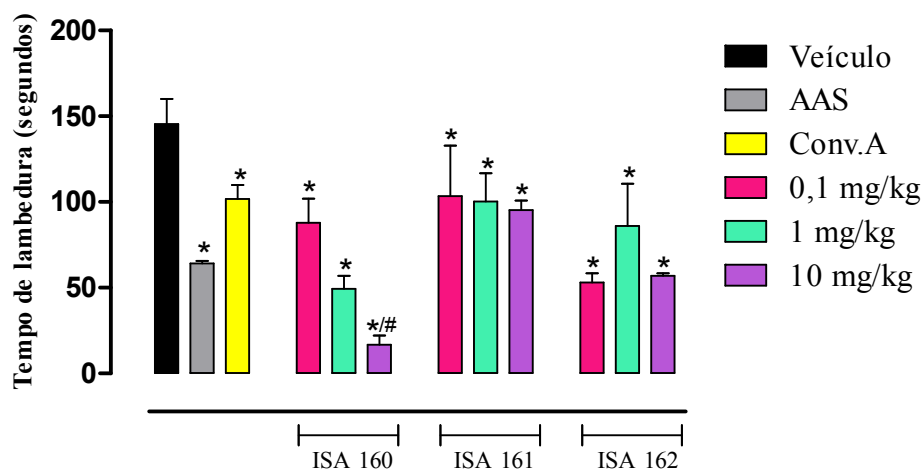


Gráfico 2: Efeito dos análogos da convolutamidina A (ISAs 160,161 e 162) na 2ª fase da resposta da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), convolutamidina A (10 mg/kg) ou as ISAs (0,1, 1 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção 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=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ foi calculada comparando os grupos pré-tratados com as ISAs ou AAS com o grupo pré-tratado com veículo (*), ou comparando os grupos pré-tratados com as ISAs com o grupo pré-tratado com AAS (#), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.2. Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de retirada de cauda

Pelo fato dos derivados terem demonstrado um efeito antinociceptivo (como observado na primeira fase da resposta à formalina) resolvemos avaliar se os derivados também teriam efeito antinociceptivo através do envolvimento de mecanismos nociceptivos espinhais. Para tanto utilizamos o modelo da retirada da cauda. Neste modelo o estímulo térmico é capaz de desencadear uma resposta reflexa caracterizando o envolvimento de mecanismo de reflexo espinhal (Jones, 1996). De acordo com o protocolo, a ação antinociceptiva foi padronizada como o tempo (em segundos) no qual os animais levaram para manifestar o reflexo de retirada de cauda (denominado como tempo de latência) após esta ter sido imersa em um banho-maria com água aquecida a $50^0 \pm 1^0C$.

O pré-tratamento oral dos animais com a ISA 160, apresentou aumento significativo no tempo de resposta dos animais nas três doses testadas. A dose de 1 mg/kg teve um pico máximo de resposta no período de 80 minutos após a administração e coincidiu com o pico máximo do grupo pré-tratado com morfina (2,5 mg/kg) sendo o aumento em relação à linha de base de 143% para o grupo pré-tratado com ISA 160 e 172% para o grupo pré-tratado com morfina (gráfico 3).

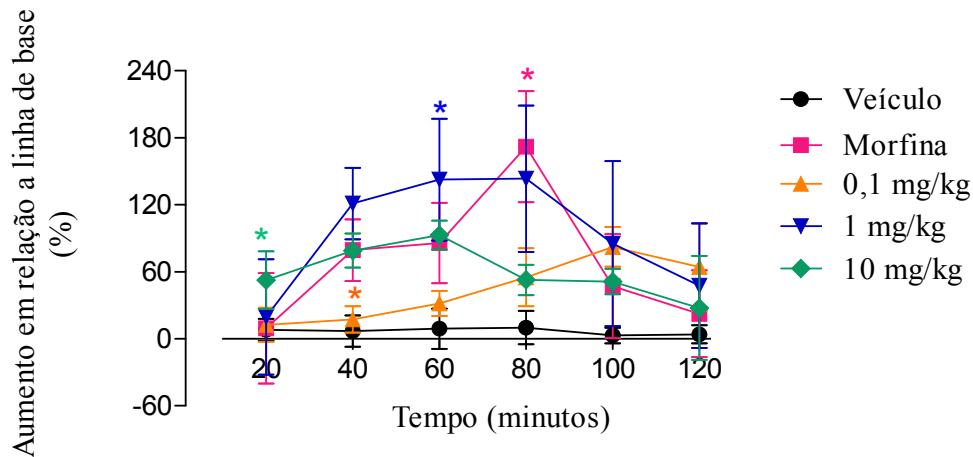


Gráfico 3: Efeito da ISA 160 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA 160 (0,1, 1 e 10 mg/kg), ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 160 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

Para melhor visualizarmos os resultados mostrados anteriormente convertimos os valores do gráfico em linhas para gráfico de área sob a curva (ASC). Podemos observar que o pré-tratamento com qualquer uma das três doses (0,1, 1 ou 10 mg/kg) da ISA 160 aumentou significativamente o valor de ASC em relação ao controle. É importante salientar que mesmo na menor dose utilizada do análogo da convolutamidina A, o resultado da ASC foi similar àquele da morfina (Gráfico 4).

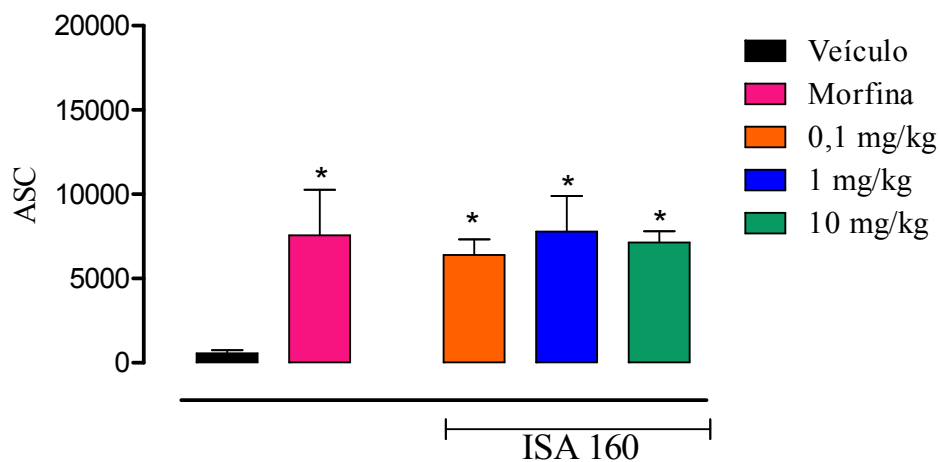


Gráfico 4: Efeito da ISA 160 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA (0,1, 1 e 10 mg/kg) ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7) dos valores de área sob a curva (ASC). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 160 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

O efeito da ISA 161 foi significativo logo após 20 minutos da administração oral para as três doses testadas. O pico máximo de efeito na dose de 0,1, 1 e 10 mg/kg foi no período de 120, 100 e 60 minutos com uma porcentagem de aumento em relação a linha de base de 82%, 143% e 92,1% respectivamente (gráfico 5).

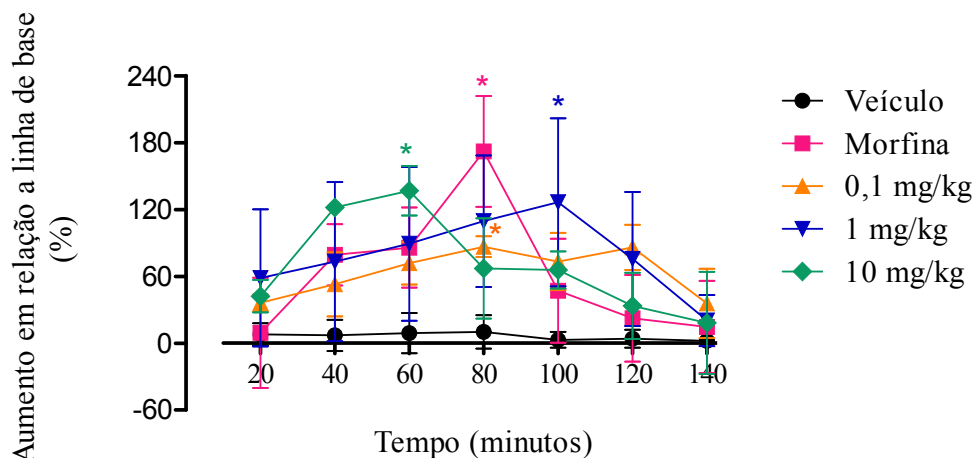


Gráfico 5: Efeito da ISA 161 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA 161 (0,1, 1 e 10 mg/kg), ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 161 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

Os valores representados no gráfico da ASC mostram que os animais pré-tratados com a ISA 161, nas três doses, apresentaram um aumento na área sob a curva em relação ao controle. Os valores da ASC das três doses foram de 8.129, 10.269, 9.164 respectivamente, sendo esses valores próximos a ASC apresentada pelo grupo pré-tratado com morfina de 9.804 (Gráfico 6).

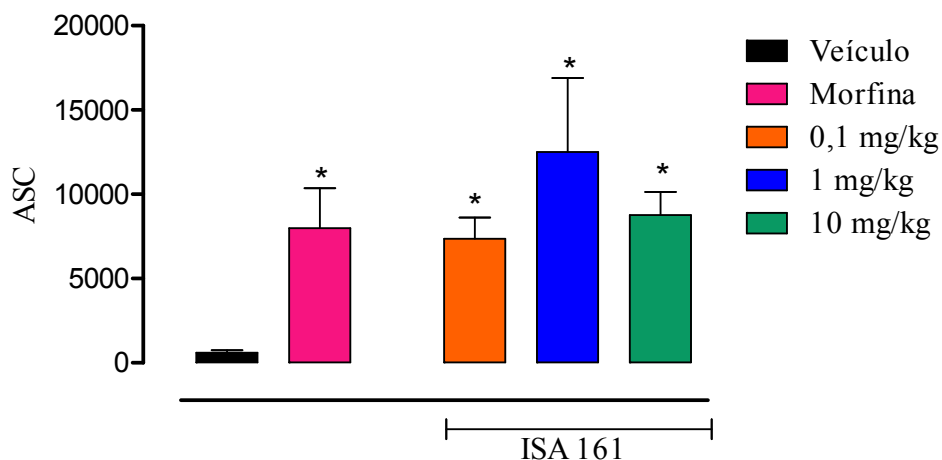


Gráfico 6: Efeito da ISA 161 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA (0,1, 1 e 10 mg/kg, v.o) ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7) dos valores de área sob a curva (ASC). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 161 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

Em relação ao efeito antinociceptivo da ISA 162, as três doses foram capazes de causar aumento em relação à linha de base. O pico de efeito máximo ocorreu após 40 minutos, para as doses de 0,1 e 1 mg/kg, e 80 minutos na dose de 10 mg/kg, com valores de 94,7%, 133,1% e 157,1% respectivamente (gráfico 7).

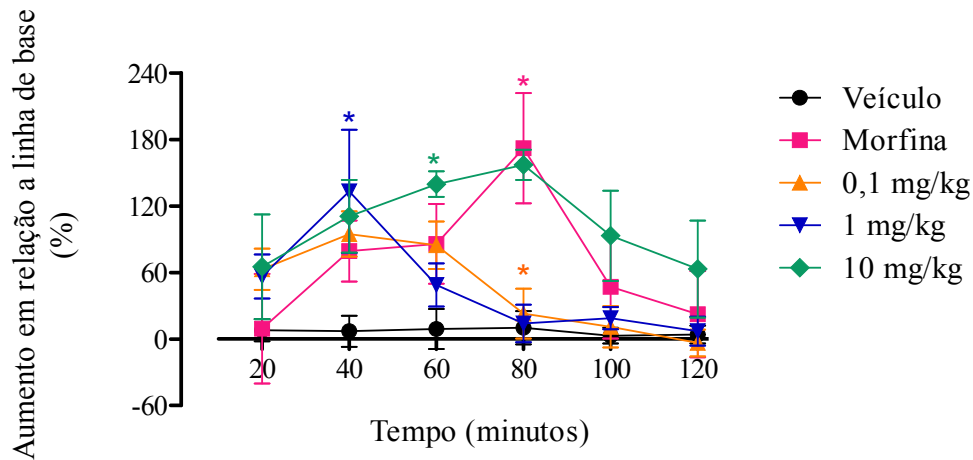


Gráfico 7: Efeito da ISA 162 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA 162 (0,1, 1 e 10 mg/kg), ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 162 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

De acordo com o gráfico 8, a ISA 162 foi capaz de aumentar a ASC nas três doses testadas. Os valores de ASC referentes às doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg foram 5.022, 4.956 e 12.308 respectivamente, sendo esses valores próximos ao apresentado pelo grupo pré-tratado com a morfina que foi de 9.804.

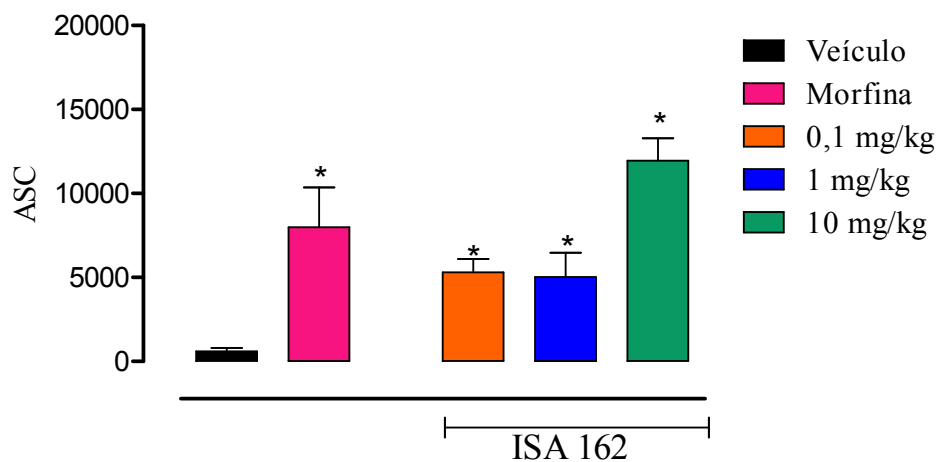


Gráfico 8: Efeito da ISA 162 no modelo de retirada de cauda. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ISA (0,1, 1 e 10 mg/kg) ou morfina (2,5 mg/kg, i.p). Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7) dos valores de área sob a curva (ASC). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA 162 ou morfina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.3. Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo da placa quente

Como os três derivados apresentaram efeito antinociceptivo periférico (modelo da formalina) e espinhal (modelo da retirada da cauda) decidimos avaliar, através do modelo da placa quente, se o efeito apresentado pelas ISAs poderia envolver mecanismos nociceptivos supra-espinhais. Nesse modelo o animal tenta retirar a pata da superfície aquecida ou lambê-la como consequência da ativação do córtex somatossensorial (Sahley and Berntson, 1979).

Os animais foram pré-tratados com as ISAs nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg. Os valores foram comparados aos valores apresentados pela morfina (analgésico opioide) bem como aos valores demonstrados pelo grupo pré-tratado somente com veículo. De acordo com o gráfico 9 nenhum dos derivados apresentaram efeito antinociceptivo central supraespinhal. Os valores são representados em percentual de aumento em relação a linha de base e ASC.

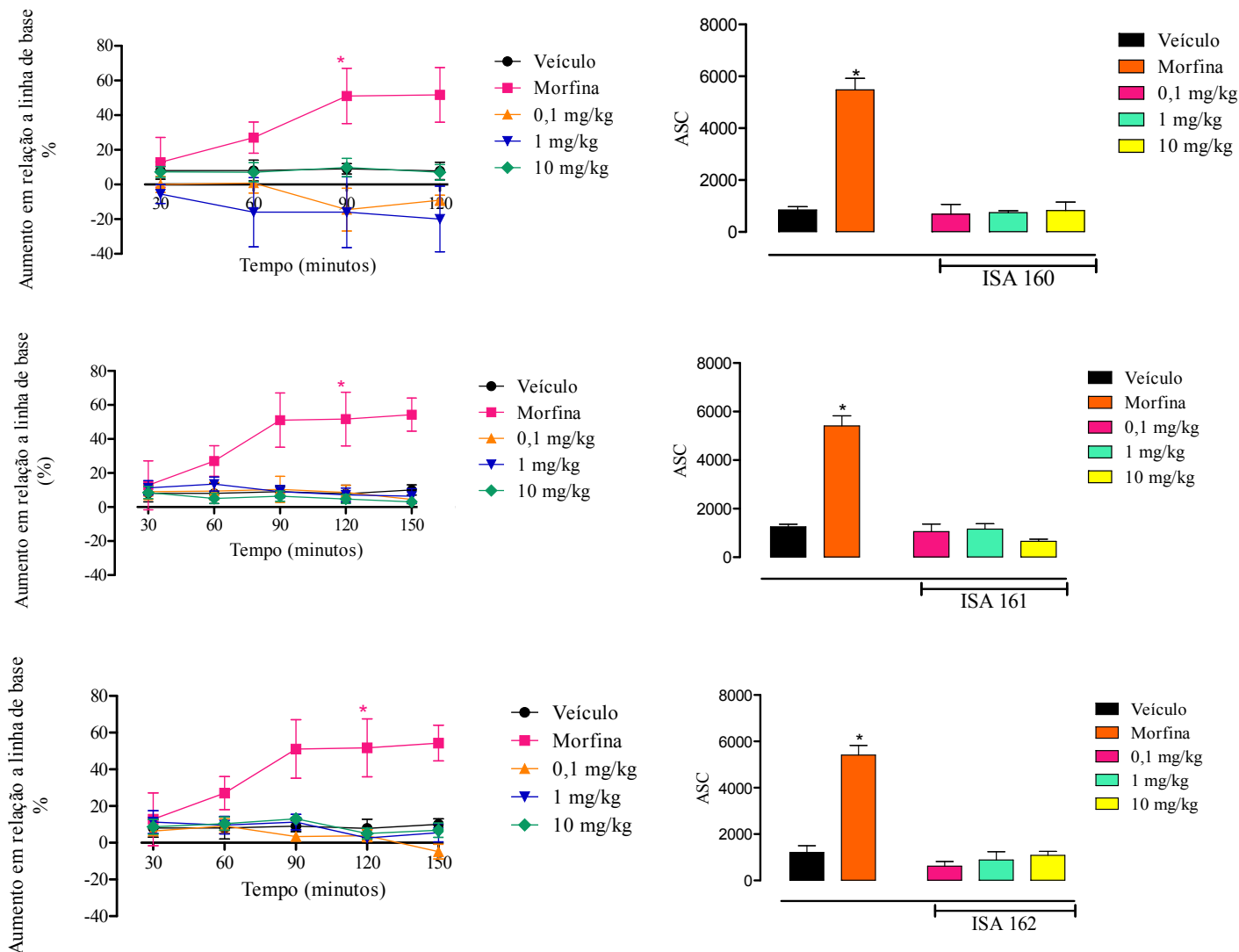


Gráfico 9: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, ou as ISAs (0,1, 1 e 10 mg/kg ou morfina (2,5 mg/kg, i.p.) Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs ou morfina e (*) por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.4. Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

A capsaicina estimula receptores TRPV-1 e medeia a liberação de vários neurotransmissores, incluindo substância P e glutamato, a partir de terminais periféricos e centrais de neurônios sensoriais primários. Essa estimulação pode contribuir para o processamento nociceptivo (Medvedeva e cols., 2008). Assim, para avaliarmos se haveria envolvimento de receptores vaniloides TRPV-1, no efeito antinociceptivo das ISAs 160, 161 e 162, foi utilizado o modelo da nociceção induzida pela capsaicina como descrito por Sakurada e cols. (1992).

Os resultados obtidos no modelo da capsaicina (gráfico 10) mostram que o grupo pré-tratado com o veículo teve uma resposta nociceptiva de lambertura da pata de 97,6 segundos. Quando foi administrado a capsazepina (antagonista da vaniloide), 10 nmol/pata), o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata foi reduzido em torno de 68%. Os derivados da convolutamidina A também reduziram o tempo de lambertura nas 3 doses testadas sendo a dose de 1 mg/kg mais ativa para as ISAs 160 e 161 enquanto a dose de 10 mg/kg da ISA 162 apresentou maior redução quando comparados ao grupo pré-tratado com o veículo.

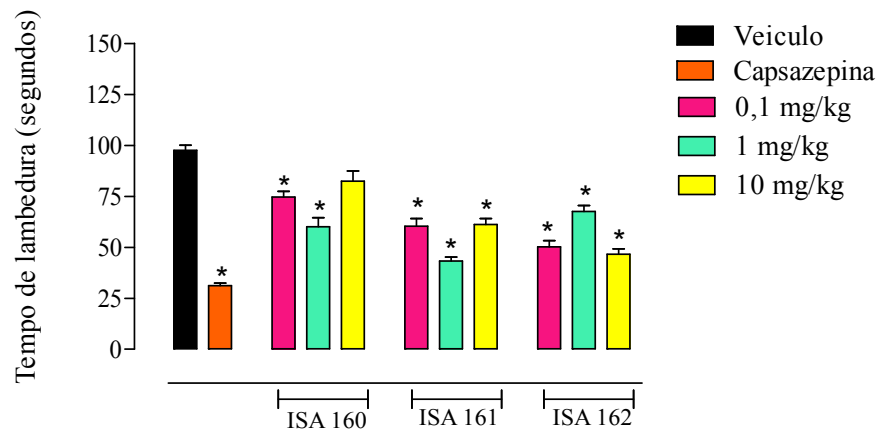


Gráfico 10: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (5 nmol). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, ou as ISAs (0,1, 1 e 10 mg/kg) 60 min. antes da injeção de capsaicina. Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA ou capsazepina e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.5. Efeito dos análogos da convolutamidina A no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

É bem estabelecido que o glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios envolvido na transmissão de sinais nociceptivos (Jancso, 1978; Ju e cols. 1987; Beirith e cols., 2002). Com o objetivo de investigar se a via glutamatérgica também participaria no efeito antinociceptivo das ISAs 160, 161 e 162, foi avaliado se o pré-tratamento com esses três derivados seria capaz de reverter o efeito nociceptivo da injeção intraplantar do glutamato.

Conforme apresentado no gráfico 11, o pré-tratamento com os derivados nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg causou redução significativa no tempo de lambedura na pata que recebeu injeção de glutamato. Na dose de 10 mg/kg a ISA 160 apresentou uma redução de 75% no tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, enquanto as ISAs 161 e 162 mostraram uma redução no tempo de resposta de lambedura de 72% e 64% respectivamente, quando comparadas ao grupo tratado com veículo. Na dose de 1 e 0,1 mg/kg a diminuição no tempo de resposta foi de pelo menos 70% para as ISAs 161 e 162. A ISA 160 teve uma diminuição no tempo de lambedura em apenas 28% para dose de 0,1 mg/kg e 24% para dose de 1 mg/kg.

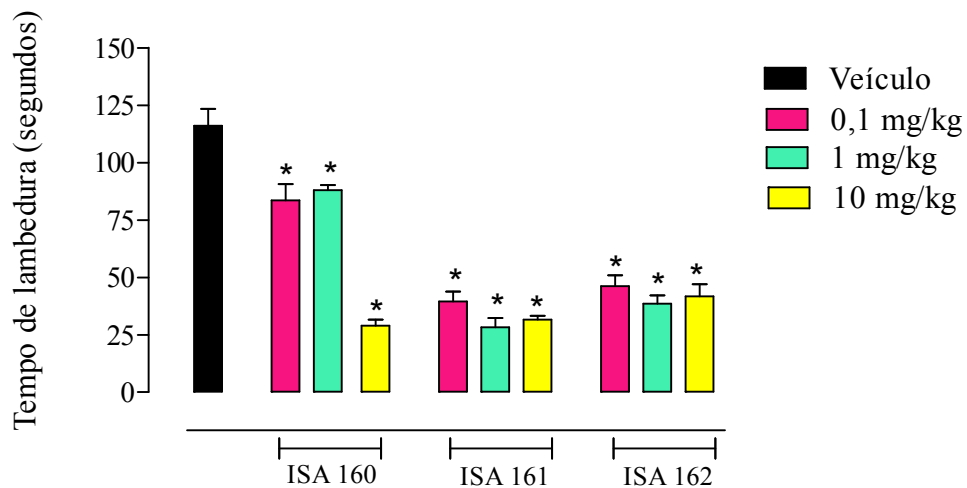


Gráfico 11: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, ou a ISA (0,1, 1 e 10 mg/kg) 60 min. antes da injeção de glutamato. Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.6. Investigação do mecanismo de ação antinociceptivo

Pelo fato das ISAs 160, 161 e 162 terem demonstrado importante ação antinociceptiva, foi investigado a relação dessa ação com três sistemas endógenos envolvidos tanto na transmissão do impulso nociceptivo como na ativação de vias que participam do controle da nocicepção. Assim, foram administrados por via intraperitoneal os antagonistas, naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides, 1 mg/kg) ou atropina (antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos, 1 mg/kg) ou o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (N-nitro-L-arginina metil éster, L-NAME, 3 mg/kg), 15 minutos antes da administração oral dos três derivados (na dose de 10 mg/kg). O efeito foi avaliado no modelo da formalina.

4.6.1. Investigação do envolvimento do sistema opioide

De acordo com os resultados apresentados no gráfico 12, o grupo pré-tratado com o veículo teve um tempo de lambertura de $45,8 \pm 2,3$ segundos na fase 1 e $141,4 \pm 16,1$ segundos na fase 2, o tratamento com naloxona não alterou os parâmetros. Contudo, na 1ª fase, a administração da naloxona preveniu o efeito antinociceptivo dos análogos, demonstrado pela redução da reposta de lambertura da pata. Já na 2ª fase, o antagonista opioide reverteu o efeito antinociceptivo apenas da ISA 160 e da ISA 162.

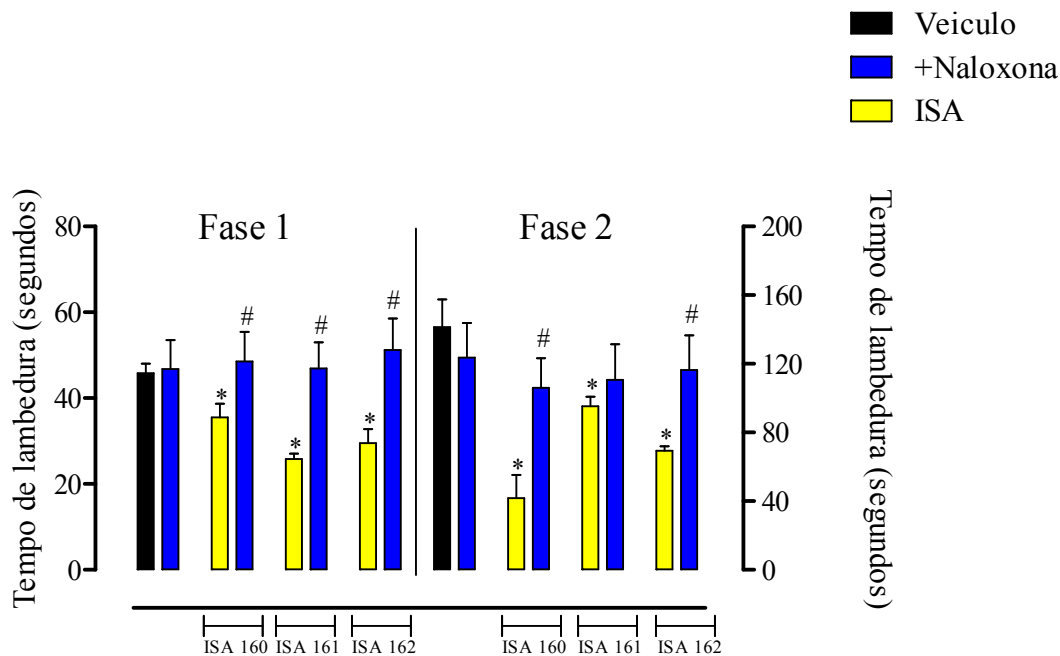


Gráfico 12: Avaliação da participação do sistema opioide sobre a antinocicepção das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da formalina (fase 1 e fase 2). Os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes da administração oral das ISAs. Os resultados são expressos como média ± d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=5-7). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni entre os grupos pré-tratados com os análogos e o grupo pré-tratado com o veículo (*) ou grupos pré-tratados com naloxona antes da administração do análogo e o grupo tratado com o respectivo análogo (#).

4.6.2 Investigação do envolvimento do sistema colinérgico

Os resultados obtidos na avaliação do envolvimento do sistema colinérgico mostram que a administração intraperitoneal da atropina foi capaz de prevenir esse tempo de resposta na primeira fase apenas no grupo pré-tratado com a ISA 161. Enquanto que na segunda fase o antagonista não preveniu o efeito antinociceptivo da ISA 161, entretanto a diminuição do tempo de resposta dos grupos pré-tratados com a ISA 160 e ISA 162 foi prevenido pela administração da atropina (gráfico 13).

Gráfico 13: Avaliação da participação do sistema colinérgico muscarínico sobre a antinociceção das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da formalina (fase 1 e fase 2). Os animais foram pré-tratados com atropina (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes da administração oral das ISAs. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=5-7). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni entre os grupos pré-tratados com os análogos e o grupo pré-tratado com o veículo (*) ou grupos pré-tratados com atropina antes da administração do análogo e o grupo tratado com o respectivo análogo (#).

4.6.3 Investigação da participação do sistema nitrérgico

O gráfico 14 mostra que o pré-tratamento com os três derivados da convolutamidina na fase 1, apenas o grupo de animais pré-tratados com a ISA 161 demonstrou prevenção do efeito antinociceptivo após a administração do L-NAME. Entretanto, durante a fase 2, o inibidor da enzima NO sintase, foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo apresentado pelos três derivados.

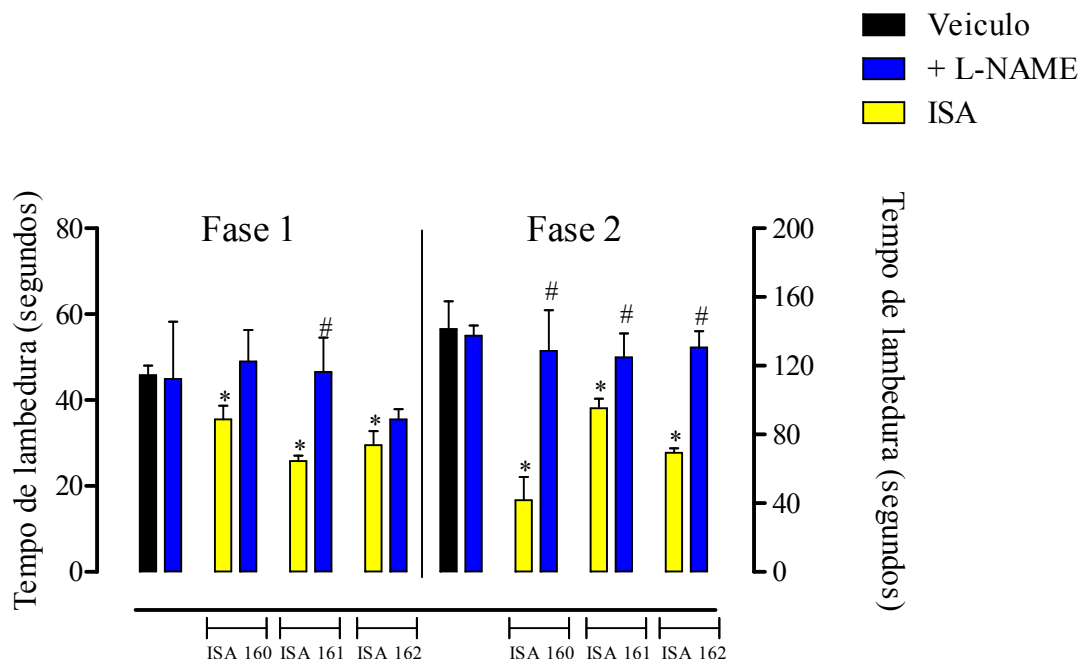


Gráfico 14: Avaliação da participação do sistema nitrérgico sobre a antinociceção das ISAs 160, 161 e 162 no modelo da formalina (fase 1 e fase 2). Os animais foram pré-tratados com L-NAME (3 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes da administração oral das ISAs. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=5-7). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni entre os grupos pré-tratados com os análogos e o grupo pré-tratado com o veículo (*) ou grupos pré-tratados com L-NAME antes da administração do análogo e o grupo tratado com o respectivo análogo (#).

4.7. Efeito anti-inflamatório no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS)

Devido os quatro derivados da convolutamidina A terem apresentado resposta na segunda fase da resposta à formalina decidimos avaliar os seus efeitos no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS). Tal modelo envolve migração celular, o extravasamento plasmático e a produção de inúmeros mediadores e diversas citocinas, o que permite investigar potencial anti-inflamatório de vários compostos (Okudaira e Shuwarz, 1962; Clark, 1975; Vigil e cols., 2008).

4.7.1. Contagem total de células

Vinte e quatro horas após a injeção da carragenina (1%) na BAS, o primeiro parâmetro avaliado foi da migração celular (gráfico 15). De acordo com os resultados apresentados, a injeção de carragenina na BAS nos animais pré-tratados oralmente com o veículo causou, após 24 horas, um aumento significativo no número de leucócitos totais na cavidade ($72,1 \pm 11,1 \times 10^6$ células/mL) em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS ($1,2 \pm 0,9 \times 10^6$ células/mL). Já os animais que foram pré-tratados intraperitonealmente com o anti-inflamatório dexametasona (0,5 mg/kg), 12 horas antes da injeção de carragenina na BAS, foi observada uma redução de 48,4% no número total de células ($37,2 \pm 4,8 \times 10^6$ células/mL) que migraram para a cavidade. Nos grupos que receberam o pré-tratamento com as ISAs 160, 161 e 162, observamos que a ISA 160 reduziu o número de células apenas na dose de 1 mg/kg. A ISA 161 reduziu o infiltrado celular nas três doses utilizadas sendo a dose de 1 mg/kg a mais ativa, e com a ISA 162 a diminuição leucocitária ocorreu apenas nas duas maiores doses.

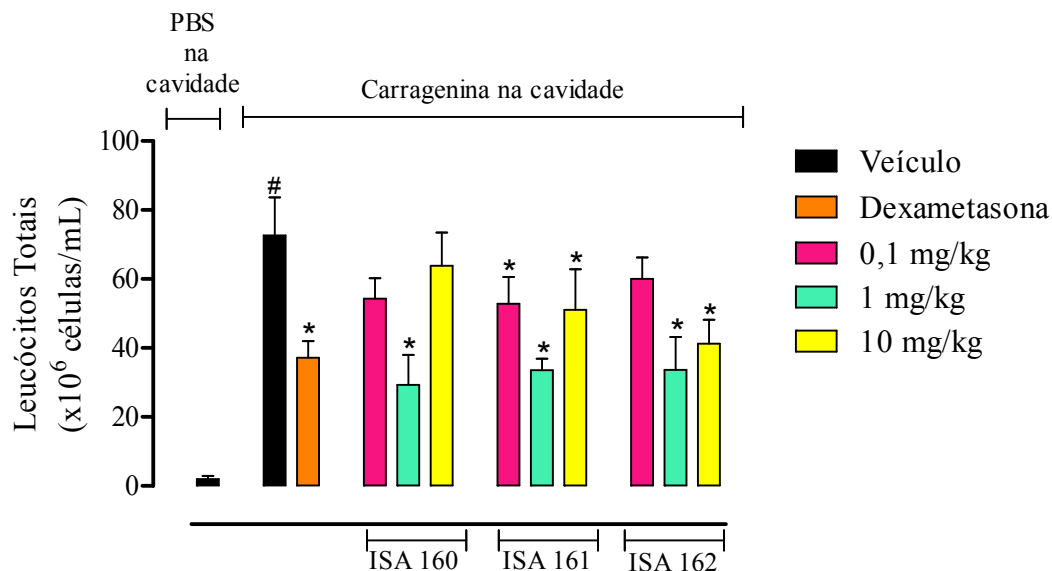


Gráfico 15: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na migração de células induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), ou com as ISAs nas doses (0,1, 1 e 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente (i.p) com dexametasona (0,5 mg/kg) 12 horas antes a injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^6/\text{mL}$) ($n=5-7$). A significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. * quando comparados os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

Para avaliar se o efeito das ISAs 160, 161 e 162 sobre a migração celular devia-se à inibição no processo de transmigração da célula da circulação sanguínea para a BAS, ou diminuição das células na medula, por efeito tóxico, foi realizada a contagem total dos leucócitos do sangue e da medula dos animais tratados com os derivados na dose de 10 mg/kg

Os resultados apresentados no gráfico 16 não mostraram diferenças significativas com relação ao número de leucócitos totais do sangue e da medula entre os grupos pré-tratados com os três derivados e os respectivos controles

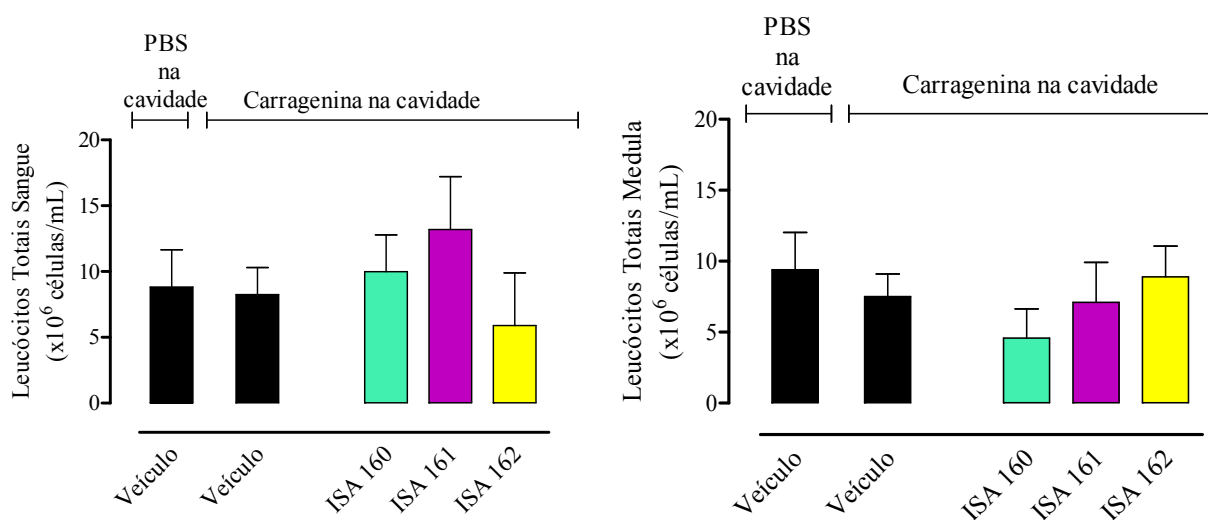


Gráfico 16: Contagem total de leucócitos do sangue e medula. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada) ou ISAs 160, 161 e 162 (10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média ± d.p. do número de leucócitos totais (n= 4-7). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.7.2. Quantificação de proteínas totais

Um dos eventos que ocorre após a injeção da carragenina na BAS é o aumento da permeabilidade vascular que favorece o extravasamento de proteínas plasmáticas do sangue para a BAS.

No gráfico 17, o grupo dos animais pré-tratados com veículo e que recebeu a injeção de PBS na cavidade, foram quantificadas $18,3 \pm 5,2$ mg/mL de proteínas totais enquanto no exsudato inflamatório dos animais que receberam injeção de carragenina, foram quantificadas $304,9 \pm 38,2$ mg/mL de proteínas. Nos animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg), 12 horas antes da injeção da carragenina na BAS, a concentração de proteína foi $139,7 \pm 18,2$ mg/mL, portanto um percentual de inibição de 54,2% quando comparado ao grupo pré-tratado com veículo e que recebeu carragenina na BAS. Considerando os grupos de animais pré-tratados com os três derivados e injetados com carragenina na BAS, apenas as ISAs 160 e 162 na dose de 1 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a concentração de proteínas totais sendo essa inibição de 43,5% e 36,2%, respectivamente.

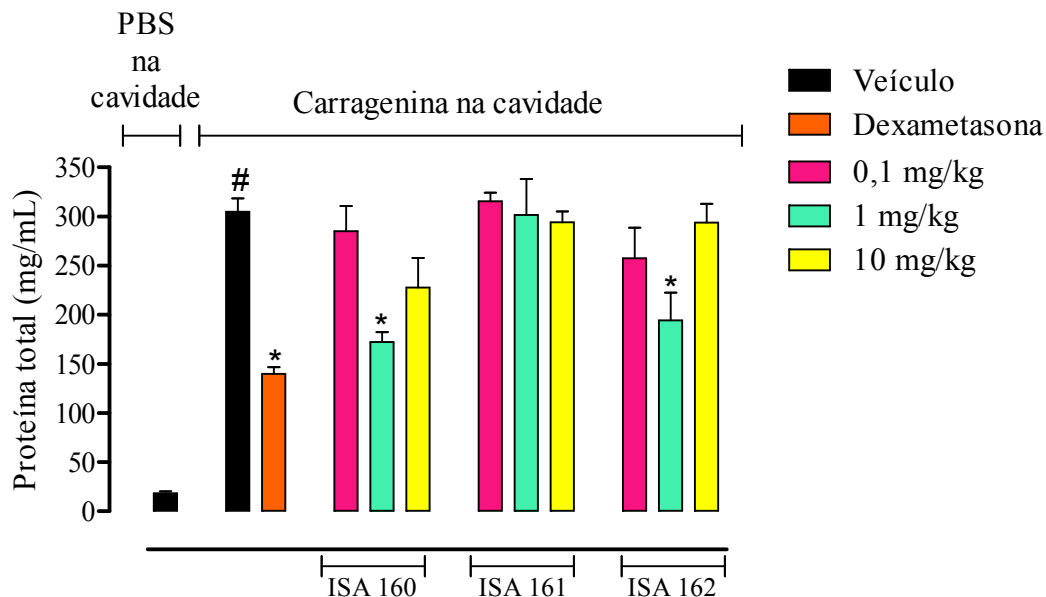


Gráfico 17: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada) ou com as ISAs (0,1 a 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 12 horas antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de proteínas plasmáticas totais (mg/mL) (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. * quando comparados os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

4.7.3. Quantificação de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um importante mediador que regula diversos eventos do processo inflamatório (Rossi e cols., 2003).

No grupo injetado com PBS na cavidade e pré-tratado com veículo, a concentração de NO no lavado da cavidade foi de $11,9 \pm 5,4 \mu\text{M}$, enquanto o grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo foi de $172,3 \pm 16,6 \mu\text{M}$. Em animais que foram administrados intraperitonealmente com a dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$), 12 horas antes da injeção de carragenina na BAS, houve uma inibição de 57,1% na concentração de NO ($73,8 \pm 3,1 \mu\text{M}$) em relação ao grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo. O grupo de animais que recebeu tratamento com a ISA 160 apresentou uma redução significativa na produção de NO nas duas maiores doses, enquanto a ISA 161 diminuiu a produção de NO no lavado da BAS apenas na dose de 10 mg/kg e a ISA 162 somente na dose de 1 mg/kg , (gráfico 18).

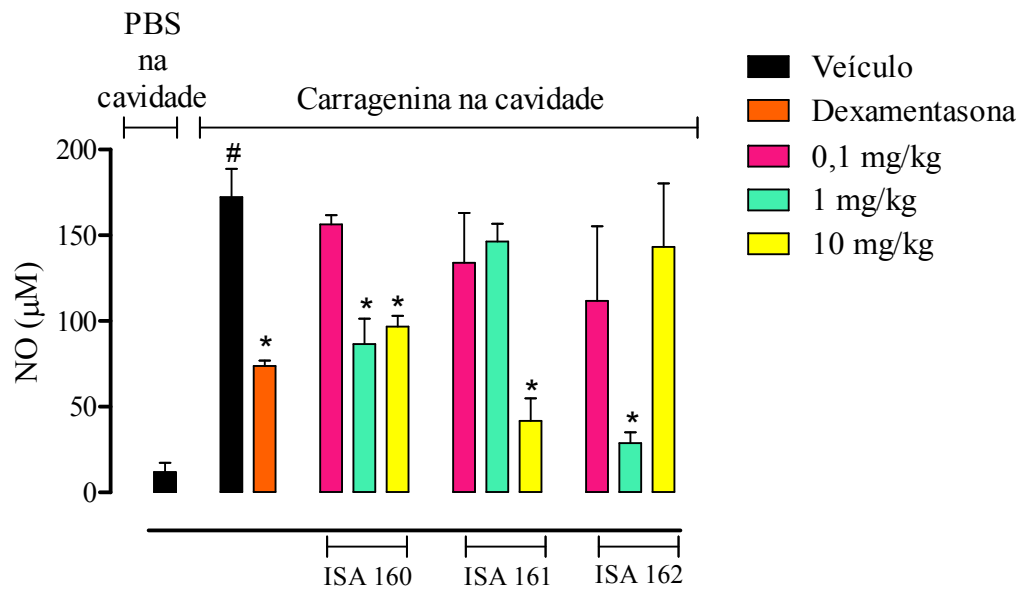


Gráfico 18: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na produção de óxido nítrico (NO) induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada) ou com as ISAs nas doses 0,1 a 10 mg/kg, 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados i.p.com dexametasona (0,5 mg/kg) 12 horas antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de NO (μ M) (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. * quando comparados os grupos tratados com as ISAs ou dexametasona e o veículo e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

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

Após a injeção de carragenina na BAS, além da liberação de alguns mediadores inflamatórios, há também a liberação de diversas citocinas e essas também estão envolvidas na evolução do processo inflamatório. Assim, foi avaliado se as ISAs 160, 161 e 162 seriam capazes de alterar a produção de algumas citocinas produzidas durante a resposta inflamatória, induzida por carragenina.

A concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato inflamatório da BAS nos animais tratados oralmente com o veículo e que receberam injeção de carragenina na cavidade, apresentou-se elevada (gráficos 19 e 20). O grupo de animais pré-tratados com veículo e que foi injetado PBS na BAS, apresentou uma concentração de $57,9 \pm 7,5$ pg/mL de TNF- α na BAS, enquanto os animais tratados com veículo e que tiveram carragenina injetada na BAS a concentração de TNF- α no exsudato inflamatório foi de $442,5 \pm 145,4$ pg/mL. O pré-tratamento com a ISA 160 no grupo injetado com carragenina na BAS apresentou uma redução na concentração de TNF- α no exsudato nas maiores doses, de 1 e 10 mg/kg, enquanto a ISA 161 apresentou diminuição nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, e a ISA 162 somente na dose de 10 mg/kg foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α no lavado da BAS (gráfico19).

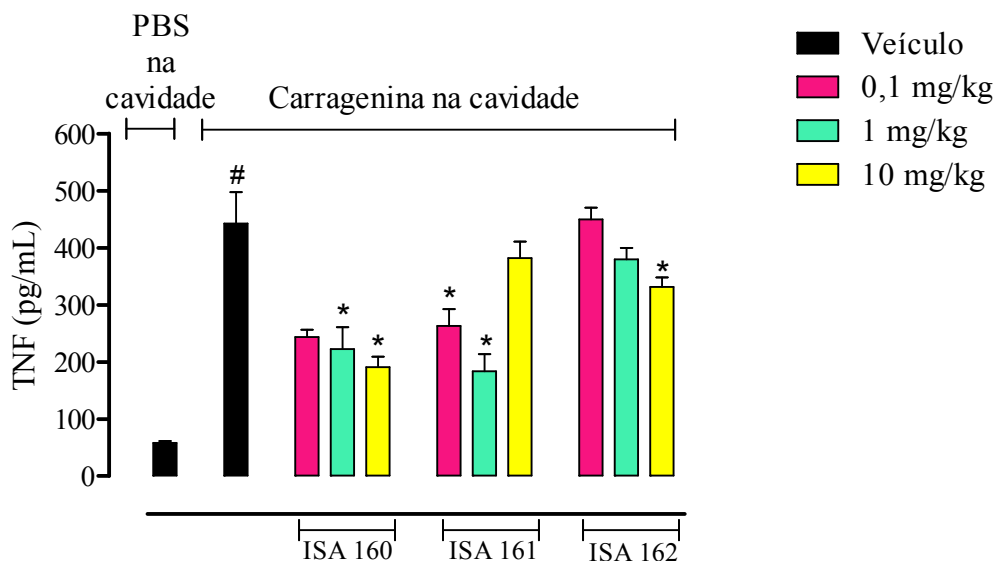


Gráfico 19: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na produção de TNF- α induzida por carragenina na BAS.

Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada) ou ISAs (0,1 a 10 mg/kg) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de TNF- α (pg/mL) (n= 4-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. * quando comparados os grupos tratados com as ISAs e o veículo e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

A produção de IL-1 β , apresentada no gráfico 20 mostra que o grupo de animais pré-tratados com veículo e que recebeu a injeção de PBS na cavidade apresentou uma concentração de $69,4 \pm 21,4$ pg/mL da citocina. Por outro lado, no exsudato inflamatório da BAS dos animais tratados oralmente com veículo e que receberam injeção de carragenina na cavidade foram quantificadas $1.256,8 \pm 141,2$ pg/mL de IL-1 β . O pré-tratamento com a ISAs 160 e 161 reduziu a concentração de IL-1 β apenas na menor dose com uma inibição de 63,5% e 65,7%, respectivamente.

Já o pré-tratamento com ISA 162 no grupo de animais injetados carragenina na BAS reduziu a concentração de IL-1 β tanto na dose de 0,1 mg/kg quanto na dose de 1 mg/kg apresentando uma inibição de 62,9% e 59,2% respectivamente.

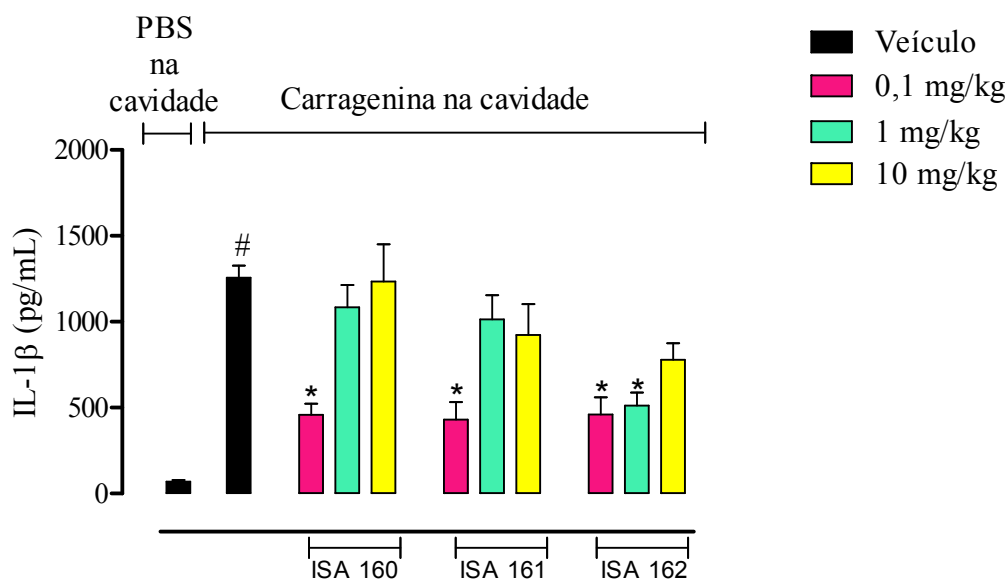


Gráfico 20: Efeito das ISAs 160, 161 e 162 na produção de IL-1 β induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada) ou ISAs (0,1 a 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de IL-1 β (pg/mL) (n= 4-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. . * quando comparados os grupos tratados com as ISAs e o veículo e # quando comparados os grupos veículo e o grupo que recebeu PBS na cavidade.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho nossos objetivos eram de investigar uma possível atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de três novos análogos da convolutamidina A.

A convolutamidina A é uma substância que pode ser encontrada na natureza, é membro da família de alcaloides oxindólicos e que apresenta o esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxiindol. Por apresentar promissoras ações biológicas e devido ao baixo rendimento no isolamento, em 1997, Garden e colaboradores descreveram, pela primeira vez, uma rota sintética para a molécula. Dessa forma, o grupo liderado pelo prof. Angelo C. Pinto (Instituto de Química, UFRJ) sintetizou a convolutamidina A e vários análogos inéditos.

Dando início ao nosso estudo, o primeiro modelo utilizado foi o da formalina. Foi demonstrado que a injeção de formalina pode ativar diretamente nociceptores presentes em axônios não mielinizados, como p. ex. fibras C, e pouco mielinizados, como as fibras A δ . Além disso, também é capaz de degranular mastócitos, causando a liberação de histamina e serotonina (Parada e cols., 2001). Esses mediadores, por sua vez, ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como SP, neurocinina A, neurocinina B e CGRP, nos terminais periféricos dos aferentes primários (Santos e Calixto, 1997), assim como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (Omote e cols., 1998). Desta maneira, acredita-se que este conjunto de mediadores químicos parece ser o responsável pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção da formalina (Milano, 2008)

Também foi mostrado, através de estudo de microdiálise, que a injeção intraplantar de formalina causa um aumento significativo de glutamato e PGE₂ durante a segunda fase do processo doloroso (Malmberg e Yaksh, 1995). Portanto, o modelo da formalina é útil para detectar a dor do tipo inflamatória e não inflamatória.

Fármacos analgésicos possuem ações diferentes na primeira e na segunda fase do teste da formalina. Os opioides possuem ação central e inibem as duas fases similarmente. Por outro lado, fármacos com ação periférica, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e

glicocorticoides, inibem somente a segunda fase (Hunskaar e cols., 1985; Hunskaar e Hole, 1987).

Nossos resultados mostram que os análogos da convolutamidina A (as ISAs) administrados por via oral nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, inibiram a primeira fase do modelo da formalina sugerindo uma atividade antinociceptiva que pode ser decorrente tanto da atuação direta em receptores opioides ou ainda, inibição da liberação de mediadores como serotonina, SP, cininas, histamina e CGRP. Além disso, os três análogos também reduziram o tempo de resposta na segunda fase nas três doses testadas, o que pode indicar uma inibição na formação e/ou liberação de mediadores como citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e óxido nítrico (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006).

Assim, os resultados obtidos no modelo da formalina indicam que as ISAs 160, 161 e 162 são efetivas não apenas na redução da dor neurogênica como também da dor inflamatória, podendo estar envolvida tanto na inibição de vias centrais e periféricas de geração da dor como na inibição na produção e/ou ação dos mediadores inflamatórios.

Como os três análogos apresentaram efeito antinociceptivo periférico, decidimos avaliar se eles apresentariam algum efeito antinociceptivo espinhal. Para tanto, utilizamos o modelo da retirada de cauda.

Do ponto de vista farmacológico, o teste da retirada de cauda é aplicado para identificar a atividade de compostos cujos mecanismos de ação analgésica se assemelhem aos dos analgésicos opioides (Le Bars e cols., 2001; Oliveira e cols., 2008), uma vez que foi constatado que a morfina administrada sistemicamente é capaz de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda (Douglass e Carstens, 1997).

Assim, a morfina, um potente fármaco opioide, foi utilizado como controle positivo para o teste, aumentando significativamente o tempo de resposta dos animais ao estímulo térmico em todos os tempos após a sua administração. Os três análogos também tiveram efeito

antinociceptivo aumentando o período de resposta dos animais ao estímulo térmico. Além disso, os valores apresentados pelos análogos e representados em porcentagem de aumento em relação à linha de base ou área sob a curva (ASC) foram muito próximos aos valores da morfina indicando que a antinocicepção dos análogos parece estar relacionada a mecanismos de ações no sistema nervoso espinhal.

Devido as ISAs 160, 161 e 162 terem apresentado efeito antinociceptivo periférico e espinhal, o próximo passo foi avaliarmos se os análogos demonstravam atividade antinociceptiva supra-espinhal. Para isso, foi usado o modelo da placa quente, conhecido por ser sensível a substâncias que atuam no sistema nervoso central.

É comum utilizar o calor como estímulo nociceptivo em modelos de dor aguda. Os nociceptores são ativados diretamente pelo calor e seus mecanismos de ativação estão relacionados a uma atividade primária na medula espinhal, bem como a processamentos em regiões superiores do SNC (Le Bars e cols., 2001).

A característica da resposta dos nociceptores a diferentes temperaturas passou a ser mais bem compreendida após a clonagem do receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1, do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*). Em resposta a agonistas como a capsaicina, o TRPV1 abre o canal, que é permeável ao sódio e ao cálcio, e provoca a despolarização de fibras do tipo C e A δ do tipo II. Contudo, como a deleção gênica do TRPV1 não altera a porcentagem de neurônios que respondem a altas temperaturas, em torno de 50°C, pensou-se na existência de outros mecanismos. Em consequência foi descoberto o TRPV2, que não é sensível a capsaicina e é ativado em temperaturas superiores a 50°C. Esses receptores são expressos em fibras A δ do tipo I (Ahluwalia e cols., 2002).

Analgésicos opioides e outros fármacos com ação predominantemente central aumentam o tempo de permanência (latência) dos animais na placa quente, resultado interpretado como antinocicepção. A observação de que as ISAs 160, 161 e 162 não

induziram aumento do tempo de latência dos animais na placa quente, sugere que estes análogos não apresentam atividade antinociceptiva central.

A possível ação antinociceptiva periférica e espinal nos levou a investigar se os análogos também teriam efeito na nocicepção neurogênica induzida pela capsaicina.

A capsaicina é uma substância álgica que possui um importante papel no estudo do funcionamento das fibras aferentes sensoriais C e A δ , tendo em vista a sua ação nos nociceptores polimodais e termocetores (Petrovski e cols., 2006). Estudos mostram que a nocicepção induzida pela capsaicina ocorre através da ativação do receptor vaniloide TRPV1. Este receptor é um canal ionotrópico não seletivo a cátions, presentes em neurônios sensoriais primários (Caterina e cols., 1997; Palazzo e cols., 2002). A capsaicina provoca a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO) e mediadores pró-inflamatórios em nervos periféricos sendo esta informação nociceptiva transmitida para a medula espinal (Szallasi e Blumberg, 1999).

Evidências sugerem que a regulação e a ativação do TRPV1 são definidas por diversos mecanismos, tais como a inibição do receptor mediada por fosfolipídeos e a estimulação mediada pela fosforilação (Premkumar e Ahern, 2000; Chuang e cols., 2001). O TRPV1 pode ser fosforilado pela proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC), o que sensibiliza o receptor à ação dos agonistas e reduz sua dessensibilização (Lopshire e Nicol 1998; Cesare e cols., 1999). Entretanto, antagonistas como a capsazepina são capazes de inibir a resposta de influxo de cálcio evocado pela capsaicina, mas não pelo pH, calor ou por ativação da PKC (Correll e cols., 2004).

Nossos resultados mostraram que a capsazepina foi capaz de reduzir o tempo de lambadura da pata de forma significativa. De maneira semelhante, as ISAs 160 e 161 reduziram a reposta de lambadura da pata.

Apesar do efeito antinociceptivo das ISAs no modelo da capsaicina ser inferior ao efeito apresentado pelo grupo que foi administrado capsazepina, pode-se sugerir que os derivados da convolutamidina A atuam, pelo menos parcialmente, via ativação de receptores TRPV1 para aumentar o limiar nocicetivo.

Diversos neurotransmissores estão envolvidos na nocicepção, dentre eles o glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios. A injeção de glutamato leva a estimulação direta dos neurônios nociceptivos. Seus receptores são encontrados em terminações nervosas espinhais de fibras aferentes primárias (Ferreira, 2000). Com o objetivo de verificarmos uma possível ação antinociceptiva dos análogos da convolutamidina A sobre o sistema glutamatérgico, utilizamos o modelo proposto por Beirith e cols. (2002).

Agindo em fibras aferentes do tipo C, o glutamato funciona como um neuromodulador do processo doloroso podendo estar envolvido na dor neurogênica induzida pela formalina e pela capsaicina (Furst, 1999). O neurotransmissor atua em dois tipos de receptores, os ionotrópicos N-Metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), ligados a canais iônicos, e também em receptores glutamatérgicos metabotrópicos ligados a proteína G. Além disso, há uma concentração muito grande de receptores para o glutamato no corno dorsal da medula (Urca e Raigorodsky, 1988).

Os receptores NMDA parecem estar envolvidos na nocicepção induzindo a síntese de NO, bem como no desenvolvimento da tolerância a opioides. Os inibidores da NOS tem mostrado prevenir a tolerância desenvolvida a esses agentes analgésicos. Nesse sentido, substâncias que atuam diminuindo a nocicepção induzida por glutamato podem estar atuando tanto em seus receptores como antagonistas ou inibindo a síntese de NO pelo bloqueio da NOS (Beirith e cols., 2002).

Nossos resultados mostraram que os análogos da convolutamidina A causaram redução da nocicepção induzida por glutamato sugerindo que tal efeito poderia ser em parte devido à inibição da NOS.

Com o objetivo avaliar a participação do sistema opioide na atividade antinociceptiva das ISAs 160, 161 e 162, os grupos de animais foram pré-tratados com o antagonista opioide, naloxona. Com este antagonista verificamos uma reversão do efeito antinociceptivo dos três análogos na primeira fase após a injeção da formalina. Já na segunda fase somente a ISA 161 não teve seu efeito antinociceptivo revertido pelo antagonista, indicando que a antinocicepção desse análogo pode não depender de ativação de receptor opioide.

A ação analgésica promovida pelos opioides ocorre pela ativação de receptores opioides acoplados a proteína G_i , esta inibe a atividade da adenilato ciclase e também promove a abertura de canais de K^+ e o fechamento de Ca^{2+} . O efeito inibitório no influxo de Ca^{2+} resulta na diminuição da liberação de neurotransmissores como glutamato e SP no corno dorsal da medula (Fairbanks e cols., 2002; Stein e Lang, 2009). Esse mecanismo pode justificar a ação das ISAs 160 e 162 nos testes nociceptivos do glutamato e da capsaicina, uma vez que os análogos foram capazes de reverter a algesia provocada por esses neurotransmissores. Entretanto tal mecanismo não pode explicar o efeito analgésico da ISA 161 proporcionado após administração do glutamato. Sendo assim é necessário a investigação de outros mecanismos que possam explicar a atuação desse análogo via receptores glutamatérgicos.

Com o objetivo de avaliarmos o envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo dos análogos, os animais foram pré-tratados com o antagonista não seletivo para receptor muscarínico, a atropina.

A analgesia causada pela administração de agonistas nicotínicos ou muscarínicos indica a participação da via colinérgica na modulação da dor. A ativação de receptores

muscarínicos subtipo M2 é capaz de reduzir a resposta periférica de nociceptores frente a estímulos nócicos. No corno dorsal da medula espinhal, a estimulação de receptores muscarínicos M2 e M4 também contribui para o efeito analgésico de forma que os interneurônios inibitórios da lâmina II sejam ativados, reduzindo assim a transmissão nociceptiva (Wess e cols., 2003). A possibilidade de que a via colinérgica possa mediar a resposta da acetilcolina (ACh) no processo doloroso é sugerido pelo fato de que o aumento do limiar nociceptivo medido através do teste de retirada de cauda, quando aplicado em camundongos pré-tratados com agonistas colinérgicos, é marcadamente atenuado pela transecção espinhal dos animais. Isso sugere que a ACh desempenha um papel modelador do processo de inibição da dor (Jain, 2004; Decker e cols., 2004).

Nossos resultados podem indicar que, pelo menos parte do efeito antinociceptivo dos análogos parece ser mediado pelo sistema colinérgico, uma vez que o pré-tratamento com os três análogos aumentou o tempo de latência no modelo de retirada de cauda, sugerindo o efeito analgésico espinhal via receptores muscarínicos.

Os resultados apresentados no teste com o antagonista atropina foram diferenciados para cada fase. Na primeira fase somente a ISA 161 teve seu efeito antinociceptivo revertido pelo antagonista, enquanto na segunda fase isso não ocorreu, e as ISAs 160 e 162 tiveram o efeito antinociceptivo revertido apenas na segunda fase. Assim sugerimos que a atividade antinociceptiva da ISA 161 não depende de ações que interferem no processo inflamatório. Esse resultado é semelhante ao apresentado na administração do antagonista naloxona por esse mesmo análogo.

O conhecimento do papel do óxido nítrico (NO) na transmissão nociceptiva nos levou a investigar um possível envolvimento da via nitrérgica no efeito antinociceptivo das ISAs 160, 161 e 162. Assim, foi administrado um inibidor da NOS (L-NAME). Na primeira fase da formalina, apenas a ISA 161 teve seu efeito antinociceptivo revertido pelo antagonista,

enquanto na segunda fase o inibidor da NOS reverteu o efeito antinociceptivo dos três derivados da convolutamidina A.

Alguns estudos tem mostrado que o NO pode ser produzido em estruturas pós-sinápticas em resposta a ativação de receptores de aminoácidos excitatórios (Kitto e cols., 1992). O NO pode iniciar a liberação pré-sináptica de glutamato funcionando como mensageiro retrógrado sintetizado em sítios pós-sinápticos como consequência da abertura de canais de Ca^{2+} e ativação da NOS. A formação de NO em resposta à ativação dos receptores NMDA também indica a atuação do NO como mediador dos efeitos nociceptivos induzidos pelo NMDA (Bjorkman, 1995; Furst, 1999). Outro estudo mostrou a participação do NO no processo nociceptivo através da inibição de sua síntese resultando na diminuição da resposta nociceptiva (Haley e cols., 1992). Nossos dados também poderiam corroborar os dados da literatura uma vez que a administração do L-NAME reverteu o efeito antinociceptivo dos análogos. Podemos ainda associar os nossos resultados que mostraram a redução da resposta nociceptiva ao glutamato.

Com base nos resultados obtidos na segunda fase do modelo da formalina resolvemos investigar a atividade anti-inflamatória das ISAs 160, 161 e 162. A segunda fase deste modelo é classicamente conhecida como fase inflamatória uma vez que envolve mediadores como citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e NO (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006). Dessa forma, para melhor estudarmos o possível efeito anti-inflamatório dos análogos resolvemos utilizar o modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS).

A BAS, também conhecida como *air pouch*, é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória. Esta técnica é de fácil execução e permite a avaliação de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, estudo da celularidade, exsudação, além de mediadores inflamatórios como citocinas, mediadores lipídicos e NO. A administração da carragenina na bolsa de ar subcutânea induz

um processo inflamatório com características e curso da inflamação semelhantes ao observado na artrite reumatoide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Sedgwick e Lees., 1986).

Entre duas e quatro horas após a injeção da carragenina há intenso processo de rolamento de leucócitos e adesão celular, seis horas após a injeção observa-se grande fluxo de neutrófilos e liberação de agentes quimiotáticos no sítio inflamatório (Secco e cols., 2004). Após as 24 horas da injeção de carragenina ocorre, o aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, da atividade da enzima mieloperoxidase, aumento dos níveis dos metabólitos do NO (nitrato e nitrito), e da exsudação e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ferrandiz e cols., 1996; Saleh e cols., 1996; Fröde e Medeiros, 2001; Da Silva, e cols., 2004; Koo e cols., 2005).

Nossos resultados mostraram uma redução na migração leucocitária nos grupos pré-tratados com todos os análogos. É interessante ressaltar que, para os três análogos, a dose que mostrou maior inibição foi a de 1 mg/kg. Dentre as hipóteses que podem estar relacionadas à inibição da migração leucocitária observada nos animais tratados previamente com os derivados podemos destacar a inibição da produção e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias relacionadas à quimiotaxia de leucócitos. Nos nossos experimentos o envolvimento de vários mediadores pró-inflamatórios e considerados quimiotáticos foi estudado e podemos citar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e o NO.

Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram reduzidos nos grupos pré-tratados com todos os análogos. Neste contexto, podemos supor que a redução na migração dos leucócitos pode ser devida à uma diminuição dos níveis dessas citocinas. Nossos resultados estão de acordo com os relatados de Rau e cols., (2006) que observaram em ratos, no modelo da pancreatite aguda induzida por taurocolato que o imunossupressor tacrolimus, também inibiu a infiltração de

neutrófilos por reduzir a expressão do RNAm para TNF- α e IL-1 β , no modelo experimental de pancreatite aguda induzida por taurocolato, em rato.

Muitos estudos tem sido direcionados às moléculas de adesão. Dentre estes estudos podem-se citar os de Jiang e colaboradores (2004 e 2005) os quais demonstraram que o TNF- α é capaz de induzir a expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar e dérmica humana. A expressão dessas moléculas foi inibida pelo tratamento com a pirrolidina ditiocarbamato logo, via inibição do NF κ B.

Outro estudo que avaliou a expressão de algumas moléculas de adesão importantes para a firme adesão e diapedese dos leucócitos, utilizou combinações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , e anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 e viram que essas citocinas formam uma rede complexa de comunicação, resultando em efeitos que não são determinados pela ação de uma única citocina, mas pela inter-relação entre elas (Daxecker e cols., 2002). Assim, os três análogos da convolutamidina A podem estar atuando em um ou mais eventos celulares, inibindo mediadores que estimulam a expressão de moléculas de adesão (como citocinas pró-inflamatórias) ou fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B.

O TNF é uma citocina que além de estar associada à redução da migração celular e exsudação (Guerra e cols., 2011) ainda tem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e quimiocinas. A via de transdução do sinal que leva à produção de TNF- α é, em parte, regulada pela via da MAP quinase p38, que uma vez ativada, fosforila e ativa outras quinases e fatores de transcrição (Palladino e cols., 2003).

Já IL-1 β é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, como neutrófilos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos. Essa citocina induz a síntese de enzimas, como fosfolipase A₂, COX-2 e iNOS, levando à síntese de PGE₂ e NO (Gabay e cols., 2010). Para que a IL-1 β seja liberada, são necessários dois mecanismos: o primeiro é a transcrição de pró-

IL-1 β , que é biologicamente inativa, e o outro é a liberação de IL-1 β por mecanismos dependentes de caspase-1 (Gabay e cols., 2010). Provavelmente, a inibição na produção de TNF- α e IL-1 β nos grupos de animais pré-tratados com os análogos ISAs deve-se em parte à inibição de algum componente específico de suas vias de sinalização.

Os mediadores inflamatórios liberados na BAS também são capazes de causar aumento na permeabilidade vascular (Aller e cols., 2006; Schmid-Schonbein, 2006). Sendo assim, outro parâmetro avaliado foi o extravasamento de proteínas plasmáticas. Entretanto, apenas as ISAs 160 e 162 foram capazes de reduzir, na dose de 1 mg/kg, a concentração de proteínas totais no exsudato inflamatório. Esse efeito poderia refletir a atuação inibitória dos análogos sobre a ação de mediadores inflamatórios como serotonina e bradicinina ou de citocinas, como a IL-1 β .

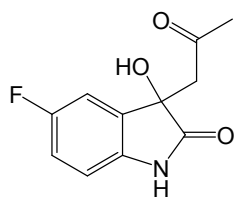
Outro parâmetro analisado foi a produção de NO. Os efeitos desse mediador na resposta inflamatória são complexos e envolvem tanto quimiotaxia de leucócitos como aumento da permeabilidade vascular. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento oral com as ISAs foi capaz de inibir significativamente a produção de NO. Essa menor produção de NO pode ser consequência de: 1) menor número de células que transmigraram para a BAS; 2) pode estar relacionada a uma ação inibitória de citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e óxido nítrico (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006), 3) na atividade da iNOS ou ainda, pode ser decorrente de alteração na expressão da enzima. A primeira hipótese não parece ser verdadeira, uma vez que a redução ocorrida na produção de NO não é proporcional à redução da migração leucocitária. Já em relação a segunda e terceira hipóteses, ainda são necessários ensaios que mostrem sua ação sobre a expressão da iNOS.

Alguns estudos mostram influência da produção do NO na infiltração de neutrófilos e fortalecem nossos resultados. Farsky e colaboradores (2004) observaram que o pré-tratamento sistêmico com L-NAME inibe o influxo de leucócitos na cavidade da bolsa de ar em

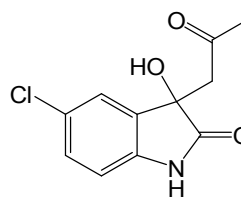
camundongos que receberam injeção de veneno de *Bothrops jararaca*. Tunon e colaboradores (2003) demonstraram que o tacrolimus inibe a expressão de RNAm para iNOS em hepatócitos de ratos incubados com lipopolissacarídeo (LPS). Sakaguchi e colaboradores (2006) observaram que a administração intraperitoneal de L-NAME em ratos reduziu a formação de exsudato e os níveis de albumina na pleurisia induzida pela carragenina. Nossos resultados apresentados no modelo da formalina com o pré-tratamento com o L-NAME também reforçam que os três análogos da convolutamidina A parecem estar atuando na redução da síntese de NO e, dessa forma, podem interferir no processo de infiltração celular.

Portanto, o efeito dos análogos da convolutamidina A na inibição da migração leucocitária, modulação negativa na síntese de citocinas, redução no extravasamento de proteínas e na inibição na síntese de NO sugerem uma ação anti-inflamatória desses compostos.

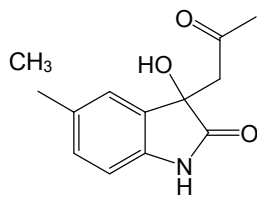
As modificações estruturais feitas na molécula da convolutamidina A foram pequenas, mas suficientes para modificar sutilmente as respostas farmacológicas das ISAs 160, 161 e 162 (figura 7). A presença de substituintes halogenados confere uma maior lipossolubilidade à molécula bem como a inserção do grupamento metil, porém em menor proporção. O átomo de flúor (substituinte da ISA 160) é o representante dos derivados halogenados com maior eletronegatividade, ele possui particularidades tais como baixa polarizabilidade quando ligado ao carbono e apresenta maior lipofilia com melhor permeação pelas membranas sendo mais bem absorvido, além de proporcionar em determinadas posições o aumento da meia vida de uma molécula. Em relação ao cloro (substituinte da ISA 161), esse é menos lipossolúvel em relação ao flúor visto que é mais polarizável (Barreiro e Fraga, 2008).



5-fluoro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
(ISA 160)



5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
(ISA 161)



5-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
(ISA 162)

Figura 8: Estrutura dos derivados da convolutamidina A. 5-fluoro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA 160); 5-cloro-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA 161); 5-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA 162).

Assim, de acordo com os resultados apresentados, a ISA 160 foi a que apresentou um melhor efeito quando comparada aos demais derivados, talvez pela presença do flúor em sua estrutura. Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram três novos e inéditos análogos da convolutamidina A até agora não conhecidos, bem como suas propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias. Dessa forma, o presente estudo demonstra a importância da interação da química orgânica com a farmacologia experimental na busca de candidatos a novos fármacos. Entretanto, os efeitos apresentados pelos três derivados ainda não nos permitem propor um mecanismo de ação preciso uma vez que suas ações constituem eventos multimedidos, envolvendo a ativação de diferentes receptores e vias de sinalização.

6. CONCLUSÕES

Após os estudos farmacológicos realizados com os análogos da convolutamidina A, ISA 160, ISA 161 e ISA 162, podemos concluir que todos:

1. Possuem efeito antinociceptivo periférico demonstrado através do modelo da formalina;
2. Possuem efeito antinociceptivo central espinal demonstrado pelo modelo de retirada de cauda;
3. A ação antinociceptiva está parcialmente relacionada a receptores vaniloides TRPV1;
4. O mecanismo de ação antinociceptivo também parece estar relacionado de forma direta ou indireta aos sistemas glutamatérgico, opioide, colinérgico e nitrérgico;
5. Apresentam efeito anti-inflamatório uma vez que:
 - Inibiram migração leucocitária;
 - Inibiram o extravasamento de proteínas plasmáticas;
 - Inibiram produção de óxido nítrico;
 - Inibiram a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β .

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, J.; RANG, H.; NAGY, I. The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. **Eur. J. Neurosci.** 16:1483-1489. 2002.
- AFRAH, A.W.; STILLER, C.O.; OLGART, L.; BRODIN, E.; GUSTAFSSON, H. Involvement of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in capsaicin-induced in vivo release of substance P in the rat dorsal horn. **Neurosci. Lett.** 316, 83–86. 2001.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Med. Sci. Monit.** 12:225-234. 2006.
- ALWANI, M. E.; WU, B.X.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y.A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol. Ther.** 112:171–183. 2006.
- AUDETTE, J.F.; RYAN, A.H. The role of acupuncture in pain management. **Phys. Med. Rehabil. Clin.N. Am.** 15:749-772.2004.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature.** 392:565-568. 1998.
- BARNES, P.J, ADCOCK I Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci.** 14:436-41. 1993.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A Importância dos Fatores Estruturais na Atividade dos Fármacos em As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Artmed. Porto Alegre*, pp. 245-260. 2008.
- BARTHOLOMEW, B.A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of E.coli. **Food Chem.Toxicol.** 22:541-543. 1984.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** 139:267-284. 2009.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.** 924:219-228. 2002.
- BEN-BESSAT, J.; PERETS, E.; SULMAN, F.G. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 122:434-447. 1959
- BENEDETTI F. The opposite effects of the opiate antagonist naloxone and the cholecystokinin antagonist proglumide on placebo analgesia. **Pain.** 64:535-543. 1996.
- BENYAMIN, R.; TRECOT, A.M. DATTA,S.; BUENAVENTURA, R.; ADLAKA, R.; SEHGAL, N.; GLASER, S.E.; VALLEJO, R. Opioid complications and side effects. **Pain Physician.** 11:105-120. 2008.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Curr. Med. Chem.** 9:1033-1043. 2002.

- BESSION, J.M.; The neurobiology of pain. **Lancet**. 353:1610-1615. 1999.
- BESSION, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**67:167-186. 1987
- BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G.. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunol. Lett.** 2007.
- BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non -steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 39:1-44. 1995.
- BOZZA, F.A.; SALLUH, J.I.; JAPIASSU, A.M.; SOARES, M.; ASSIS, E.F.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit. Care**. 11:49-55.2007.
- BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. **J.Therm. Biol.** 31:208-219. 2006.
- BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. **J.Anat.** 207:19-33. 2005.
- BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharm. Ther.** 107: 139-154. 2005.
- CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. **Planta Med.** 70: 93-103. 2004.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 39:819-824. 1997.
- CAULFIELD, M.P; BIRDSALL, N.J International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Rev.** 50:279–290. 1998.
- CESARE, P.; MCNAUGHTON, P.; A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:15435-15439. 1996.
- CESARE, P., DEKKER, L.V., SARDINI, A., PARKER, P.J., MCNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**. 23:617-624. 1999.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99:13929-13931. 2002

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br. J. Pharmacol.**141:1175-1184. 2004.

CHUANG, H.H., PRESCOTT, E.D., KONG, H., SHIELDS, S., JORDT, S.E., BASBAUM, A.I., CHAO, M.V., JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature.** 411:957-962. 2001.

CLARK, J.M. Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell. **Tex. Rep. Biol. Med.** 33:397-406. 1975.

CORRELL, P.A.; MORRISON; LUTZ, M. Receptor tyrosine kinases and the regulation of Macrophage activation. **J. Leukocyte Biol.** 75:731-737. 2004

COUTAX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine.** 72: 359-371. 2004.

COUTURE, R.; HARRISON,M.; VIANNA, R.M.; COUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**429:161-176. 2001.

CRAVOTTO, G; GIOVENZANA, G. B.; PALMISANO, G.; PENONI, A.; PILATI, T.; SISTI M.; e cols.. Convolutamydine A: the first authenticated absolute configuration and enantioselective synthesis. **Tetrahedron: Asymmetry.** 17:3070–3074. 2006.

DA SILVA, M.B.; FARGES, R.C.; FRÖDE, T.S. Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy. **Mediators. Inflamm.** 13:93-103. 2004.

DAVIS, C.G. Mechanisms of cronic pain from whiplash injury. **J Forensic Leg Med.** XXX:1-12. 2012.

DAXECKER, H.;RAAB, M.; MARKOVIC, S.; KARIMI, A.; ANDREA, G.; MUELLER, M.M. Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation. **Clin. Chim. Acta** 325:171-175. 2002.

DECKER, M.W.; RUTHER, L.E.; BITNER, R.S. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class analgesics. **Curr. Top Med. Chem.** 4:369-384. 2004.

D'MELLO, R.; DICKENSON, H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** 101:8-16. 2008.

DRAY, A.; PATEL, I.A.; PERKINS, M. N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptors: receptor mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. **Br. J. Pharmacol.** 107:1129-1134. 1992.

DRAY A.; URBAN L. New pharmacological strategies for pain relief. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 36:253-280, 1996.

DOUGLASS, D.K.; CARSTENS, E. Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. **J. Neurophysiol.** 77:611–620. 1997.

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 39:343-350, 2003.

EISENACH, J.C. Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia? **Anesth Analg.** 109:293–295. 2009.

ELIIS, K.M.; FOZARD, J.R. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. **Auton. Autacoid Pharmacol.** 22:3-16. 2002.

ELLIS, J.L.; HARMAN, D.; GONZALEZ, J.; SPERA, M.L.; LIU, R.; SHEN, T.Y; WYPIJ, D.M; ZUO, F. Development of muscarinic analgesics derived from epibatidine: role of the M4 receptor subtype. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 288:1143–1150. 1999.

ENDRES-BECKER, J; HEPPENSTALL, P.A; MOUSA, S. DOMINIKA, L.; OKSCHE,A.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; ZOLLNER, C. μ -receptor activation modulates TRPV1 currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. **Mol. Pharmacol.** 71:12-18. 2007.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.** 5:1317-1327. 2003.

FAIRBANKS , C.A.; STONE, L.S.; KITTO, K.F.; NGUYEN, H.O.; POSTHUMUS, I.J.; WILCOX, G.L. α 2c-adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 300:282-290. 2002.

FARSKY, S.H.P.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; PROTO, S.Z.; FERREIRA, J.M. JR.; MELLO, S.B.V.. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. **Inflamm. Res.** 53:442–452. 2004.

FERRANDIZ, M.L.; GIL, B.; SANZ, M.L.; UBEDA, A.; GONZALEZ, E.; NEGRETE, R.; PACHECO, S.; PAYA, M.; ALCARZ, M.L. Effect of bakuchiol on leukocytes function and some inflammatory responses in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 48:975-980. 1996.

FERREIRA, A.M.; ROLLINS, B. J.; FAUNCE, D.E.; BURNS, A.L.; ZHU, X.; DIPIETRO, L.A. The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation. **Cytokine.** 30:64-71. 2005.

FERREIRA, J. Caracterização do efeito hiperalgésico induzido pelas injeções intratecais de glutamato e cininas em camundongos. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Santa Catarina.** Florianópolis, 2000.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat. Rev. Neurosci.** 5: 565-575. 2004.

FIELDS, H. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. **Reg. Anesth.. Pain Med.** 32:242-246. 2007.

- FIGUEIREDO, G.S.M; ZARDO, R.S; S. SILVA, B.V; VIOLANTE, F.A; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Convolutamydine A and synthetic analogues have antinociceptive properties in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 103:431-439. 2012
- FITZGERALD, G.A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat. Rev. Drug. Discov.** 2:879-890, 2003.
- FLOWER, R.J.; ROTHWELL, N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci.** 15:71-6. 1994.
- FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm.** 10:223-227. 2001.
- FURST, D.E. Innovative treatment approaches for rheumatoid arthritis. Cyclosporin, leflunomide and nitrogen mustard. **Baillieres Clin. Rheumatol.** 9:711-729. 1995.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** 48:129-141, 1999.
- GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat. Rev. Rheumatology.** 6:232-241. 2010.
- GARDEN, S. J.; TORRES, J. C.; FERREIRA, A. A.; SILVA, R. B.; PINTO, A. C. A modified Sandmeyer methodology and the synthesis of (±) convolutamydine A. **Tetrahedron Lett.** 38: 1501-1504. 1997.
- GAVÉRIAUX-RUFF.C.; KIEFFER, B.L. Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. **Neuropeptides.** 36:62-71. 2002.
- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.** 109:486–492. 2007
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126: 131-138. 1982.
- GROOT, D.J.A.; De VRIES, E.G.E. GROEN, H.J.M.; De JONG, S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 61:52-69. 2007.
- GUERRA, A.S.; MALTA, D.J.; LARANJEIRA, L.P.; MAIA, M.B.; COLAÇO, N.C.; LIMA, M.C.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **Internat. Immunopharmacol.** 11: 1816-1822. 2011.
- HABIB, A.S.; GAN, T.J. Use of neostigmine in the management of acute postoperative pain and labour pain: a review. **CNS Drugs.** 20:821–839. 2006

- HAEGSTROM, J.Z.; FUNK, C.D. Lipoxygenase and leucotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. **Chem. Rev.** 12: 5866-5898.2011.
- HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends Mol. Med.** 14:461-469. 2008.
- HALLEY J.E.; DICKENSON A.H.; SCHACHTER M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology.** 31:251-258. 1992.
- HANAFY, K.; A., KRUMENACKER.; J. S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med. Sci. Monit.** 7: 801–819. 2001.
- HAMILTON, J.A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. **Trends Immunol.** 23:403-408. 2002.
- HERZ, A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. **Psychopharmacology.** 129:99-111. 1997.
- HEADLEY, P.M.; GRILLER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol Sci.** 11:205–211. 1990.
- 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.
- HORI, T.; OKA, T.; HOSOI, M.; AOU,S. Pain modulatory actions of cytokynes and prostaglandin E2 in the brain . **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 840:269-281. 1998.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J.Neurosci. Methods.** 14:69-76. 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30:103-114.1987.
- IASP. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International association for the Study of Pain (IASP), Subcommittee on Taxonomy. **Pain.** 1986. 3:216-226.
- IGNARO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. **Circ. Res.** 90:21–28. 2002..
- INGRAM, S.L.; WILLIAMS, J.T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. **Neuron.**3:179–186. 1994.

- ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice. **Jpn. J. Pharmacol.** 65:297-303. 1994.
- JANCSO, G. Selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones induced by capsaicin: glial changes. **Cell Tissue Res.** 195:145–152. 1978.
- JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGERES, C.J.E.; DONY J.G.H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm-water-induced tail withdrawal reflex in rats. **Arzneim. Forsch.** 13:502-507. 1963.
- JAIN, K. K. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. **Curr. Opin. Investig. Drugs.** 5:76-78. 2004.
- JIANG, Y.; XU, J.; WU, Z.; ZHONG, S.; LIU, J.; LUO, W.; CHEN, T.; QIN, Q.; DENG, P. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** 171:850-857. 2005.
- JIANG, M.Z.; TSUKAHARA, H.; OHSHIMA, Y.; TODOROKI, Y.; HIRAOKA, M.; MAEDA, M.; MAYUMI, M. Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF- α -induced adhesion molecule expression and NF- κ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. **Life Sciences.** 75:1159-1170. 2004.
- JÓHANNESSEN, T.; WOODS, L.A. Analgesic action and brain and plasma levels of morphine and codeine in morphine tolerant, codeine tolerant and non-tolerant rats. **Acta Pharmacol. Toxicol.** 21:381-396. 1964.
- JONES, S. L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **Eur. J. Pharmacol.** 318:37–40. 1996.
- JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J.A.; FREY, P.; ELDE, R.P.; BROWN, J.C. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. **Cell Tissue Res.** 247:417-431. 1987.
- JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clin. Exp. Allergy.** 39:1786-800. 2009.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210. 2001.
- 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

- KAWABATA, A. Prostaglandin E₂ and pain – an Update. **Biol. Pharm. Bull.** 34: 1170-1173. 2011.
- KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J. Allergy and Clin. Immunol.** 120:3-10. 2007.
- KHAN, A.A.; IADAROLA, M.; YANG, H.Y.T.; DIONNE, R.A. Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation. **J. Pain.** 8:349-354. 2007.
- KHASABOV, S.G.; ROGERS, S.D.; GHILARDI, J.R.; PETERS, C.M.; MANTYH, P.W.; SIMONE D.A. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. **J. Neurosci.** 22:9086–9098. 2002.
- KITTO, K.F.; HALEY, J.E.; WILCOX, G. L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.** 148:1-5. 1992.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S.G.. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology.** 113:427-437. 2004.
- KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H.. Anti-inflammatory evaluation of gardenioa extract, geniposide and genipin. **J. Ethnopharmacol.** 2005.
- KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P.D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** 30:208-217. 2007.
- LAURETTI, G.R.; GOMES, J.M.; REIS, M.P.; PEREIRA, N.L. Low doses of epidural ketamine or neostigmine, but not midazolam, improve morphine analgesia in epidural terminal cancer pain therapy. **J Clin Anesth.** 11:663–668. 1999.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** 2:787-795. 2002.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** 53:597-652. 2001.
- LEES, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. **Inflammopharmacology.** 11:385-399. 2003.
- LEVEY, A.I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Sci.** 52:441–448. 1993.
- LIU, L.; BUCHER, E. Tachykinin peptides and receptor: Putting amphibians into perspective. **Peptides.** 26:1369-1382. 2005.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet.** 353:1607-1609. 1999.

LOPSHIRE, J.C.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. **J. Neurosci.**18:6081-6092. 1998.

MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation: The actors and their language. In: Cells, tissues and disease: Principles of general pathology. MAJNO, G.; JORIS. Nova York: **Oxford University Press**. pp. 307-382. 2004.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J. Neurosci.**15:2768-2776. 1995.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3: 845-852. 2004.

MACPHERSON, R.D. The pharmacological basis of contemporary pain management. *Pharmacol.Ther.* 88:163-185. 2000.

MARCON, R.; LUIZ, A.P.; WERNER, M.F.; FREITAS, C.S; BAGGIO, C.H.; NASCIMENTO, F.P.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G; SANTOS, A.R. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyris octanoate. **Brain Res.** 1295:76-88. 2009.

MARVEL, C. S.; HIERS, G.S. Isatin. **Org. Synth. Coll.** 1:327-330. 1941.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 49:265-90, 2009.

MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** 10:27-39. 1999.

MEDVEDEVA, Y.V.; KIM, M.S.; USACHEV, Y.M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **J. Neuroscience.** 28:5295-5311. 2008

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science.** 150: 971-979. 1965.

MILANO, J. Avaliação do Potencial Antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1h- pirazol metil Ésteres Inéditos em Camundongos. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria.** 2008.

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

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Neurobiology.** 66:355-474. 2002.

- MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.** 5:75-86. 2006.
- MONCADA, S. HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J.* 9:1319-1330. 1995.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43:109-142. 1991.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. **J Rheumatol.** 24:6-8. 1997.
- NIEVES, D.; MORENO, J. J. Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation. **Biochem. Pharmacol.** 72: 1022-1030. 2006.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends Immunol.** 26: 158-165. 2005.
- OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J.. Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch. **Arch. Pathol.** 74:239-243, 1962.
- OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biol. Pharm. Bull.** 31:588-591. 2008.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.** 787:161-164. 1998.
- PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti- TNF therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2:736-746. 2003.
- PALAZZO, E.; NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur. J. Pharmacol.** 439:69-75. 2002.
- PARADA, S.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.** 4:937-944. 2001.
- PENNEFATHER, J.N.; LECCI, A.; CANDENAS, M.L; PATAK, E.; PINTO, F. M.; MAGGI, C.A. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sci.** 74:1445-1463. 2004.
- PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. **Microcirculation.** 7:147-61. 2000.
- PERT, C.B.; SNYDER, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. **Science.** 179:1011-1014. 1973.

- PETTERSEN, C.A.; ADLER, K.B. Airways inflammation and COPD: Epithelial neutrophil interactions. **Chest**. 121:142-150. 2002.
- PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the titerpene 3 β , 6 β , 16 β – trihidroxilup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum Leprosum* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior**. 38:90-99. 2006.
- PINHEIRO, M.M.G.; BESSA, S.O.; FINGOLO, C.E.; KUSTER, R.M.; MATHEUS, M.E.; MENEZES, F.S.; FERNANDES, D.P. Antinociceptive activity of fractions from *Couropita guianensis* Aubl. Leaves. **J. Ethnopharmacol**. 127:407-413.2010.
- POPP, F.D.J. Potential anticonvulsants. X (Reisert compounds studies. LI.) 1-methyl-4-(1-isoquinoliny)piperidin-4-ol and related compounds. **Heterocyc. Chem**. 22:869-872. 1985.
- PREMKUMAR, L.S., AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**. 408:985-990, 2000.
- QIN, N.; ZHANG, S.P.; REITZ, T.L. MEI, J.M.; FLORES, C.M. Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splincing variants: evidence for intron 1 retention. **J.Pharmacol. Exp. Ther**. 315:1298-1305. 2005.
- QUIRION, R. Pain, nociception and spinal opioid receptors. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat**. 8:571-579. 1984.
- RAAB, M.; DAXECKER, H.; MARKOVIC, S.; KARIMI. A.; GRIESMACHER, A.; MUELLER, M. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application.**Clin. Chim. Acta**.3211:11-16, 2002
- RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical**. .15:.3-17. 2004.
- RAU, B.M.; KRUGER, C.M.; HASEL, C.; OLIVEIRA, V.; RUBIE, C.; BEGER, H.G.; SCHILLING, M.K.. Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis. **Pancreas**. 33:174-183. 2006.
- RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the Hypis pectinata (L.) Poit essential oil. **J. Ethnopharmacol**. 134:725-732. 2011.
- RHEN, T. CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – a new mechanisms for old drugs. **N. England. J. Med**. 353:1711-1723. 2005.
- REUTOV. V. P.; SOROKINA, E. G. NO-syntase and nitric-redutase components of nitric oxide cycle. **Biochemistry**. 7:874-884. 1998.

- REN, K. TORRES, R. Role of interleukin 1 β during pain and inflammation. **Brain Res. Rev.** 60:57-64. 2009.
- RINALDO-MATTHIS, A.; HAEGGSTRÖM, J. Z. Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. **Biochimie.** 92: 676-681. 2010.
- ROGER, A.; NICOLL, M.D. Introdução à farmacologia dos fármacos que agem no SNC.em Farmacologia Básica e Clínica. Katzung, B.G. **McGrawHill e Artmed.** Porto Alegre, pp. 297-308. 2010.
- 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.
- 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.
- SAKAGUCHI, Y.; SHIRAHASE, H.; KUNISHIRO, K.; ICHIKAWA, A.; KANDA, M.; UEHARA, Y.. Synergistic effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced paw edema in rats. **Arzneimittelforschung.** 56:695-699. 2006.
- SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.** 118:811-819. 1996.
- SANDKKUNHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Prog. Neurobiol.** 50:49-81. 1996.
- SANDMEYER, T. Isonitrosoacetanilides and their condensation to form isatin derivatives. **Chem. Abstracts.** 13:1840-1841. 1919.
- SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides.**31:381-389. 1997.
- SAHLEY, T.L.; BERNTSON, G.G. Antinociceptive effects of central and systemic administration of nicotine in the rat. **Psychopharmacol.** 65:279-283. 1979.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicintest in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology** 31:1279–1285. 1992.
- SASAKAWA, T.; SASAKAWA, Y.; MASUNAGA, T.; FUJITSU, T.; HIRAYAMA, Y.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor a secretion from peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine.** 29:67-71. 2005.
- SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.** 389:237-

243. 2004.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Analysis of inflammation. **Anu.Rev. Biomed. Eng.** 8:93-151. 2006.

SECCO, D.D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide.** 9:153-164.2004.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. **Agents Actions.** 18: 439-446. 1986.

SETA, N.; KUWANA, M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. **The Keio J. Med.** 56:41-47. 2007.

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

SHIELDS, S.D.; CAVANAUGH, D.J.; LEE, H.; ANDERSON, D.J.; BASBAUM, A.I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptores. **Pain.** 151: 422-429. 2010.

SILVA. B.R.; TORRES, J.C.; GARDEN, S.J.; VIOLANTE, F.A.; REZENDE, M.J.C. Do isolamento à síntese da convolutamidina A. **Quim. Nova.** 31:924-929. 2008.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat. Rev. Immunol.** 10:89-102. 2010.

SIMON, E.J.; HILLER, J.M.; EDELMAN, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H] etorphine to rat brain homogenate. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 70:1947-1949. 1973.

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

SZALLASI, R.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.** 5:159-212. 1999.

SORKIN, L.S., WALLACE, M.S. Acute pain mechanisms. **Surg. Clin. North. Am.** 79:213-229. 1999.

STABLES, M.J.; GILROY, D.W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Prog Lipid Res.**1:35-51. 2011.

STEIN, C.; HASSAN, A.H.S.; PRZEWLOCKI, R., GRAMSCH, C.; PETER. K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** .87:5935-5939. 1990.

- STEIN, C.; LANG, L.J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr. Opin. Pharmacol.** 9:3-8. 2009.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking Pain at its Source: New Perspectives on Opioids. **Nat. Med.** 9:1003–1008. 2003.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35:881-900. 2003.
- TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.** 534:103-107. 2006.
- TERSKIY, A.; WANNEMACHER, K.M.; YADAV, P.N.; TSAI, M.; TIAN, B.; HOWELLS, R.D. Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins. **Life Sci.** 81:1593–1601. 2007.
- TOKUNAGA, T.; HUME, W.E.; UMEZOME, T.; OKAZAKI, K.; UEKI, Y.; KUMAGAI, K.; HOURAI, S.; NAGAMINE, J.; SEIKI, H.; TAIJI, M.; NOGUCHI, H.; NAGATA, R. Oxindole Derivatives as Orally Active Potent Growth Hormone Secretagogues. **J. Med. Chem.** 44:4641-4649. 2001.
- TUNON, M.J.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GUTIERREZ, B.; CULEBRAS, J.M.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.** 66:439-445. 2003.
- URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur.J.Pharmacol.** 24: 211-220. 1988.
- VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? **Nat. Rev. Drug Discov.** 1: 939-950. 2002.
- VALIANCE, P.; LEONE, A.; CALVER, A.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet.** 339:572-575. 1992
- VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLINGTON, I.; TOMLINSON, A; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Pharmacology.** 91: 2046-2050. 1998.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandin and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prg. Neurobiol.** 64:327-363.2001.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.** 46: 295-309. 2004.

- VIGIL, S. V. G.; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. **Transplant. Immunol.** 19:25-29. 2008.
- ZADINA, J.E.; LASZLO, H.; GE, L.J.; KASTIN, A.J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. **Nature.** 386:499-502. 1997.
- ZHANG, H.-P.; KAMANO, Y.; ICHIHARA, Y.; KIZU, H.; KOMIYAMA, K.; ITOKAWA, H.; PETTIT, G. R. Isolation and structure of convolutamydines B ~ D from marine bryozoan *Amathia convolute*. **Tetrahedron.** 51:5523-5528. 1995.
- ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L. M.; TALAL, A. H.. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J. Viral Hepat.** 14:675-687, 2007.
- WAHL, S.M. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. **J.Clin.Immunol.** 12:61-74. 1992.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News Physiol. Sciences.** 15:107 – 113. 2000.
- WANG, H. WOOLF, C. Pain TRPs. **Neuron.** 46:9-12. 2005.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science.** 11:1185-1192. 1982.
- WESS, J.; DUTTARROY, A.; GOMEZA, J.; ZHANG, W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice. A review. **Life Sci.** 72:2047-2054. 2003.
- WHITE, F.A.; BHANGOO, S.K.; MILLER, R.J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat. Rev. Drug Discov.** 4:834-844. 2005.
- WONG, M.M.; FISH, E.M. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Sem. Immunol.** 15:5-14, 2003.
- WOOF, C.J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain.** 152:2-15. 2010.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Exp. Ther. Pharm.** 80:523-527. 2002.